

CARLOS HENRIQUE MOREIRA LIMA

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DO INTERCALANTE
DOXORRUBICINA EM CONDENSADOS DE DNA VIA
ESPECTROSCOPIA DE FORÇA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L732e
2018

Lima, Carlos Henrique Moreira, 1985-

Estudo da interação do intercalante doxorubicina em
condensados de DNA : via espectroscopia de força / Carlos
Henrique Moreira Lima. – Viçosa, MG, 2018.

xvi, 100 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 91-100.

1. Biofísica. 2. Pinças Ópticas. 3. DNA - Análise.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Física.
Programa de Pós-Graduação em Física. II. Título.

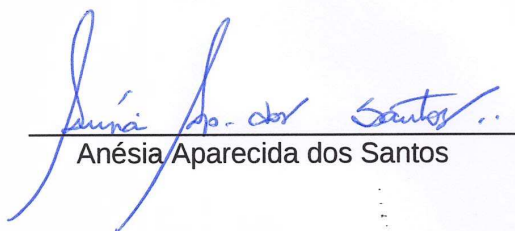
CDD 22. ed. 571.4

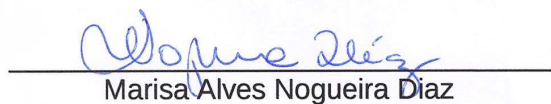
CARLOS HENRIQUE MOREIRA LIMA

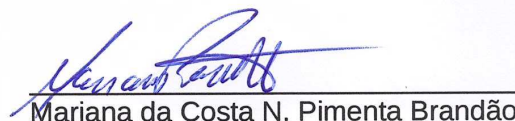
**ESTUDO DA INTERAÇÃO DO INTERCALANTE DOXORRUBICINA EM
CONDENSADOS DE DNA VIA ESPECTROSCOPIA DE FORÇA**

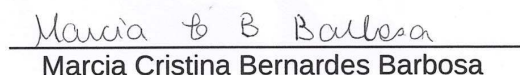
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 05 de abril de 2018.


Anésia Aparecida dos Santos


Marisa Alves Nogueira Diaz


Mariana da Costa N. Pimenta Brandão


Marcia Cristina Bernardes Barbosa


Márcio Santos Rocha
(Orientador)

Já andei por tanta estrada Já venci tanta cilada
E no caminho fiz ser ouro a minha prata No meu mundo não tem fadas
Mas a mão de Deus me alcança Já chorei por tanta causa
Já sorri por tantas outras E a mistura destes sentimentos tantos
Tanto riso, tanto pranto Verso escrito no meu rosto
Misturei meu sangue em outro Quando a dor fez alvoroço
Veio a calma da cantiga Fiz plantio de outro verso
Desbravei outro universo Aprendi ser trovador
Em cada porto e despedida dessa vida
Esqueci meu coração batendo lá Aos poucos transformei-me em tantos outros
Sou de cada povo um pouco E hoje a terra inteira é o meu lugar
Quem me dera pudesse compreender Os segredos e mistérios dessa vida
Esse arranjo de chegadas e partidas Essa trama de pessoas que se encontram
Se entrelaçam
E misturadas ganham outra direção Quem me dera pudesse responder
Quem sou eu nessa mistura tão bonita Tantos outros, sou na vida um Zé da Silva
Sofro as dores de outros nomes Rio os risos de outras graças
Trago em mim as falas dessa multidão Quem me dera pudesse compreender
Sou Um Zé da Silva
(Padre Fábio de Melo)

Agradecimentos

Agradeço, primeira e fundamentalmente, à Deus e a minha família meu pai, José Claudio, minha mãe, Jacinta e meus irmãos Paulo e Natália por terem sempre me apoiado, com a mesma intensidade e confiança, desde a minha entrada na Universidade, como estudante de Matemática e Filosofia, assim como quando decidi me dedicar a Física, e até hoje. Sem eles eu jamais chegaria a este momento e dificilmente estaria tão contente em querer ir muito mais além.

Minha namorada Alessandra que é meu campo gravitacional, em algum momento sempre vou ao seu encontro nessas idas e vindas da vida. Está perto do nosso campo gravitacional se colapsar e se transforma em uma supernova.

Ao professor Márcio, pela amizade ao longo destes anos de trabalho em conjunto, pela confiança, pelo sempre presente apoio à minha ainda jovem jornada científica. É um pesquisador que sempre vou ter como exemplo, obrigado professor pela paciência.

Ao professor Ésio em que todas nossas conversas, sempre me serviram como enorme motivação para dar sempre meu melhor.

Aos meus amigos da pós-graduação, com os quais passo boa parte dos dias, pela ótima convivência e forte amizade. Agradeço também pelo quanto, direta ou indiretamente, me ajudaram ao longo do meu doutoramento. Em especial agradeço Eduardo, Raniela, Tiago, Bruno, Brunão, Gustavo, Rayane, Joaquim e Ismael

Aos amigos mineiros que vou levar para eternidade: Viviane, Josi, Sylvestre, Guelci, Fabiano, Renan e o quase mineiro Leandro.

Aos amigos que ao acaso nossas vidas se coincidiram em Viçosa: Marithê, Jarbas, Maíra e Pollyanna vocês foram muito importantes.

Agradeço meus familiares tios e tias que foram muito presentes nessa minha passagem no sudeste, agradeço principalmente aos meus primos Anderson e Vanessa.

Aos meus amigos cearenses Diego(nosso médico nosso amigo), Thiago Arrais, Rodrigo, Thiago Magno, Bananinha, Jaime, Thalita, Fernada, Verônica, Ir Maria e Eduardo. Amizade mais que enraizadas

Agradeço Robério Agostinho *In Memóriam*.... por tudo

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)pelo apoio financeiro.

A todos, meus mais sinceros agradecimentos.

Sumário

Lista de Figuras	viii
Resumo	xiii
Abstract	xv
Introdução e Motivação	1
1 DNA e Suas Características	4
1.1 A Estrutura do DNA	4
1.2 A dupla hélice de DNA: O modelo descrito por Watson e Crick	5
1.3 Desnaturação e Renaturação do DNA e Tipos de DNA	6
1.4 Base Estrutural da Cromatina	7
1.5 Características da compactação da Cromatina	10
2 Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações	12
2.1 BSA e Suas Características	12
2.2 Força de Depleção	14
2.3 Interação entre partículas e macromoléculas em solução	14
2.3.1 Interação entre partículas esféricas e macromoléculas em solução	16
2.4 Efeitos de forma em interações de depleção	19
2.5 Interação entre partículas carregadas e macromoléculas	22
3 Pinça Óptica: Experimento e Aplicação em Condensados	24
3.1 Princípio de funcionamento de uma pinça óptica	24

3.1.1	Pressão de Radiação	26
3.1.2	Força de Gradiente	28
3.2	Técnicas experimentais	32
3.2.1	Montagem experimental	32
3.2.2	Calibração da Pinça Óptica	34
4	A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina	38
	A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina	38
4.1	Doxorrubicina	38
4.2	Tipos de Condensados	39
4.3	Desenvolvimento do suporte da amostra e preparação da Solução DNA- microesferas	41
4.3.1	Preparação das amostras	41
4.3.2	Construção do suporte da amostra	41
4.3.3	Preparação da solução DNA com microesferas	42
4.3.4	O DNA do fago λ	44
4.3.5	Estiramento da molécula de DNA	44
4.3.6	Inserindo a proteína/fármaco na amostra	48
4.4	Interação DNA-BSA	48
4.5	Interação do fármaco Doxorrubicina com DNA compactado induzido por BSA	58
4.6	Conclusões	66
5	Interação DNA-Histonas	68
	Interação DNA-Histonas	68
5.1	Interação DNA-Histonas e Resultados	68
5.2	Interação DNA-Histonas sem H1 e Resultados	74
5.3	Conclusões	78

6 Conclusões e Perspectivas	80
6.1 Resultados e Perspectivas	80
Apêndice C: Artigos publicados	83
A Artigos publicados	84
A.1 Artigos Publicados Relacionados a Tese	84
Revista <i>Journal of Chemical Physics</i>	84
Revista <i>Biopolymers</i>	84
A.2 Artigos Publicados em outros Projetos	85
Revista <i>Soft Matter</i>	85
Revista <i>International Journal of Biological Macromolecules</i>	85
Revista <i>BBA - General Subjects</i>	85
Referências Bibliográficas	91

Lista de Figuras

1.1	A estrutura de nucleotídeo [13]	5
1.2	Estrutura química de uma parte da molécula do DNA. Estão ilustradas as ligações de hidrogênio, algumas bases nitrogenadas e o esqueleto de açúcar fosfato.	6
1.3	Diferentes tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas: A, B e Z respectivamente [13]	7
1.4	: Estrutura do nucleossomo. a) temos as vistas frontal e lateral da estrutura de um nucleossomo descrita por cristalografia. Temos H2A em amarelo; H2B em rosa; H3 em azul, H4 em verde, fitas de DNA em turquesa e laranja.[18] b) Esquema representando a formação dos dímeros de H2A-H2B e do tetrâmero de 2H3-2H4.	9
1.5	Níveis de compactação do DNA [25].	11
2.1	Aspecto conformacional da proteína BSA. pH 4,3 temos transição na forma normal (n) em seguida temos a forma fast (f); No pH 2,7- temos a transição na forma (f) para forma estendida (e).[32]	13
2.2	Diagrama abaixo descreve a fase da conformação de DNA em função das concentrações de NaCl e BSA esse resultado foi obtido pelo grupo Yoshikawa.[34]	14
2.3	Representação da região depletores em torno de uma partícula esférica.	16
2.4	Dimensões relevantes para a interação de depleção.	17
2.5	Separação de partículas de formas diferentes induzida por depleção.	20
2.6	Formação de um rouleux.	21

3.1	Pressão de radiação: A força resultante, nesse caso, empurra a microesfera no sentido de incidência do feixe.[50]	29
3.2	Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada abaixo do foco e na metade direita do perfil de intensidades do laser. Observe que a força resultante sobre a microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe.[50]	30
3.3	Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada acima do foco do laser. Podemos observar que a força total que atua na microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe.[50]	31
3.4	Montagem experimental utilizada para as medidas .[50]	33
3.5	(a) Temos a microesfera aprisionada na posição de equilíbrio no poço de potencial. (b) Com acionarmos do piezoelétrico, a microesfera é empurrada pelo fluido e fica em equilíbrio em uma nova posição no poço de potencial. Nessa posição, a força de Stokes, \vec{F}_S e, é igual, em módulo, à força óptica, \vec{F}_{OP} . [50]	34
3.6	Gráfico descreve o processo de calibração da pinça óptica via método de Stokes. Círculos vermelhos: dados experimentais; Linha sólida: ajuste feito utilizando-se a equação 3.23.[50]	37
4.1	Estrutura química da Doxorrubicina.	39
4.2	Situações possíveis para o DNA, as microesferas de poliestireno e do conjunto DNA-microesferas em nossa amostra.[50]	43
4.3	Esquema da realização dos estiramentos da molécula de DNA em um regime quase-estático. São mostradas duas posições da microesfera em instantes de tempo distintos, evidenciando o seu deslocamento dentro do poço de potencial gerado pela pinça óptica.	45
4.4	Curva típica da componente x da força x extensão do DNA. O ajuste é feito utilizando a equação WLC onde já discutimos no capítulo anterior deste trabalho.	47
4.5	Ilustração do procedimento usado para a troca das alíquotas.	48
4.6	Interação DNA-BSA e Doxorrubicina	49

4.7	Curvas de força por extensão obtidos para três diferentes tipos de condensados de DNA: condensados induzidos por BSA, obtida com $C_{BSA} = 30\%$ (linha sólida vermelha), condensação do DNA induzida por cátions promovidas pela amina tetravalente esperpina (SPM) em 0.1 mM (linha tracejada verde) e condensados de DNA promovido pelo polímero neutro polietileno-glicol (PEG) 8000 a 20% em massa (linha tracejada azul).	50
4.8	Curvas de força por extensão obtido no regime entálpico (altas forças) o λ -DNA encontra-se em PBS com $[NaCl] = 125$ mM e várias concentrações de BSA. O DNA puro está representado pela cor preta $C_{BSA} = 0\%$; e as concentrações de BSA, em azul $C_{BSA} = 2,5\%$ em massa; em verde $C_{BSA} = 15\%$ em massa; em vermelho $C_{BSA} = 30\%$ em massa; em laranja $C_{BSA} = 45\%$ em massa. . .	51
4.9	Curvas força por extensão são obtidos no regime entrópico (baixas forças), as curvas estão relacionadas com variação de concentração de BSA. O DNA puro está representado pela cor preta $C_{BSA} = 0\%$; e as concentrações de BSA, azul: $C_{BSA} = 2,5\%$ em massa; verde $C_{BSA} = 15\%$ em massa; vermelho $C_{BSA} = 30\%$ em massa; roxo $C_{BSA} = 45\%$ em massa.	52
4.10	Comportamento do comprimento de contorno aparente pela variação da concentração de BSA.	53
4.11	Comportamento do comprimento de persistência pela variação da concentração de BSA.	54
4.12	Relação do comprimento de contorno condensado pelo comprimento de contorno $L_c/L(\%)$ em função da força F (pN), o λ -DNA está em PBS com $[NaCl] = 125$ mM e várias concentrações de BSA. Azul: $C_{BSA} = 2,5\%$ em massa; Verde: $C_{BSA} = 15\%$ em massa; Laranja M: $C_{BSA} = 20\%$ em massa; Vermelho: $C_{BSA} = 30\%$ em massa.	56
4.13	Variação do potencial químico por unidade de comprimento ($\Delta\mu/L_o$) em função da variação do comprimento de contorno ($-\Delta L_c/L_o$), induzida pela concentração de BSA.	57
4.14	Comprimento de persistência dos complexos DNA-BSA em função da concentração total do ligante em solução, para uma concentração fixa de BSA. . . .	59

4.15	Comprimento de contorno dos complexos DNA-BSA em função da concentração total do ligante em solução, para uma concentração fixa de BSA.	60
4.16	Gráfico do comprimento de persistência por concentração de Doxorubicina e uma concentração de fixa de BSA (20% em massa).	61
4.17	gráfico do comprimento de contorno por concentração de Doxorubicina e uma concentração de fixa de BSA (20% em massa).	62
4.18	Comprimento de contorno dos complexos DNA-BSA em função da concentração total do ligante em solução. Nesse experimento não há BSA em solução [83].	63
4.19	Comprimento de persistência dos complexos DNA em função da concentração total do ligante em solução, sem uma concentração fixa de BSA em solução[83].	65
5.1	Dinâmica da compactação sofrida pela cromatina em eucariotos. Níveis consecutivos de condensação são mostrados, partindo do DNA livre, passando pelas fibras de 10nm, também chamada colar de contas, e de 30 nm, até alcançar níveis que culminam com a compactação máxima, representada pelo cromossomo [85].	69
5.2	Modelo descreve a relação entre nucleossomo, cromatossomo e partícula central do nucleossomo na presença da linker histona, formando o octâmero[85].	69
5.3	Curvas de força por extensão obtidos no regime de entálpico (altas forças). As curvas de variação de concentração de histonas, onde temos: o DNA puro representada pelas cor vermelha $C_{histonas} = 0$; e as concentrações de histonas temos, azul $C_{histona} = (0,01g/L)$; verde $C_{histona} = (0,015g/L)$; preto $C_{histona} = (0,025g/L)$ e rosa $C_{histona} = (0,05g/L)$. .	70
5.4	Curvas de força por extensão obtidos no regime de entálpico (altas forças). As curvas de variação de concentração de histonas, onde temos: o DNA puro representada pelas cor vermelha $C_{histonas} = 0$; e as concentrações de histonas temos, azul $C_{histona} = (0,01g/L)$; verde $C_{histona} = (0,015g/L)$; preto $C_{histona} = (0,025g/L)$ e rosa $C_{histona} = (0,05g/L)$. .	71

5.5	Gráfico do comprimento de contorno em função da variação de concentração de histonas.	72
5.6	Gráfico do comprimento de persistência em função da variação de concentração de histonas.	73
5.7	Gráfico do comprimento de persistência em função da variação de concentração de histonas.	75
5.8	Gráfico do comprimento de contorno em função da variação de concentração de histonas.	76
5.9	Gráfico do comprimento de persistência em função da variação de concentração de histonas.	77
5.10	Gráfico do comprimento de contorno em função da variação de concentração de histonas.	78
A.1	Capa da Revista Biopolymers, Dezembro de 2017	85

Resumo

LIMA, Carlos Henrique Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2018. **Estudo da interação do intercalante Doxorrubicina em condensados de DNA via espectroscopia de força.** Orientador: Márcio Santos Rocha.

Iniciamos este trabalho estudando o pinçamento óptico que foi a técnica experimental fundamental para realização desse projeto. A pinça Óptica Trata-se de uma técnica de micromanipulação bastante utilizada para estudar partículas e sistemas biológicos com tamanho na escala de micrômetro. Através da técnica caracterizamos via espectroscopia de força as interações do DNA e albumina do soro bovino (BSA) mostramos o processo de compactação do DNA por interação de depleção, em seguida estudamos interações DNA-ligantes que constitui um campo interdisciplinar de conhecimento, com importância fundamental tanto no entendimento de vários processos intracelulares básicos (divisão celular, transcrição, tradução) bem como na aplicação em tratamento de doenças humanas (quimioterapias, terapias gênicas). Neste sentido, fármacos intercalantes desempenham papel central devido a sua larga aplicação em diversos tipos de quimioterapias. Os intercalantes modificam a estrutura mecânica da dupla hélice da molécula de DNA ao interagirem com o mesmo, de forma que as características físico-químicas da interação podem ser estudadas via ensaios mecânicos, como por exemplo em experimentos de estiramento de moléculas únicas de DNA realizados por pinças óticas ou magnéticas. Entretanto, quase totalidade dos trabalhos disponíveis na literatura a respeito das interações de intercalantes com o DNA foram realizados com este último disperso em solução, numa conformação muito diferente da encontrada no interior das células, onde o DNA está fortemente compactado formando a cromatina. Na

segunda parte do trabalho estudamos a influência da histona linker H1 para dinâmica da cromatina e sua importância para regulação da cromatina ao interagir com fármaco doxorrubicina.

Abstract

LIMA, Carlos Henrique Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2018.
Study of the interaction of Doxorubicin intercalant in condensed DNA via spectroscopy of force. Adviser: Márcio Santos Rocha.

The study of optical tweezers technique initiates this thesis work on account of being underlying to this project accomplishment. The optical tweezer is a technique of micro-manipulation very useful to work with biological systems and particles in the micrometer size scale. By using this technique we characterized per force spectroscopy the DNA and bovine serum albumin (BSA) interactions, featuring the process of DNA compaction by depletion interaction, then the DNA-binders interactions were studied, this last concerns an interdisciplinary field of knowledge being fundamental to understand a lot of basic intracellular processes (cell division, transcription, translation) as well as the treatment of human diseases (chemotherapies, gene therapies). In this sense, DNA intercalator drugs play the main role owing to its large application in many kinds of chemotherapies, this drugs modify the mechanical structure of the double helix in the DNA molecule during the interaction, so the physicochemical features of this interactions can be studied by mechanical essays as in the single molecule DNA stretching realized by optical or magnetic tweezers. However, almost every available work in the literature about the interactions between DNA and intercalators were done with the suspended molecule which differs a lot from the intracellular medium, where there are found tightly compacted forming the chromatin. In the second part of this work the H1 histone linker influence for the chromatin dynamics were studied and its importance to regulate the chromatin during the interaction with the doxorubicin were discussed.

Introdução

As pinças ópticas foram inicialmente desenvolvidas para a micromanipulação e aprisionamento de átomos [1], mas foi no campo da Física Biológica que essa poderosa ferramenta experimental encontrou suas maiores aplicações. Em 1986, A. Ashkin, considerado o pioneiro nessa técnica, relata a primeira observação de uma armadilha óptica estável utilizada para o aprisionamento, em três dimensões, de partículas na faixa de ~ 25 nm até ~ 10 nm, utilizando uma única pinça óptica [2].

No ano seguinte a essa publicação, Ashkin relata, em um novo trabalho, uma das primeiras aplicações da pinça óptica na Física Biológica: o aprisionamento de vírus e bactérias em solução aquosa, utilizando um laser de argônio com uma potência de 120 mW [3]. Desde as descobertas de Ashkin e seus colaboradores, as pinças ópticas foram (e ainda são) empregadas no estudo de uma variedade de sistemas biológicos, dentre os quais podemos citar: manipulação de células individuais [4], estudo de propriedades mecânicas de membranas celulares [5], formação de bolhas (do termo inglês blebs) em células, na formação de células híbridas, dinâmica dos cromossomos durante o processo de mitose, no estudo de proteínas, como a RNA polimerase [6], no estudo das propriedades mecânicas de biomoléculas, como o DNA [7]. Outras importantes aplicações dessa técnica podem ser encontradas nas referências [8, 9].

De uma maneira geral, as pinças ópticas são ferramentas experimentais bastante simples, sendo compostas basicamente por um laser fortemente focalizado por uma objetiva de grande abertura numérica¹. Veremos detalhadamente no Capítulo 4 e 5 quais são as condições para que ocorra o pinçamento óptico e a descrição do experimento.

¹A abertura numérica é um parâmetro fornecido pelo fabricante da lente e, quanto maior o seu valor, maior será a abertura do cone de luz focalizado e, conseqüentemente, mais forte será a força de gradiente, responsável pelo pinçamento óptico.

Introdução e Motivação

Nosso trabalho consiste em determinar as curvas de força x extensão para a molécula de DNA e os complexos DNA condensados - fármacos. Utilizando o modelo teórico deduzido por Marko e Siggia[10], ajustamos as curvas obtidas e extraímos dois parâmetros importantes para nossas análises: o comprimento de persistência² e o comprimento de contorno³

A investigação das interações DNA-ligantes constitui um campo interdisciplinar de conhecimento, com importância fundamental tanto no entendimento de vários processos intracelulares básicos (divisão celular, transcrição, tradução) bem como na aplicação em tratamento de doenças humanas (quimioterapias, terapias gênicas).

Neste sentido, fármacos intercalantes desempenham papel central devido a sua larga aplicação em diversos tipos de quimioterapias. Os intercalantes modificam a estrutura mecânica da dupla hélice da molécula de DNA ao interagirem com o mesmo, de forma que as características físico-químicas da interação podem ser estudadas via ensaios mecânicos, como por exemplo em experimentos de estiramento de moléculas únicas de DNA realizados por pinças óticas ou magnéticas. Entretanto, a quase totalidade dos trabalhos disponíveis na literatura a respeito das interações de intercalantes com o DNA foram realizados com este último disperso em solução, numa conformação muito diferente da encontrada no interior das células, onde o DNA está fortemente compactado formando a cromatina.

Na primeira parte do nosso trabalho utilizamos a técnica de pinçamento óptico para estudar os efeitos do fármaco intercalante doxorrubicina em condensados de DNA induzidos pela proteína BSA.

A ativação de genes eucarióticos requer o desdobramento seletivo da fibra de cromatina para acessar o DNA para processos como transcrição, replicação e reparo de DNA. A proteína H1 nos mostra que tem um influencia desdobramento da cromatina essa onde alguns pontos dessa premissa permanecem obscuros. Aqui, investigamos a resposta de estiramento das fibras de cromatina por pinçamento óptico. Nessa etapa do projeto caracterizamos comportamento fio de cromatina para baixas e altas forças e

²O comprimento de persistência fornece informação sobre a elasticidade da molécula.

³O comprimento de contorno é a distância ponta - à - ponta do polímero quando este se apresenta totalmente esticado.

Introdução e Motivação

fizemos análise da variação da H1 na formação da estrutura do octâmero.

Em síntese, no Capítulo 2, discutimos os aspectos gerais sobre DNA e cromatina descrevendo os níveis de compactação.

No Capítulo 3, discutimos brevemente sobre a interação de depleção, suas características caracterizando o agente depletante e sua morfologia.

No Capítulo 4, discutimos brevemente albumina do soro bovino (BSA), apresentamos todo o procedimento experimental para a caracterização da interação DNA-BSA e DNA-BSA com a doxorrubicina (Doxo) e resultados.

No Capítulo 5, apresentamos os resultados experimentais obtidos para a interação entre a molécula de DNA e histonas, obtidos utilizando a espectroscopia de força e finalmente, no Capítulo 6, apresentamos as conclusões e perspectivas deste trabalho.

Capítulo 1

DNA e Suas Características

Uma das maiores descobertas da ciência moderna foi a revelação da estrutura tridimensional da molécula do Ácido Desoxirribonucleico, conhecido como DNA [11]. O DNA é responsável por armazenar a informação genética nos seres. Ele é capaz de se autoduplicar e de se traduzir em proteínas, e é também susceptível a mutações. O modelo estrutural compatível com o DNA foi proposto por Watson e Crick, em 1953, o que lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1962. Desde esta descoberta, inúmeros estudos foram realizados e diversas aplicações *in vivo* e *in vitro*, foram desenvolvidas. Nesta seção descreveremos o modelo estrutural da dupla-hélice [12].

1.1 A Estrutura do DNA

Podemos considerar a molécula de DNA um polímero de unidades de desoxirribonucleotídeos. Os desoxirribonucleotídeos são compostos por um açúcar conhecida como desoxirribose. Temos as bases nitrogenadas são divididas em purinas que possuem dois anéis aromáticos, adenina (A) e guanina (G) ou pirimidinas que possuem um anel aromático, citosina (C) e timina (T). As bases ligam-se ao carbono 1' da pentose através de uma ligação glicosídica β . Os desoxirribonucleotídeos formam cadeias ligados entre si por ligações fosfodiéster estabelecidas entre o grupo fosfato e o grupo hidroxila do carbono 3' do nucleotídeo.

1. DNA e Suas Características

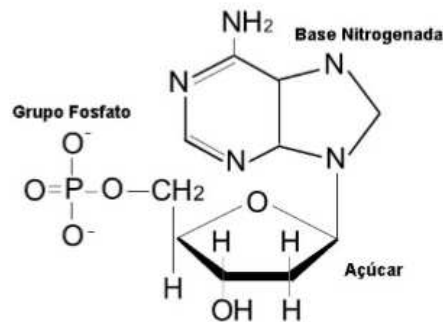


Figura 1.1: A estrutura de nucleotídeo [13]

1.2 A dupla hélice de DNA: O modelo descrito por Watson e Crick

As ligações fosfodiéster nas duas fitas estão em direções opostas, uma na direção $5' \rightarrow 3'$ e outra na direção $3' \rightarrow 5'$, sendo portanto, antiparalelas. As bases nitrogenadas adjacentes são unidas por ligações de hidrogênio. Entre T e A são formadas duas ligações de hidrogênio, enquanto que entre C e G se formam três ligações. Entretanto, estudos indicam que os pares AT e CG têm aproximadamente o mesmo tamanho e dimensões semelhantes. Como ambos os pares ocupam o mesmo espaço, a dupla-hélice apresenta um diâmetro uniforme ao longo do contorno da molécula. Sendo assim, não existem restrições quanto a sequência assumida pelos nucleotídeos ao longo da molécula. A relação molar entre A e T é igual a 1, o mesmo acontece para as concentrações de C e G. Entretanto, a quantidade molar de AT e de CG varia de acordo com a sequência de DNA analisada. Essa característica de pareamento tem grande importância. Essa propriedade garante a replicação precisa de cadeias longas de DNA e a transmissão das informações genéticas às proteínas, via transcrição.

Para estabilizar a estrutura da dupla-hélice de DNA, várias forças agem em conjunto. Essas forças devem ser fortes o suficiente para manter em sua unidade, mas devem permitir uma flexibilidade conformacional, essencial para sua atividade. Além das ligações covalentes, que unem os átomos nas moléculas, outras forças mais fracas

1. DNA e Suas Características

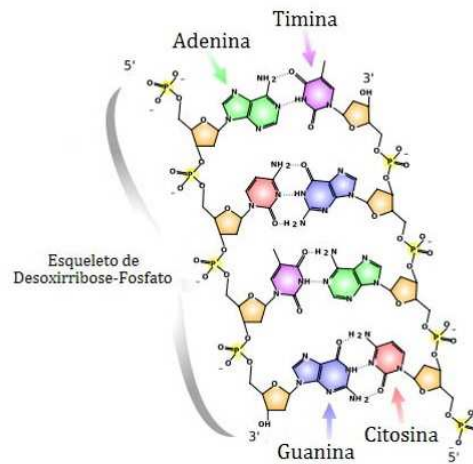


Figura 1.2: Estrutura química de uma parte da molécula do DNA. Estão ilustradas as ligações de hidrogênio, algumas bases nitrogenadas e o esqueleto de açúcar fosfato.

atuam no DNA.

1.3 Desnaturação e Renaturação do DNA e Tipos de DNA

Esses fenômenos são de fundamental importância para os processos de replicação, transcrição e recombinação gênica. A Etimologia da palavra desnaturação e renaturação significam fusão e reanelamento. O fenômeno de desnaturação caracteriza-se pela quebra das ligações de hidrogênio, o que leva à separação das fitas complementares do DNA. O processo antagônico é denominado renaturação. Ambos os processos podem ser obtidos *in vitro*, sob condições peculiares.

Alguns fatores podem desencadear a desnaturação do DNA como, por exemplo, o aumento da temperatura, a titulação com ácidos ou álcalis e por agentes desnaturantes como a formamida e o dimetil sulfoxido (DMSO). Outros fatores como a diminuição da energia cinética da molécula e a presença de substâncias intercalantes também levam à desnaturação do DNA [14]

Existem três tipos diferentes de DNA encontrados em condições fisiológicas do

1. DNA e Suas Características

tipo B, tipo A e tipo Z. O DNA pode ter diferentes conformações, dependendo de sua composição de bases e do meio em que se encontra. Os diferentes tipos de DNA são descritos com base na técnica de cristalografia. A forma mais habitual é a B. A forma A é menos hidratada e mais condensada, e a forma Z tem um esqueleto em ziguezague, e possui uma hélice com giro para a esquerda, enquanto as formas A e B têm hélices com giro para a direita. Na forma B, o DNA possui um comprimento médio de 0,34 nm por par de base, e uma densidade linear média de massa de 1900 Da/nm. O diâmetro médio da hélice é de 2,37 nm, e a molécula possui 10,4 pares de base por volta da hélice. O ângulo médio de rotação entre dois nucleotídeos adjacentes é de $34,6^\circ$ [13]. A figura 1.3 mostra os três tipos de DNA.

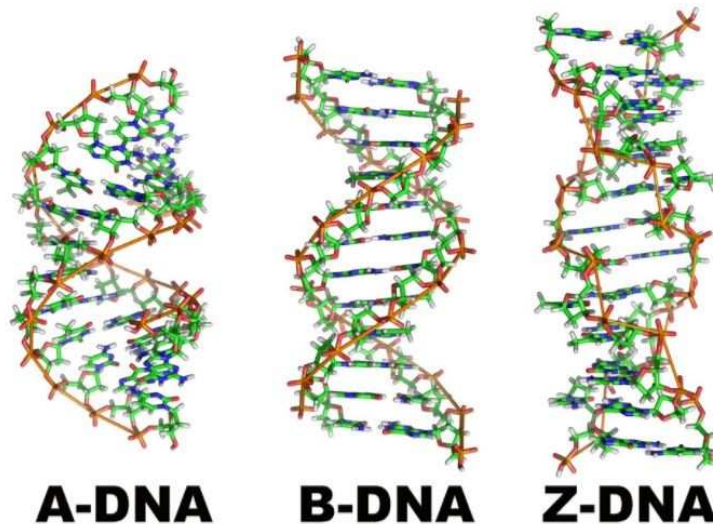


Figura 1.3: Diferentes tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas: A, B e Z respectivamente [13]

1.4 Base Estrutural da Cromatina

Nesse tópico iremos abordar alguns aspectos sobre a compactação do DNA via interação com proteínas, e vamos descrever as interações entre DNA e histonas. Na década de 70 iniciaram-se os estudos sobre estrutura da cromatina, mas somente em 2009, um artigo publicado na revista Nature trouxe uma relação de estruturas altamente desejadas pelos cristalógrafos [16]. Dentre elas, figurava a estrutura da cromatina. Esse

1. DNA e Suas Características

artigo descreveu de forma coerente como se comporta a arquitetura da cromatina, podemos afirmar isso porque foi o primeiro artigo a descrever a estrutura em função dos processos celulares.

A cromatina é formada, basicamente, por complexos de DNA e proteínas, o que possibilita a acomodação de quase dois metros de DNA dentro do núcleo de cada célula humana. O processo de condensação do DNA é regulado por outras moléculas nucleares, tanto pequenas moléculas como outras proteínas com atividade enzimática ou remodeladora da cromatina.

A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo que consiste em, aproximadamente, 146 pares de bases do DNA enroladas ao redor de um octâmero central de proteínas conhecidas como histonas. Essas proteínas, inicialmente, foram consideradas como componentes meramente estruturais, mas agora são reconhecidas. Pelo importante papel que desempenham na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina, o octâmero é formado por quatro histonas que são H1, H2a, H2b, H3 e H4 [17].

O octâmero é formado por dois pares de cada uma das histonas, H2A, H2B, H3 e H4. Estando em solução, as histonas H2A e H2B apresentam-se na forma de dois heterodímeros e H3 e H4 formam um tetrâmero (Figura 2b). Com a associação destes complexos (2 dímeros e 1 tetrâmero) se dá a formação do octâmero (Figura 2b).

As histonas do octâmero possuem uma estrutura globular bastante conservado evolutivamente, ao redor do qual a dupla fita de DNA se enrola, e um domínio N-terminal, denominado cauda. As caudas N-terminais das histonas do octâmero são desestruturadas, flexíveis e ricas em resíduos de arginina e lisina, o que lhes confere carga altamente positiva no ambiente celular essa carga positiva é um dos principais motivos para as histonas interagirem com DNA pois ocorrerá uma interação eletrostática.[18]

Até o momento descrevemos dois pares de histonas que formam o octâmero, mas temos uma quinta histona a H1 também conhecida como linker histona, que participa de forma fundamental na organização da cromatina mesmo sem estar envolvida na formação do nucleossomo. Sua ligação ao nucleossomo promove aumento na organização e compactação da estrutura da cromatina.

Utilizando diferentes combinações de nucleossomos, com tamanhos de linker

1. DNA e Suas Características

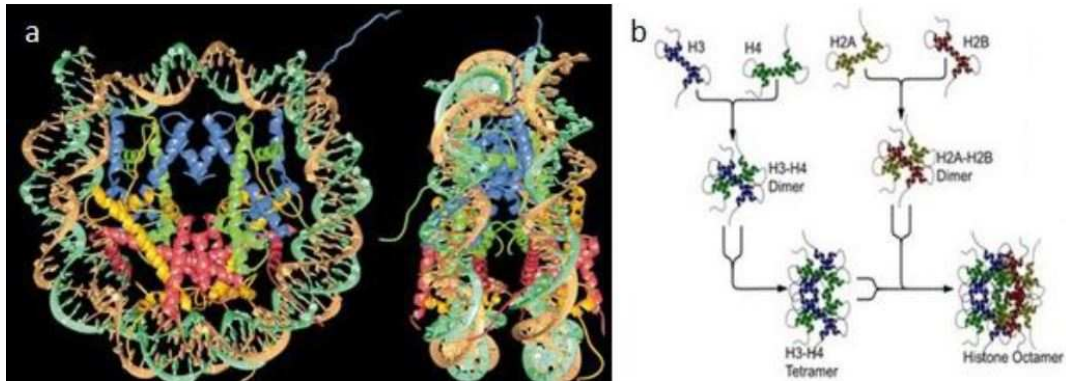


Figura 1.4: : Estrutura do nucleossomo. a) temos as vistas frontal e lateral da estrutura de um nucleossomo descrita por cristalografia. Temos H2A em amarelo; H2B em rosa; H3 em azul, H4 em verde, fitas de DNA em turquesa e laranja.[18] b) Esquema representando a formação dos dímeros de H2A-H2B e do tetrâmero de 2H3-2H4.

DNA distintos, Routh e colaboradores mostraram que a ligação da H1 à cromatina *in vitro* corrobora com aumento na sua compactação em níveis tanto mais altos quanto maior for o tamanho do linker DNA, chegando a uma espessura média de 34,3 nm para (61 nucleossomos e linker DNA de 50 pares de bases) e 21,3 nm para (80 nucleossomos e linker DNA de 20 pares de bases) [19].

Aplicando a técnica ultracentrifugação analítica, foi demonstrado, ainda, que apenas em presença da H1 é alcançado o nível de compactação da cromatina nativa [19]. A cromatina utilizada no experimento foi extraída de fígado de rato. Foram realizados experimentos usando células-tronco embrionárias de camundongos, onde evidenciou-se que reduzindo a cerca de 50% da quantidade normal de H1 causou mudanças drásticas na estrutura da cromatina, incluindo redução global do espaçamento entre nucleossomos e diminuição local da compactação da cromatina [20]. Podemos afirmar que a proteína H1 é de extrema importância para construção morfológica da cromatina e conseqüentemente, para a resposta transcricional da estrutura da cromatina, como a epigenética [21].

1.5 Características da compactação da Cromatina

O processo de compactação do DNA é um fenômeno que ocorre por certos níveis de condensação da molécula, vamos descrever algumas situações como se comporta a morfologia do DNA.

O empacotamento do DNA sob forma da cromatina pode chegar a um número surpreendente de bilhões de pares de bases por células (DNA humano), para compreendermos melhor essa logística molecular, de extrema importância para manutenção da vida, vamos descrever os níveis de empacotamento. O empacotamento ocorre por níveis, desde a dupla fita livre de DNA que acomoda bilhões de pares base, dentro dos núcleos celulares, até a níveis menos compactados conhecidos como "colar de contas", que possuem em média uma espessura de aproximadamente 10nm e consiste de uma sequência de nucleossomos separados entre si pelo linker DNA [22]. Devido ao processo de compactação da cromatina, pode-se dizer que ela constitui o principal regulador [23].

Outro fator que interfere no dobramento da cromatina é a concentração salina do meio que está inserida a cromatina, ou seja, depende da força iônica do meio. Em 1979 Thoma et al., iniciaram um estudo sobre a influência da força iônica no processo de compactação da cromatina.

A primeira problemática estudada foi o efeito da força iônica sobre a morfologia de fibras de cromatina em presença e ausência de H1. Por microscopia eletrônica, F. Thoma F. Thom et al, observou que aumentando a força iônica a cromatina se dobra progressivamente. Foi observado que a compactação também foi crescente com aumento da força iônica em ausência de H1, porém, com menos intensidade e com isso gerando fibras menos bem definidas do que em sua presença. Outra informação importante que obtiveram é que quando a força iônica for muito baixa, viu-se que os nucleossomos estavam presentes apenas em presença da H1 [24]. A figura abaixo descreve os níveis de compactação da cromatina.

1. DNA e Suas Características

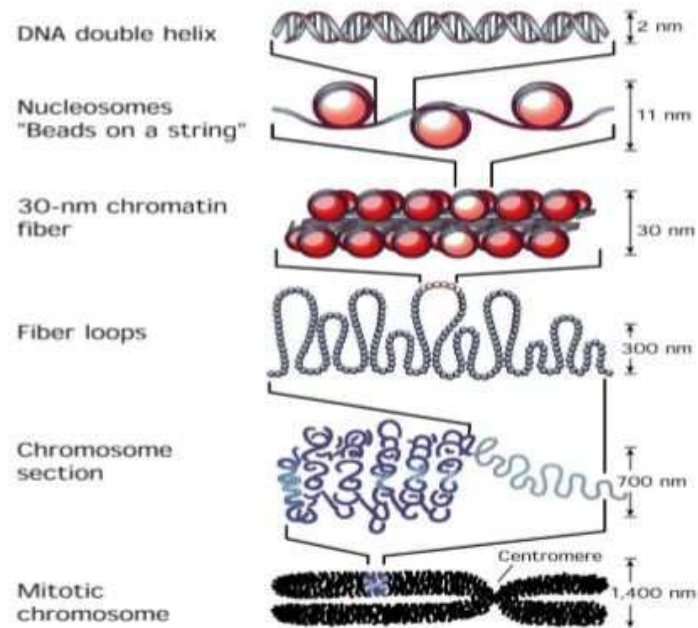


Figura 1.5: Níveis de compactação do DNA [25].

Apesar da estrutura cristalográfica do nucleossomo ter sido determinada na década de 90, ainda existe muita discussão em relação a estrutura da fibra de cromatina. A utilização de várias técnicas como dicroísmo circular, espectroscopia de força e microscopia eletrônica e etc permitiram estabelecer alguns modelos teóricos [26, 27, 28].

Capítulo 2

Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

Neste capítulo temos como objetivo fazer uma breve descrição acerca das principais características da albumina soro bovino (BSA) e descrever como ocorre a interação da BSA com a molécula de DNA em uma certa configuração. Este estudo da interação DNA e BSA nos ajuda a compreender como a molécula de DNA se comporta em um ambiente aglomerado, com isso simulando uma realidade mais próxima encontrada no sistema celular [34].

2.1 BSA e Suas Características

A BSA é a proteína mais abundante no sangue bovino, em média com a concentração típica 40g/L. A sua estrutura é parecida com HSA (Human Serum Albumin) apresentando uma sequência de aminoácidos idêntica, em cerca de de 80 por cento [30, 31].

Existem várias funções importantes que a BSA é responsável de realizar, como a manutenção da pressão osmótica sanguínea, a regulação do pH no plasma, possui efeito oxidante e etc. A BSA dependendo de sua concentração pode formar dímeros. O valor do pH da proteína é que distingue se a carga vai ser positiva ou negativa, com pH 7,0 a BSA tem carga equivalente negativa, e as mudanças morfológicas de sua estrutura

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

ocorre no intervalo no pH 4 e 8 A Figura 2.1 descreve a mudança morfológica da BSA [32].

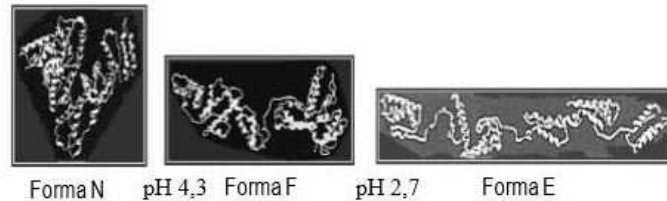


Figura 2.1: Aspecto conformacional da proteína BSA. pH 4,3 temos transição na forma normal (n) em seguida temos a forma fast (f); No pH 2,7- temos a transição na forma (f) para forma estendida (e).[32]

Recentemente foi observado transição de fase da molécula de DNA induzida pela proteína BSA, onde foram realizados experimentos de microscopia de fluorescência para monitorar a variação da conformação da molécula de DNA.

Verificou-se que as moléculas de DNA apresentam conformação compacta para algumas concentrações de BSA, curiosamente coexistindo sal na solução ocorre uma atraso na condensação em comparação a uma situação com baixa concentração salina sendo uma característica distinta a condensação *psi*¹ à 2.2 descreve esse comportamento . [34, 63]

As figuras geométricas representam as seguintes características da conformação do DNA: os círculos claros representam DNAs não compactados, os triângulos não compactados e parcialmente compactados, os quadrados compactados, parcialmente compactados e compactados, triângulos escuros parcialmente compactados e compactados e círculos escuros DNAs compactados.

Essas mudanças morfológicas ocorre devido aumento da concentração de BSA no sistema. Em certas condições ocorre um fenômeno chamado força de depleção, por exclusão de volume faz com que o DNA sofra um empacotamento.

¹A condensação- *psi* é a abreviação para sentença de língua inglesa polymer and salt induced ou seja condensação induzida por polímeros e sal. Do DNA é estudada experimentalmente e teoricamente em diversos contextos [33].

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

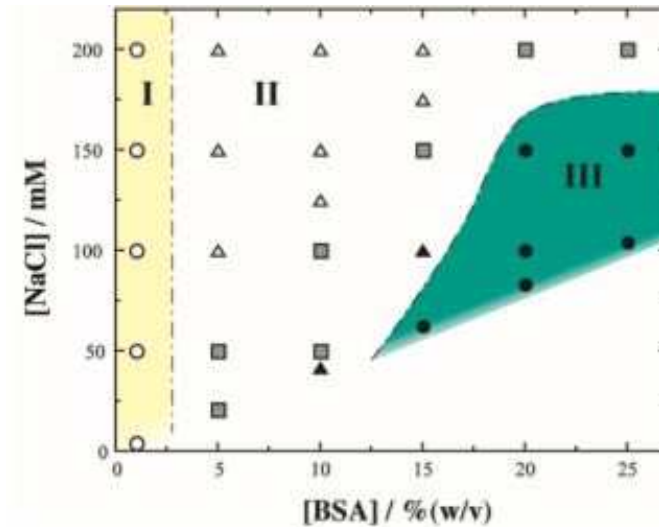


Figura 2.2: Diagrama abaixo descreve a fase da conformação de DNA em função das concentrações de NaCl e BSA esse resultado foi obtido pelo grupo Yoshikawa.[34]

2.2 Força de Depleção

Dois primeiros pesquisadores a estudar interação de depleção foi Sho Asakura e Fumio Oosawa em 1954, onde descreveram a interação entre corpos imersos em soluções de macromoléculas. Essa interação, exprime o efeito entrópico experimentado por estes corpos em função da exclusão de volume que sofre a solução de macromoléculas [36].

Podemos afirmar que a força de depleção que atua entre corpúsculos que se encontram dispersos em soluções poliméricas (ou em meio a pequenas partículas), é uma força motivada pela pressão da solução, conseqüentemente possui algumas características em comum com outros sistemas [37].

2.3 Interação entre partículas e macromoléculas em solução

Vamos considerar duas placas paralelas imersas em uma solução de macromoléculas, Asakura e Oosawa [36], definiram que para a situação em que a distância, h , entre estas placas se faz menor que o diâmetro, d , das moléculas em solução, nenhuma

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

destas pode permear a região entre as placas. Dessa forma passa a existir entre as placas uma fase de solvente puro, enquanto a solução ao redor das placas está permeada por macromoléculas.

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

Com isso ocorre uma diferença de pressão entre a região que entre as duas placas e seu entorno. Conseqüentemente passa a atuar de fora pra dentro na superfície de cada placa, uma força associada à diferença entre a pressão osmótica da solução de macromoléculas, Π_0 , e a pressão osmótica do solvente puro, Π_s .

2.3.1 Interação entre partículas esféricas e macromoléculas em solução

Com o objetivo de estudar um sistema mais real possível, fazendo a consideração mais básica possível, idealizemos uma dispersão de partículas esféricas, impenetráveis, cujo diâmetro é D , (esferas maiores representadas na figura 2.3) em uma solução de macromoléculas, que em solução assumem uma conformação aproximadamente esférica, representadas pelas esferas menores na figura 2.3, com diâmetro d .

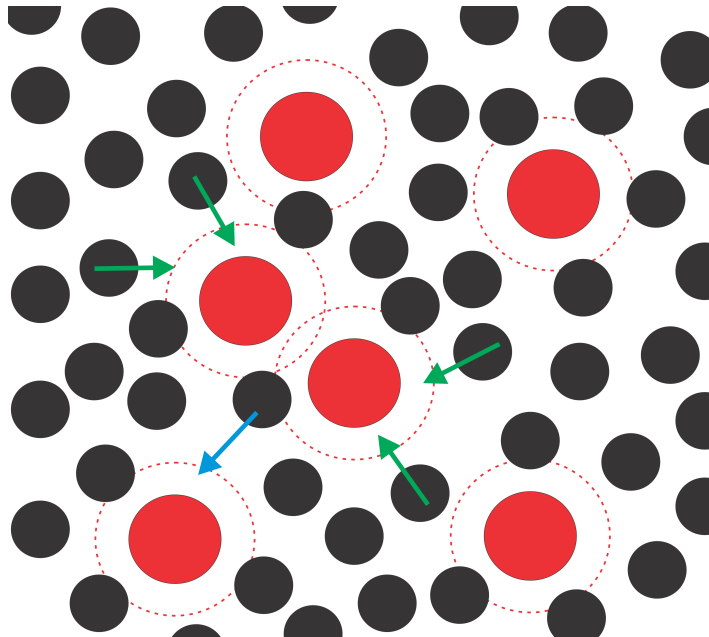


Figura 2.3: A região depletora é delimitada pela linha pontilhada. As setas na cor verde indicam a atuação da pressão osmótica sobre as partículas maiores.

A maior parte dos coloidais, consiste em uma mistura de partículas que podem ser consideradas rígidas, entre as quais a interação de exclusão de volume, ou repulsão estérica, é bastante significativo, ou seja, duas partículas não ocupam o mesmo lugar simultaneamente [39].

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

É preciso considerar aqui as exclusões de todas as configurações para as macromoléculas que as levariam a adentrar a região delimitada pelas partículas maiores, este efeito de exclusão de volume, também pode ser chamada repulsão estérica. Devido a essa exclusão de configurações a probabilidade de encontrar macromoléculas em torno das partículas é menor, onde surge o que se denomina camada de depleção (ou região depletora) em volta das partículas esta. Limitação para a configuração das macromoléculas implica uma diminuição na entropia [37].

Veja na figura 2.3 a representação da região depletora delimitada pela linha pontilhada em torno das partículas maiores, em uma solução de macromoléculas aproximadamente esféricas e menores. A pressão osmótica da solução de macromoléculas tende a atrair duas regiões depletoras expulsando as macromoléculas da região entre as partículas maiores. Figura 2.3 : Representação das dimensões relevantes para a interação de depleção.

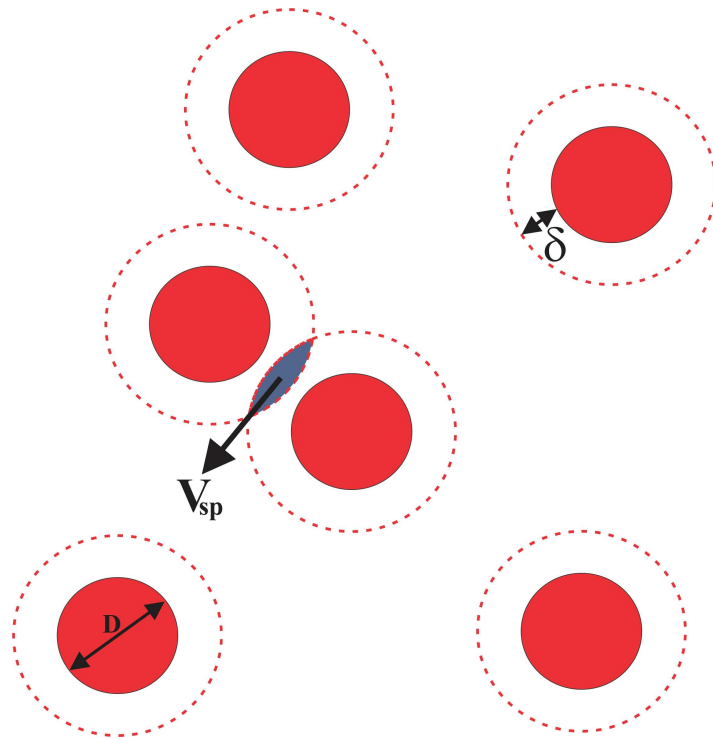


Figura 2.4: Representação das dimensões relevantes para a interação de depleção.

Em geral a espessura δ da região depletora, representada na figura 2.4, deve ser definida para cada sistema considerando-se a flexibilidade da macromolécula e a

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

rigidez da partícula, assim como suas respectivas dimensões. No caso mais simples, aqui considerado, a espessura da região depletores é igual ao raio das partículas menores: $\delta = \frac{d}{2}$ [37].

O volume delimitado pela interseção entre as regiões de depleção, é denominado volume de sobreposição, V_{sp} , e está representado na figura 2.4 pela porção na cor laranja. Observe que, de acordo com que as partículas maiores se aproximam, ou seja, a distância entre seus centros (h) diminui, o volume de sobreposição V_{sp} aumenta, portanto o volume disponível para as macromoléculas na solução aumenta.

A pressão osmótica devido à solução de macromoléculas atua igualmente sobre a superfície das partículas, com exceção de uma área A na região entre as duas partículas, que está em contato apenas com o solvente puro. Nesse caso obtemos a seguinte equação para a força de depleção que atua sobre cada partícula esférica:

$$F = -\Pi_0 A, \quad (2.1)$$

$$A = \frac{\pi}{4}[(D + d)^2 - h^2], \quad D \leq h < D + d \quad (2.2)$$

$$A = 0, \quad h \geq D + d.$$

A corresponde à área de seção circular que corta o volume de sobreposição V_{sp} exatamente no meio da distância entre as duas partículas $\frac{h}{2}$, Π_0 é a pressão osmótica ideal da solução de macromoléculas, ou corpo da solução [38].

O potencial devido a essa força F pode então ser escrito da seguinte forma:

$$W(h) = -\Pi_0 V_{sp}, \quad (2.3)$$

ou então em termos das distâncias relevantes,

$$W(h) = -\Pi_0 \frac{\pi}{12} [2(D + d)^3 - 3h(D + d)^2 + h^3], \quad D \leq h \leq D + d \quad (2.4)$$

$$W(h) = 0, \quad h \geq D + d.$$

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

Da expressão para o potencial de interação $W(h)$, obtém-se a confirmação de que a força é atrativa, cujo alcance é igual a d , ou seja, 2δ , e nesse caso portanto, as esferas tendem a se aproximar [37].

2.4 Efeitos de forma em interações de depleção

A interação de depleção depende do volume de sobreposição, que por sua vez está relacionado com a região depletora definida em torno das partículas.

A flexibilidade e as interações entre segmentos afastados de uma cadeia polimérica retrata a forma das macromoléculas interagentes em solução, tanto depletadas quanto depletantes. A concentração do agente depletante também é um fator que influencia a interação, através da pressão osmótica da solução. No entanto para uma dada concentração do agente depletante a força de depleção depende apenas do volume de sobreposição [37].

O alcance da força e o potencial de depleção experimentam um aumento de acordo com que se aumenta a assimetria entre os constituintes da solução [38], pois o volume de sobreposição, V_{sp} , depende do tamanho e formato dos colóides em suspensão. Para cada formato geométrico dos interagentes o potencial de depleção assume uma forma diferente, embora dependa sempre da pressão osmótica da solução, Π_0 . O livro *Colloids and the Depletion Interaction*, [37], apresenta os cálculos para o potencial de depleção que atua em dispersões coloidais para algumas formas geométricas de partículas interagentes.

Como descrito anteriormente, a ductilidade das partículas dá origem à região depletora que implica uma diminuição na entropia, S , das macromoléculas. Sob o ponto de vista entrópico, o comportamento de fase de uma suspensão coloidal é obtido maximizando-se a entropia, o que irá minimizar a energia livre $\mathcal{F} = U - TS$. A energia de interação, U , é nula para as partículas consideradas nesse caso [39].

O volume livre de uma suspensão composta por uma mistura de macromoléculas é maximizado quando os componentes se separam. Isso ocasiona um aumento na entropia translacional das macromoléculas, ao custo de uma diminuição na entropia da

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

mistura como um todo, podemos chamar esse fenômeno de ordenação entropicamente dirigida [39].

Em uma mistura de componentes acentuadamente assimétricos portanto, a interação de depleção é intensificada, tornando-se possível separar partículas de diferentes tamanhos e formatos [38], para uma certa concentração dos componentes nessa mistura.

A separação dentre partículas esféricas e cilíndricas induzida por polímeros está esquematizada na figura 2.5, nesse caso dizemos que os polímeros (curvas representadas em preto na figura abaixo) são agentes depletados. A separação é um fenômeno reversível, pois ocorre para algumas concentrações do agente depletante, acima, ou abaixo, das quais a mistura é mantida [37]. Esta característica permite a elaboração de um diagrama de fases para misturas coloidais.

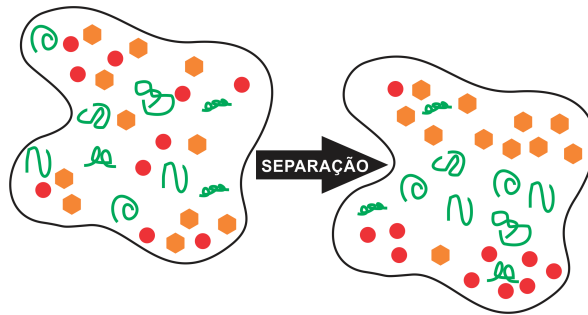


Figura 2.5: Separação de partículas de formas diferentes induzida pela interação de depleção. (Adaptado de [37]).

A segmentação de partículas coloidais em função de sua geometria tem ganhado atenção devido às várias aplicações nanotecnológicas, como por exemplo em dispositivos nanoeletrônicos, um indicio de tais aplicações e esclarecimentos sobre os procedimentos experimentais podem ser encontrados em [37, 40, 41].

Há a formação de fases condensadas devido à interação entre partículas e macromoléculas, para situações em que a força de depleção é suficientemente grande para vencer possíveis repulsões entre as partículas. A fase condensada ocorre somente sob certas concentrações de macromoléculas, à este desenvolvimento costuma-se dar o nome de condensação macromolecular. Uma mudança nessas concentrações pode fazer com que fases adjacentes se tornem homogêneas ou que soluções homogêneas separem-se em fases.

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

Uma intrigante possibilidade, a ser pesquisada, é que o meio intracelular, onde existe uma grande diversidade de macromoléculas, seja regido por interações de depleção, juntamente com outras interações já bastante conhecidas. Por exemplo, dentre toda sorte de polímeros que existem no meio intracelular entidades com características parecidas tendem a se aproximar, enquanto ocorre a segregação de corpúsculos com características muito diferentes. Esta separação dá origem a uma questão biológica conhecida como microcompartimentalização celular que se refere à observação de que as macromoléculas em uma célula não se distribuem uniformemente, mas tendem a se separar sem a necessidade de qualquer membrana [39].

Um exemplo da interação entre colóides em suspensão pode ser observado na coalescência de células vermelhas do sangue, denominadas eritrócitos, figura 2.6-a, que pode ser explicada em termos da força de depleção. No sangue de uma mulher grávida ou de uma pessoa com doença infecciosa grave, observa-se que a concentração de certas proteínas do plasma¹ aumenta consideravelmente [42], o que contribui para o aumento da pressão osmótica do plasma onde os eritrócitos atuam como depletantes [38].

A indicação da atuação da força de depleção deve-se principalmente à forma como estas células se agregam, em uma estrutura bem organizada, conhecida como *rouleaux* figura 2.6-b, onde as células que são aproximadamente pequenos discos se agrupam face a face, o que aumenta o volume de sobreposição, V_{sp} , depletando quaisquer partículas da região que as entremeia [38].

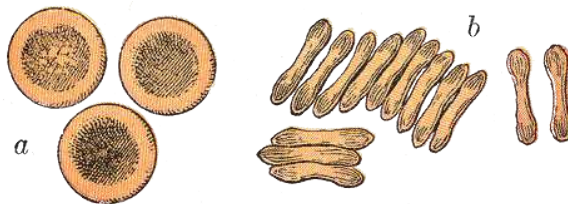


Figura 2.6: *a*- Célula vermelha do sangue e *b*- a formação denominada *rouleaux*. (Figura obtida em [43].)

Conhecer profundamente a interação que ocasiona à agregação de células sanguíneas é interessante principalmente porque a taxa de sedimentação de eritrócitos

¹Solução na qual as células do sangue estão suspensas.

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

é um processo simples e rápido que pode ser usada como um indicador de doenças infecciosas [42], [44].

2.5 Interação entre partículas carregadas e macromoléculas

Como sabemos o efeito de assimetria influencia a um aumento relevante na força de depleção mas existe outro efeito que também corrobora pra o aumento da força de depleção, que ocorre se as moléculas interagentes possuírem cargas. Para considerarmos a interação de depleção entre macromoléculas carregadas façamos uma analogia ao caso mais simples, partículas esféricas com diâmetro D , carregadas e mergulhadas em uma solução de macromoléculas, com diâmetro d ($d \ll D$), também carregadas. A pressão osmótica da solução de macromoléculas carregadas Π é maior que a pressão osmótica para uma solução na mesma concentração quando descarregada Π_0 [38].

A adição de sal provoca uma típica blindagem das cargas efetivas nas entidades em solução, no entanto não é capaz de igualar à situação de neutralidade. Quaisquer duas partículas dispersas em uma solução de macromoléculas, ao se aproximarem por uma distância menor ou igual a d , criam entre elas uma região onde não é permitido encontrar macromoléculas, região de depleção. A área de seção transversal desta região (A) à meia distância entre as partículas ($h/2$) é dada por [38]:

$$A = 4\pi\left(\frac{D'}{2}\right)^2 = \pi((D + d)^2 - h^2), \quad (2.5)$$

onde D' é o diâmetro da área onde não se encontram macromoléculas, no centro da região de depleção se estendendo em direção á solução de macromoléculas. A força de depleção devido somente às macromoléculas é dada então pela seguinte equação,

$$F = -\Pi A, \quad (2.6)$$

em que a pressão osmótica da solução carregada agora é dada por Π .

Poucos contra-íons podem ser encontrados na região delimitada pela área A ,

2. Albumina do Soro Bovino (BSA): Características e Interações

enquanto os outros dispersos na solução tentam se aproximar dessa região e são retirados daí pela ação das macromoléculas, existe, portanto uma região em torno da área A onde contra-íons estão se movendo. Reduzindo a distância h entre as partículas, D' fica maior, e a região onde se encontravam os contra-íons se dispõem entre as partículas, fazendo com que uma pressão correspondente aos contra-íons comece a atuar sobre as macromoléculas, na direção da solução [38].

Como nessa situação as macromoléculas sofrem, além de uma limitação de espaço ocasionada pelas partículas, uma contribuição da pressão osmótica dos contra-íons próximos às partículas, o efeito resultante em aproximá-las, liberando espaço na solução para as macromoléculas, é intensificado.

Capítulo 3

Pinça Óptica: Experimento e Aplicação em Condensados

O pinçamento óptico está sendo utilizada desde meados da década de 70 em diversas aplicações em física e biologia [1, 2, 3, 45, 46, 47]. Apesar disso, somente há pouco tempo atrás foi formulada uma teoria completa, partindo de primeiros princípios, válida para microesferas em qualquer faixa de tamanho.ref Neste capítulo vamos dá ênfase a descrição geométrica do pinçamento óptico.[48, 49]

3.1 Princípio de funcionamento de uma pinça óptica

Com Advento da teoria eletromagnética o desenvolvimento Maxwell no século XIX, demonstrou-se que a luz é capaz de transferir momento para um meio ao incidir sobre este, exercendo assim uma força sobre este meio. Esta força está relacionada com a potência da luz incidente e da sua velocidade de propagação no meio de incidência. Para um único raio podemos escrever esse fenômeno de acordo com as equações abaixo

$$F \propto \frac{P_r}{v}, \quad (3.1)$$

com

3. Experimento e Aplicação em Condesados

$$v = \frac{c}{n}, \quad (3.2)$$

onde P_r é a potência do raio e n é o índice de refração do meio de incidência.

Em uma abordagem quântica, podemos descrever a origem do fenômeno do pinçamento óptico no fato de que a luz carrega momento em seus fótons, e por isso é capaz de exercer força sobre um objeto ao transferir momento para este. Pelo fato desta força ter uma magnitude muito pequena, é mais fácil verificá-la experimentalmente utilizando feixes muito intensos, como o laser, e pequenos objetos com tamanho na escala de micrômetro.

Vamos fazer um estudo simples para estimar a ordem de grandeza da força da pinça óptica. Esta análise usa a interpretação quantizada da luz como um aglomerados de fótons, que possuem um momento linear e uma energia bem definidos. Contudo, é importante enfatizar que esta interpretação quântica não é necessária para entendermos a razão da luz exercer força sobre um objeto. Numa visão clássica, podemos determinar a força de um feixe de laser sobre um objeto usando o tensor de *stress* de Maxwell.

Para termos uma noção da ordem de grandeza da força que a luz é capaz de exercer ao incidir em um corpo, vamos imaginar um feixe de luz incidindo perpendicularmente em um espelho plano. Cada fóton do feixe possui um momento dado por $\vec{p} = \hbar \vec{k}$, sendo \vec{k} seu vetor de onda. Ao incidir no espelho, este fóton sofre reflexão total, adquirindo um momento final $-\vec{p}$. O momento transferido de cada fóton para o espelho é

$$\Delta \vec{p} = \hbar \vec{k} - (-\hbar \vec{k}) = 2\hbar \vec{k}. \quad (3.3)$$

Considerando em módulo, podemos reescrever esta equação na forma

$$\Delta p = 2\hbar k = 2 \frac{\hbar \omega}{c} = 2 \frac{E}{c}, \quad (3.4)$$

onde ω é a frequência angular da luz incidente, c é a sua velocidade e $E = \hbar \omega$ é a energia do fóton. Desta forma, para N fótons, teremos $E_{tot} = N\hbar \omega = NE$.

A força resultante exercida por um feixe com N fótons por segundo incidindo

3. Experimento e Aplicação em Condesados

sobre o espelho pode ser obtida a partir da Eq. (3.4). Usando a 2ª Lei de Newton, teremos

$$F = 2 \frac{1}{c} \frac{dE_{tot}}{dt} = 2 \frac{P_{tot}}{c}, \quad (3.5)$$

onde P_{tot} é a potência do feixe incidente.

Para um feixe de laser utilizado em pinças ópticas, a potência típica é da ordem de alguns poucos mW. Deste modo, podemos estimar o valor da força da expressão anterior,

$$F_{tot} \approx \frac{2 \times 10^{-3} \text{W}}{3 \times 10^8 \text{m/s}} \approx 10^{-11} \text{N} = 10 \text{pN}. \quad (3.6)$$

De fato, as forças típicas obtidas com uma pinça óptica estão na escala de pico-Newton. Como já sabemos a ordem de grandeza da força que atua na pinça óptica. Agora vamos descrever como ocorre a armadilha óptica, com isso vamos mostrar as forças mais importantes que atuam na microesfera.

3.1.1 Pressão de Radiação

A interação entre luz e matéria tem comportamentos distintos pois depende da fonte de excitação e a característica da matéria mas a origem de uma força sobre a matéria pode ser caracterizado pelo campo eletromagnético. Das equações de Maxwell, um campo eletromagnético no vácuo exerce uma força:

$$F_{mec}(r, t) = q [E(r, t) + v(r, t) \times B(r, t)] = \int_V [\rho(r, t)E(r, t) + j(r, t) \times B(r, t)] dV \quad (3.7)$$

Sabendo que a carga q move com velocidade $v(r, t)$, a primeira expressão descreve uma distribuição de cargas, na segunda expressão caracterizar a lei de conservação de carga ou seja a conservação do impulso linear em relação a um volume arbitrário V , temos:

3. Experimento e Aplicação em Condesados

$$\frac{d}{dt} [P_{campo}(r, t) + P_{mec}(r, t)] = \int_V \nabla \cdot T dV \quad (3.8)$$

onde $F_{mec} = \frac{d}{dt} P_{mec}$ e o momento do campo é $P_{campo} = 1/c^2 \int_V [E \times H] dV$. Sabendo que uma partícula obedeça as relações lineares $D = \epsilon E$ e $B = \mu H$, o tensor de tensão Maxwell, T , pode ser escrito como:

$$T = \frac{1}{4\pi} \left[\epsilon\epsilon_0 - \mu\mu_0 HH - \frac{1}{2} (\epsilon\epsilon_0 E^2 - \mu\mu_0 H^2) \delta \right] \quad (3.9)$$

Onde δ é uma função delta de Kronecker. Fazendo a média do período de oscilação podemos observar que o momento é zero e aplicando a lei de integração de Gauss, a força da média temos:

$$\langle F \rangle = \int_V \nabla \cdot T dV = \int_{\delta V} \langle T(r, t) \rangle \cdot n(r) da \quad (3.10)$$

Sabendo que δV é a superfície de V , $n(r)$ é o elemento unitário perpendicular à superfície, e da é um elemento de superfície. Usando o tensor de stress de Maxwell nesta equação, podemos aplicar apenas em partículas rígidas. A pressão de radiação, P , pode ser encontrada através da integração do tensor de tensão de Maxwell em uma superfície plana infinita A , perpendicular à direção do vetor Poynting z :

$$Pn_z = \frac{1}{A} \int_A \langle T(r, t) \rangle \cdot n_z da \quad (3.11)$$

Assumindo uma onda plana incidente ($I_0 = \frac{1}{2} c \epsilon_0 E_0^2$) e interagindo com uma partícula com coeficiente de reflexão complexo R , o campo elétrico fora da partícula pode ser escrito como uma superposição de duas ondas:

$$E(r, t) = E_0 Re [(e^{ikz} + R e^{-ikz}) e^{i\omega t}] n_x \quad (3.12)$$

Usando as equações de Maxwell para o campo magnético:

$$H(r, t) = \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} E_0 Re [(e^{ikz} - R e^{-ikz}) e^{i\omega t}] n_y \quad (3.13)$$

3. Experimento e Aplicação em Condesados

Nestas condições, o tensor de tensão Maxwell reduz para:

$$\langle T(r, t) \rangle \cdot n_z = -\frac{1}{2} \langle \varepsilon_0 E^2 + \mu_0 H^2 \rangle n_z = \frac{\varepsilon_0}{2} E^2 [1 + |R|^2] n_z \quad (3.14)$$

A pressão de radiação sobre a partícula pode ser expressa como:

$$P = \frac{I_0}{c} [1 + |R|^2] \quad (3.15)$$

3.1.2 Força de Gradiente

O feixe de luz incidente em uma partícula cria uma resposta dielétrica, devido à polarizabilidade dos átomos ou íons constituintes com essas condições ocorre o momento de dipolo induzido devido alta intensidade do campo elétrico E , temos:

$$p = \alpha E \quad (3.16)$$

onde $\alpha = \alpha' + i\alpha''$ é a polarização complexa relativa da partícula ao meio circundante. A interação do dipolo induzido com o campo elétrico da luz cria um potencial eletrostático:

$$U = -p \cdot E \quad (3.17)$$

Assim, em um campo de luz com uma intensidade de variação espacial, existe uma força de gradiente:

$$F_{grad} = -\nabla U = -p \cdot \nabla E = -\alpha(E \cdot \nabla)E \quad (3.18)$$

Para uma pequena partícula de raio r_p , isso leva à relação de força:

$$F_{grad} = -\nabla U = -p \cdot \nabla E = -\alpha(E \cdot \nabla)E \quad (3.19)$$

Assim, a força do gradiente é linearmente dependente da variação espacial da intensidade do campo de luz e do contraste dielétrico da partícula a ser preso em

3. Experimento e Aplicação em Condesados

relação à mídia circundante, que pode ser descrita pela relação Clausius-Mossotti. Para partículas com um índice de refração superior ao meio circundante, a força do gradiente atua em direção ao ponto de maior intensidade, ou seja, o ponto focal de um feixe de difração limitado em pinças ópticas. Por outro lado, as partículas com um índice de refração mais baixo podem ser presas no mínimo na intensidade do campo de luz. A força da força de gradiente de restauração em uma armadilha óptica de raio r pode ser caracterizada como uma mola Hookean com rigidez, k , onde a força é linearmente proporcional a pequenos deslocamentos ($d < r/2$):

A figura 3.1 descrevem como se comporta uma microesfera quando a uma interação com a pressão de radiação e as figuras 3.2, 3.3 descrevem como se comporta uma microesfera quando a uma interação com a força dde gradiente

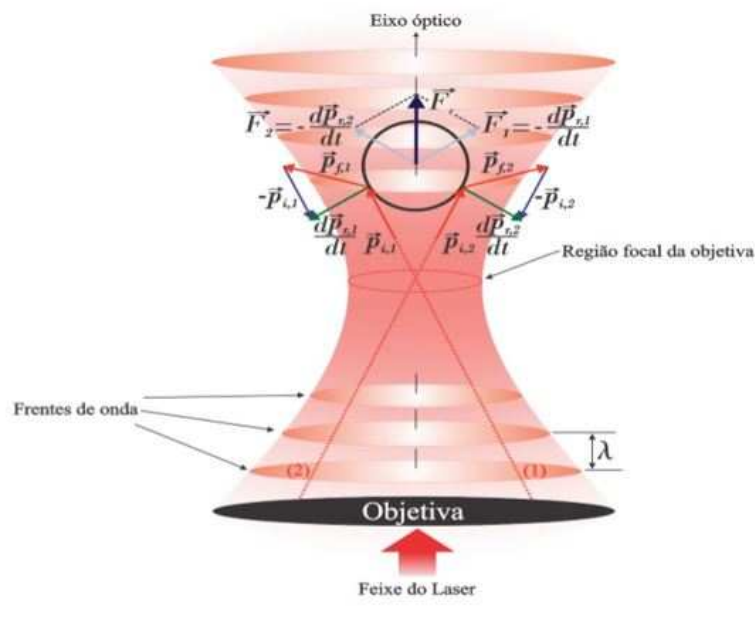


Figura 3.1: Pressão de radiação: A força resultante, nesse caso, empurra a microesfera no sentido de incidência do feixe.[50]

3. Experimento e Aplicação em Condensados

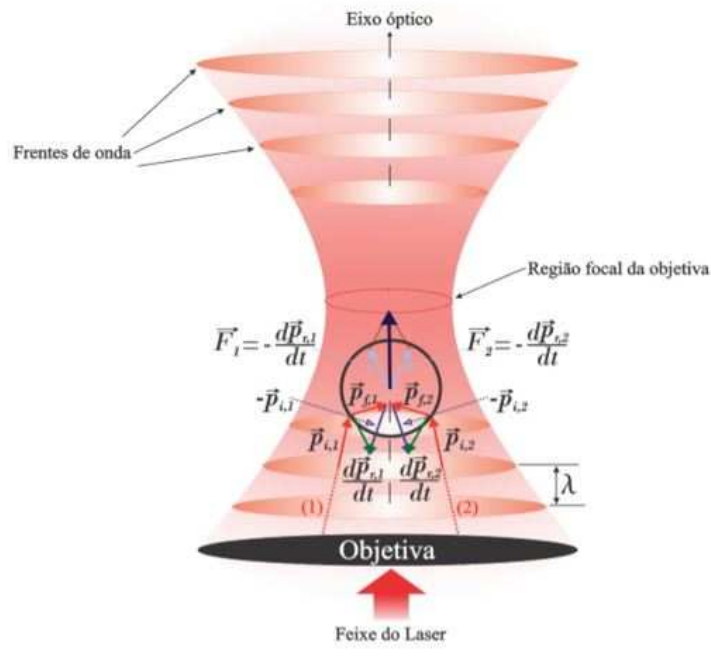


Figura 3.2: Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada abaixo do foco e na metade direita do perfil de intensidades do laser. Observe que a força resultante sobre a microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe.[50]

3. Experimento e Aplicação em Condensados

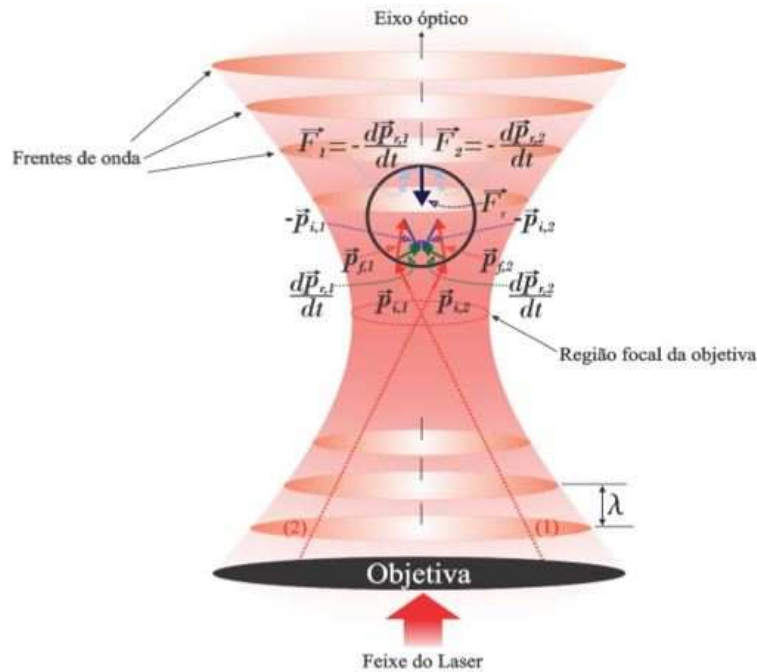


Figura 3.3: Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada acima do foco do laser. Podemos observar que a força total que atua na microesfera tende a deslocar a mesma para a região do foco do feixe.[50]

Em suma, o efeito da refração é deslocar o centro da esfera para o foco do feixe (força de gradiente). Por outro lado, o efeito da reflexão é empurrar a esfera no sentido da incidência do raio (pressão de radiação). A competição desses fenômenos é muito parecido com um cabo de guerra ¹. Contudo toda análise, foi feita sob o ponto de vista da óptica geométrica, e portanto, válida apenas neste limite, que ocorre quando o raio da esfera é muito maior do que o comprimento de onda do laser usado na pinça óptica.

Podemos observar ainda que, ao desenharmos os raios refratados nas Figs. 3.2 e 3.3, estamos supondo que a microesfera possui um índice de refração maior que o do meio que a cerca. De fato, isto é fundamental para que ocorra o pinçamento óptico. É fácil perceber que se o índice de refração da esfera fosse menor que o do meio, o pinçamento não aconteceria.

A competição entre esses dois efeitos, pressão de radiação e força de gradiente

¹Cabo de guerra é uma atividade esportiva na qual duas equipes competem entre si em um teste força e musculação, puxando a corda.

3. Experimento e Aplicação em Condesados

(cabo de guerra), tem que ser vencida pela força de gradiente, ocorrendo isso daremos origem ao fenômeno de pinçamento óptico. Ashkin [1, 2] foi o primeiro a observar este fenômeno, em 1969, nos Estados Unidos. Em um experimento onde visavam estudar o movimento de pequenas microesferas devido à pressão de radiação, ele e colaboradores observaram que as microesferas se alinhavam ao eixo óptico, centro do feixe de laser, onde a intensidade é maior. Tiveram então a idéia de focalizar o feixe de laser usando uma objetiva. Com isso, observaram que as microesferas ficavam presas em uma região próxima ao foco do feixe.

No entanto, quando o raio da esfera é muito menor do que o comprimento de onda do laser, estamos no chamado limite Rayleigh, e esta análise de óptica geométrica não é mais válida. Neste limite, a esfera começa a se comportar como um dipolo elétrico induzido e a força sobre esta é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico associado à onda eletromagnética [48].

3.2 Técnicas experimentais

Nessa seção, descreveremos as técnicas experimentais usadas neste trabalho para medir a constante de força da pinça óptica e a partir dessa medida extrair resultados importantes para caracterizar o condensado.

3.2.1 Montagem experimental

A Figura 3.4 descreve a montagem experimental utilizada para realização das medidas com a pinça óptica. A região entre as linhas pontilhadas representa o microscópio Nikon Eclipse T *i-s*, com óptica corrigida no infinito, objetiva de 100X e abertura numérica ¹ N A = 1,4.

A objetiva, possui uma alta abertura numérica, e ela tem a função de focalizar o feixe de laser infravermelho e prender as microesferas na região focal. A radiação é emitida por um laser infravermelho (IV), modelo IPG Photonics YLR-5-1064-LP, com

¹A abertura numérica é um parâmetro fornecido pelo fabricante da lente e, quanto maior o seu valor, maior será a abertura do cone de luz focalizado e, conseqüentemente, mais forte será a força de gradiente, responsável pelo pinçamento óptico.

3. Experimento e Aplicação em Condesados

potência máxima de 6,0 W, $\lambda = 1064$ nm e operando no modo TEM₀₀. E₁, E₂, E₃ e E₄ são espelhos, onde E₁ e E₂ permitem uma precisão maior no alinhamento da pinça óptica, E₃ é um espelho dicróico e E₄ permite que o laser chegue até a outra saída do microscópio. F₁ representa uma associação de filtros que permite controlar o valor da constante de força κ , da pinça óptica e, conseqüentemente, o módulo da força óptica aplicada.

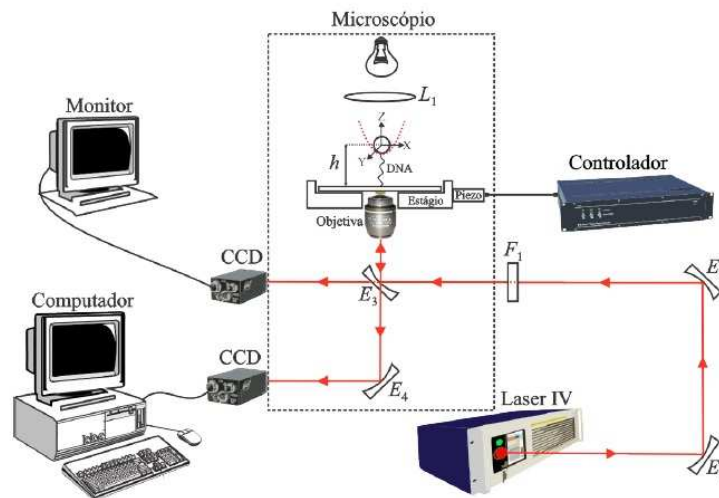


Figura 3.4: Montagem experimental utilizada para as medidas .[50]

O motor piezoelétrico, representado na Figura 3.4, é o responsável por deslocar. O estágio do microscópio e, conseqüentemente, a lamínula com precisão nanométrica. A lente L₁, representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio. Abaixo da lente L₁ está representado o poço de potencial gerado pela pinça óptica, o sistema de referência utilizado e a nossa solução de DNA e microesferas.

Note que estamos representando a situação na qual uma das pontas da molécula de DNA se encontra adsorvida na microesfera e a outra ponta adsorvida na lamínula, que é o nosso porta amostras. A altura h representa a distância do centro de massa da microesfera pinçada em relação à lamínula. Finalmente, nas duas saídas do microscópio são conectadas duas câmeras CCD, modelos Jai BM-500GE e Jai CV-A50IR, que enviam as imagens até o monitor e ao computador, permitindo assim que todo o experimento seja monitorado.

3. Experimento e Aplicação em Condesados

3.2.2 Calibração da Pinça Óptica

A teoria de calibração de pinça óptica é uma linha de pesquisa ativa nessa subsecção vamos descrever um procedimento clássico de calibração, conhecido como método de Stokes que é usado no nosso laboratório e consiste em deslocar a lamínula do microscópio com velocidade \vec{v} constante e medir a nova posição de equilíbrio da microesfera.

A microesfera é presa no poço de potencial gerado pela da pinça óptica é um oscilador harmônico Browniano, devido ao movimento dentro deste poço de potencial, que é harmônico para pequenos deslocamentos em relação à posição de equilíbrio a figura 3.5 descreve como se comporta a microesfera no poço de potencial.

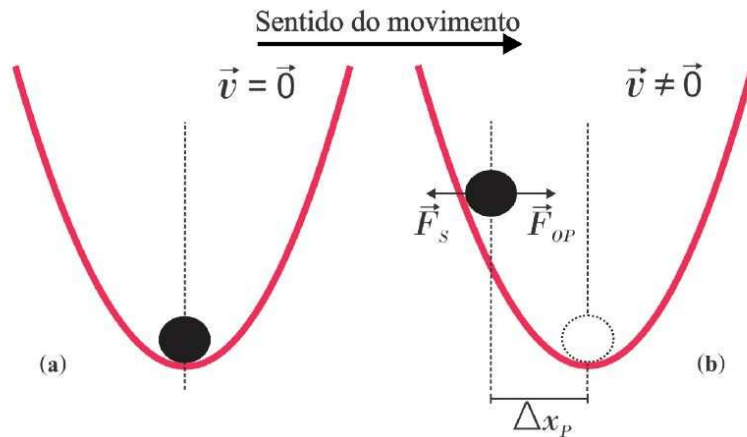


Figura 3.5: (a) Temos a microesfera aprisionada na posição de equilíbrio no poço de potencial. (b) Com acionarmos do piezoelétrico, a microesfera é empurrada pelo fluido e fica em equilíbrio em uma nova posição no poço de potencial. Nessa posição, a força de Stokes, \vec{F}_S e, é igual, em módulo, à força óptica, \vec{F}_{OP} . [50]

A Figura 3.5 (a) descreve uma situação na qual a microesfera se encontra em repouso no ponto de equilíbrio no poço de potencial. Nesse caso, como o piezo que movimenta a lamínula está em repouso, então a velocidade média, \vec{v} da microesfera é nula e, conseqüentemente, a força de Stokes média também é nula. Como já mencionado a microesfera presa no poço de potencial da pinça óptica se comporta como um oscilador harmônico browniano, estando sujeito à força óptica restauradora e a força aleatória devido à interação com o fluido. A Figura 3.5(b), mostra a situação na qual

3. Experimento e Aplicação em Condesados

a lamínula se movimenta com uma velocidade constante, \vec{v} , movimentando fluido no qual as microesferas estão imersas.

Esse deslocamento do fluido origina uma força de atrito, chamada de força de Stokes, que faz com que a microesfera atinja uma nova posição de equilíbrio dentro do poço de potencial. Nessa nova posição de equilíbrio a força de Stokes tem o mesmo módulo, à força óptica gerada pelo laser. A força de Stokes pode ser escrita como:

$$\vec{F}_S = -\gamma\vec{v} \quad (3.20)$$

Onde γ é o coeficiente de atrito viscoso e \vec{v} é a velocidade. O coeficiente de atrito viscoso sobre uma microesfera em solução aquosa é dada pela expressão aproximada [53].

$$\gamma = \gamma_0 \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 \right]^{-1}, \quad (3.21)$$

onde a é o raio da microesfera, h é a distância de seu centro em relação à lâmina, e

$$\gamma_0 = 6\pi\eta_a a, \quad (3.22)$$

onde η_a é a viscosidade da água (meio onde as microesferas se encontram).

A viscosidade de um material depende fortemente da temperatura. Podemos determinar o valor da viscosidade da água como função da temperatura usando a equação empírica [54]

$$\eta_a = 10^{-3} \left[0,26 + 1,51 \exp \left(\frac{-t_c}{29} \right) \right], \quad (3.23)$$

onde t_c é a temperatura em graus Celsius e a viscosidade neste caso é encontrada na unidade Pa.s. Na nova posição de equilíbrio, mostrada na Figura 3.5 (b), podemos escrever que, em módulo, $\vec{F}_{OP} = \vec{F}_s$, ou seja,

$$\kappa\Delta_{xp} = \gamma\vec{v}. \quad (3.24)$$

3. Experimento e Aplicação em Condesados

Isolando Δ_{xp} , temos que

$$\Delta_{xp} = \frac{\gamma}{\kappa_x} \vec{v}. \quad (3.25)$$

Sabendo o valor da temperatura, a equação 3.23 é utilizada para descobrir o valor da viscosidade. O valor do raio da microesfera já vem informado pelo fabricante é $1,5 \mu\text{m}$. A altura h é encontrada deslocando-se o foco do microscópio onde, inicialmente, focalizamos o fundo da lamínula e, na sequência, ajustamos o foco do microscópio até a altura h desejada.

Por último, essa altura h é multiplicada pelo índice de refração relativo da água e do vidro, o que fornece o valor real da altura do centro da microesfera em relação à lamínula. Para descobrir o valor de Δ_{xp} , todo o experimento é filmado utilizando-se o programa StreamPix, que faz a captura das imagens formando um vídeo. Vamos dividir o procedimento em duas partes. A primeira iniciamos uma gravação com a microesfera em repouso dentro do poço de potencial gerado pela pinça.

Iniciamos o vídeo com a microesfera parada dentro do poço de potencial da pinça, afim de encontrar a posição do centro de massa da microesfera quando ela se encontra como mostrado na Figura 3.5 (a), após aproximadamente 5 segundos, o piezo que movimentava a lamínula é acionado com uma determinada velocidade e a microesfera atinge a nova posição de equilíbrio, como mostrado na Figura 3.5 (b). Utilizando o programa ImageJ, que fornece os valores do centróide da microesfera em função do tempo, é possível determinar o valor de Δ_{xp} . Todo esse procedimento é repetido para diferentes valores da velocidade do piezo que desloca a lamínula. A Figura 3.6 mostra o gráfico obtido para o Δ_{xp} em função da velocidade v do piezo, conforme o procedimento descrito acima.

A equação 3.25 foi, então, utilizada para ajustar os pontos experimentais da Figura 3.6. Como a equação (2.11) é afim, ou seja um ajuste linear e o coeficiente angular obtido pela relação $\frac{\gamma}{\kappa}$, onde é calculado através da equação 3.21. Em nossos experimentos, a constante de força obtida foi de aproximadamente $3,5 \text{ pN}/\mu\text{m}$, que faz com que a faixa de forças aplicadas ao DNA, durante todo o estiramento da molécula, esteja dentro do regime entrópico. De fato, essa faixa de forças gera grandes vantagens

3. Experimento e Aplicação em Condesados

no nosso caso, entre as quais podemos citar: O modelo WLC, de Marko e Siggia, utilizado para ajustar os gráficos de força x extensão, só pode ser utilizado no regime de baixas forças (< 5 pN), que é chamado regime entrópico, logo, é esperado que tal equação descreva melhor os experimentos realizados no limite de baixas forças.

O equilíbrio químico entre a molécula de DNA e os compostos não é consideravelmente alterado nesse regime de forças [55, 56]. É bem estabelecido, hoje em dia, que no regime entálpico (altas forças) podem modificar o equilíbrio químico entre a molécula de DNA e os fármacos em solução. De fato, recentemente Vladescu et al. Mostraram que importantes parâmetros de interação dependem fortemente das forças aplicadas aos complexos DNA - fármacos [55] e, portanto, é esperado que algumas propriedades mecânicas desses complexos, como por exemplo, o comprimento de persistência, A , e de contorno, L , sejam também dependentes do regime de forças empregado, uma vez que elas dependem da quantidade de fármacos ligado ao DNA.

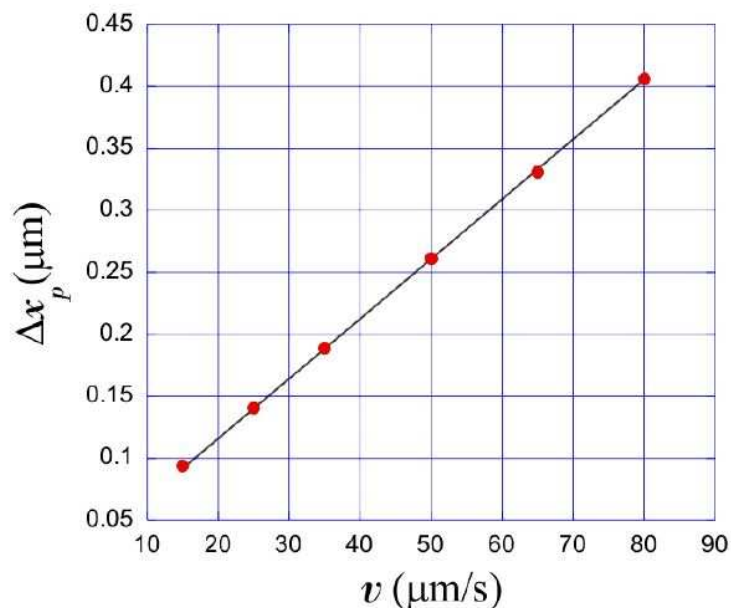


Figura 3.6: Gráfico descreve o processo de calibração da pinça óptica via método de Stokes. Círculos vermelhos: dados experimentais; Linha sólida: ajuste feito utilizando-se a equação 3.23.[50]

Capítulo 4

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

Nesse capítulo vamos descrever os procedimentos experimentais na preparação da e caracterizar o condensado DNA-BSA e mostrando a influência do agente condensante na interação DNA e a Doxorrubicina.

4.1 Doxorrubicina

A doxorrubicina é um antibiotico, da familia das antraciclínicas. O composto é usado extensamente na prática clínica e tem a função antineoplástica significativa frente a diversos tipos de neoplasias incluindo a leuemia e o câncer de mama [86].

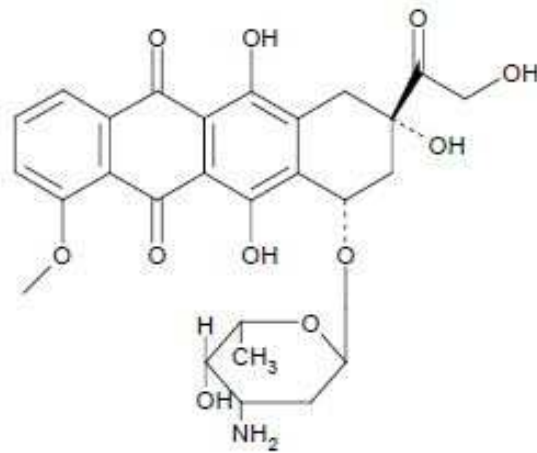


Figura 4.1: Estrutura química da Doxorrubicina.

Na prática clínica a doxo é administrada geralmente em doses de 60 a 90 mg/m² BSA a cada três semanas [86]. Os antibióticos atuam no ciclo inibindo a síntese do DNA por interação, impedindo a duplicação celular.

A doxo é utilizada em associação com outros fármacos em diversos tratamentos antineoplásicos sendo de grande eficiência para alguns tratamentos de Câncer. Por isso o motivo de utilizar este fármaco nesta tese, pois já bem caracterizado na literatura

4.2 Tipos de Condensados

Descrevemos no capítulo 1 como se comporta a dinâmica da cromatina, nesse capítulo vamos dar ênfase em alguns agentes condensantes que induzem a compactação desempenhando um papel análogo aos das histonas [17, 21]. A condensação de DNA é um processo em que a molécula de DNA se torna altamente compactada e dependendo como ocorre o processo de condensação o DNA pode apresentar morfologias distintas como um toróide ou uma haste [59, 60, 61]. Nesse processo, a cadeia de DNA que é semi flexível se transforma em estrutura altamente densa e ordenada, com uma redução drástica no volume.

In vitro, a condensação do DNA pode ser geralmente alcançada usando moléculas catiônicas com carga igual ou superior para +3 [62, 63] (condensação induzida por

cátions) ou polímeros neutro [64] tais como Poli(etileno glicol) o (PEG) (condensação *psi*).

No primeiro caso, os ligantes catiônicos se ligam a dupla hélice do DNA promovendo uma atração entre os segmentos ocorrendo que resulta na condensação da molécula de DNA [65]. No segundo caso, os agentes de condensantes não se ligam à dupla hélice, e o processo de condensação é promovido pelas interações de depleção entre os segmentos de DNA e o polímero neutro [66]. Os condensados obtidos dessa maneira atraíram a atenção de físicos e biólogos nas últimas décadas, uma vez que se parecem muito com os encontrados em alguns vírus [67].

O processo de compactação e descompactação são estudados por vários grupos de pesquisas no mundo [34, 17, 20], existe abundante literatura sobre a espectroscopia de força de condensados de DNA induzidos por cátions sob várias condições de solução, com essas informações podemos ter acesso algumas características dos aspectos morfológicos dos condensados, aspectos termodinâmicos envolvidos etc e o formato de seus desempacotamento e etc [66, 68, 69].

Por outro lado, poucos trabalhos experimentais têm se concentrado na mecânica da condensação de DNA induzida por depleção em um ambiente lotado [70, 71, 72]. Mais recentemente, simulações de dinâmica de Langevin foram usadas para estudar os detalhes envolvidos na compactação e descompactação do DNA, onde os condensados tem uma morfologia parecida com um toróide e uma haste [73, 74].

Para preencher esta lacuna do lado experimental, medimos a curva força-extensão dos condensados de DNA induzidos pela proteína BSA, a nível de molécula única, utilizando pinças ópticas para realizar a Espectroscopia de força.

O aspecto da condensação de DNA induzida pela BSA observada inicialmente por Yoshikawa et al1 [34] descreveu características da morfologia dos níveis de compactação do DNA em função da concentração de BSA e NaCl e em 2015 o Cortini descreve por calculo numérico e analíticos as condições necessárias em níveis termodinâmicos para ocorrer uma compactação com uma morfologia tipo haste ou toróide[75, 74].

4.3 Desenvolvimento do suporte da amostra e preparação da Solução DNA-microesferas

Nessa seção, vamos descrever o processo de desenvolvimento para a construção do suporte das amostras e a preparação da solução DNA-microesferas utilizada em todos os experimentos apresentados nesse trabalho.

4.3.1 Preparação das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho consistem em uma solução aquosa de PBS (do termo em inglês (Phosphate Buffer Saline) com uma concentração de NaCl = 125 mM, além das microesferas de poliestireno com um diâmetro de 3,0 μm recobertas com estreptavidina e o DNA biotilado. Utilizamos o protocolo disponível na referência [77].

4.3.2 Construção do suporte da amostra

O nosso suporte é composto de uma lamínula (Corning) com uma espessura de aproximadamente 0,15 mm, além de um aro de borracha do tipo O-ring com um diâmetro de 0,7 cm. Utilizando-se um aquecedor, derretemos parafina para colar o O-ring na lamínula da Corning. A região definida pelo O-ring é recoberta com uma camada de estreptavidina, para que a biotina presente nas pontas da molécula de DNA possa se ligar. A seguir, descrevemos esse método:

I) Depois que o O-ring estiver fixo na lamínula colocamos 25 μL de BSA biotilada preparada no solvente em que chamamos com alcunha de tampão A ¹, com uma concentração de 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e aguardamos aproximadamente 20 minutos para área seja totalmente recoberta.

II) Passados os 20 minutos, todo o excesso de BSA biotilada é retirado e a amostra recebe uma camada de tampão A, que serve para limpar a amostra.

¹O solvente, que denominamos tampão A, consiste de uma solução previamente preparada com 10 mM de MgCl_2 , 40 mM de KCl, e 25 mM de Tris HCl em pH 8,0.

III) Em seguida inserimos 30 μL de estreptavidina preparada no tampão A, com uma concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e aguardamos, novamente, mais 20 minutos aproximadamente, para que a área fosse totalmente preenchida.

4.3.3 Preparação da solução DNA com microesferas

Sabendo que a biotina é uma vitamina do complexo B e a estreptavidina é uma proteína e que ambas possuem uma alta afinidade química. Utilizando a pinça óptica para manipular a microesfera é possível então, realizar os estiramentos da molécula de DNA. De forma conjunta à preparação do porta amostras, realizamos também a preparação da solução contendo o DNA e as microesferas de poliestireno recobertas com estreptavidina. Para isso, seguimos a seguinte ordem de passos:

I) Em um microtubo do tipo eppendorf, acrescentamos 20 μL de PBS 7,4 que é o solvente utilizado na preparação de todas as concentrações do fármaco, além de 3 μL de microesferas de poliestireno recobertas com estreptavidina e 4 μL de DNA biotilado. O eppendorf é então levado ao banho térmico a uma temperatura de 37°C e o tempo de incubação é aproximadamente 60 minutos.

II) Terminando o tempo de incubação, acrescentamos 73 μL de PBS 7,4 para que a solução contenha um volume total de 100 μL e aguardamos aproximadamente 20 minutos para a homogeneização da solução de DNA e microesferas.

III) Em seguida, colocamos a amostra no suporte que já está no microscópico esperamos tira 10 minutos aproximadamente, e iniciamos a procura de um DNA que esteja em condições experimentais adequadas para realizarmos as medidas.

Sabemos que é possível encontrar em nossa amostra várias configurações, dentre as quais podemos citar: DNA biotilado isolado, microesferas de poliestireno aderidas à lamínula, moléculas de estreptavidina, BSA e biotina isoladas em solução, DNA com uma ponta aderida à microesfera mas com a outra ponta solta, além da situação que realmente nos interessa que é uma ponta do DNA biotilado adsorvido na microesfera de poliestireno recoberta com estreptavidina e a outra ponta adsorvida na lamínula de vidro recoberta com estreptavidina.

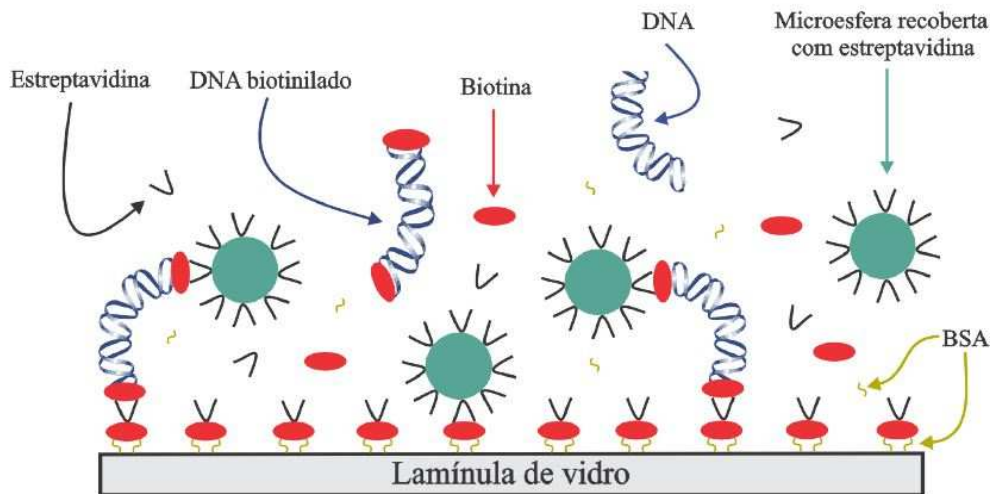


Figura 4.2: Situações possíveis para o DNA, as microesferas de poliestireno e do conjunto DNA-microesferas em nossa amostra.[50]

Inicialmente, procuramos as microesferas que executam movimento browniano, ou seja, aquelas microesferas que não estão aderidas à lamínula. Utilizando-se os deslocadores piezoelétricos acoplados ao microscópio óptico, na microesfera é puxada com a pinça óptica e obtemos duas situações:

I) A microesfera permanece durante todo o deslocamento dentro do poço de potencial da pinça e, conseqüentemente, não há DNA colado a microesfera.

II) Após um certo tempo, a microesfera escapa do poço de potencial da pinça e esse é um forte indício que há DNA colado tanto na microesfera quanto na lamínula.

É importante dá ênfase que não é possível visualizar o DNA via microscopia óptica e, dessa forma, a procura pelo DNA é dita indireta. Mesmo após a configuração desejada ser encontrada, é importante verificar se não há mais de um DNA colado à microesfera. Isso pode ser feito esticando o DNA em dois sentidos opostos (+x e -x, por exemplo) e verificando que o tempo que a microesfera demora para escapar do poço de potencial da pinça óptica seja aproximadamente o mesmo nos dois sentidos. Obviamente, isso não garante que haja apenas um único DNA colado à microesfera, mas é um forte indício.

4.3.4 O DNA do fago λ

Em nossos experimentos utilizamos o fago λ , que é um DNA extraído de um vírus que infecta a bactéria *E. coli*. Este DNA é ideal para os experimentos de estiramento, devido ao seu tamanho que é compatível com as limitações do pinçamento óptico. Uma molécula de λ DNA possui aproximadamente 48.500 pares de base, o que resulta em um comprimento de contorno médio de $16,5 \mu\text{m}$. Comparando com o DNA humano, este possui da ordem de 3,4 bilhões de pares de base, com um comprimento de contorno médio da ordem de 1 m.

4.3.5 Estiramento da molécula de DNA

Encontrando DNA com a microesfera em uma condição experimental desejada iniciamos o processo de estiramento do DNA, antes do estiramento devemos encontrar a situação de equilíbrio da microesfera dentro do poço de potencial uma vez obtida a posição de equilíbrio da microesfera, a pinça óptica é então utilizada para capturá-la.

O piezoelétrico que está acoplado ao estágio do microscópio é iniciado e a filmagem do experimento é iniciada simultaneamente. O estágio se locomove com velocidade constante de $0,1 \mu\text{m/s}$ a figura 4.3 mostra um esquema dos estiramentos da molécula de DNA. A altura h da microesfera é mantida aproximadamente $4,0 \mu\text{m}$ enquanto o estágio do microscópio se desloca com velocidade constante. Sabendo que a velocidade é muito baixa, podemos desprezar a força de Stokes que atua sobre a microesfera e considerar que o experimento é realizado em um regime quase-estático, de forma que a força que o DNA exerce sobre a microesfera é, em módulo, igual a força que a pinça óptica exerce sobre a mesma. A molécula de DNA é então esticada, até que ela escape do poço de potencial da pinça óptica.

Quando isso acontece, esperamos novamente o DNA retornar a sua posição de equilíbrio e todo o procedimento descrito acima é repetido. As repetições são de extrema importância pois conseguimos extrair uma média do experimento. Para encontrar a força que o DNA exerce sobre a microesfera, todo o experimento é filmado com uma câmera CCD (detalhes podem ser encontrados na Figura 4.4 e com isso pode-

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

mos determinar a posição do centro de massa da microesfera em função do tempo, $x(t)$. Portanto, conhecendo-se a posição inicial da microesfera, $x(0)$, quando esta encontra-se no fundo do poço de potencial da pinça óptica, podemos calcular a mudança da posição da microesfera, em função do tempo, dada por:

$$\Delta x(t) = x(t) - x(0) . \quad (4.1)$$

A figura abaixo descreve a amostra

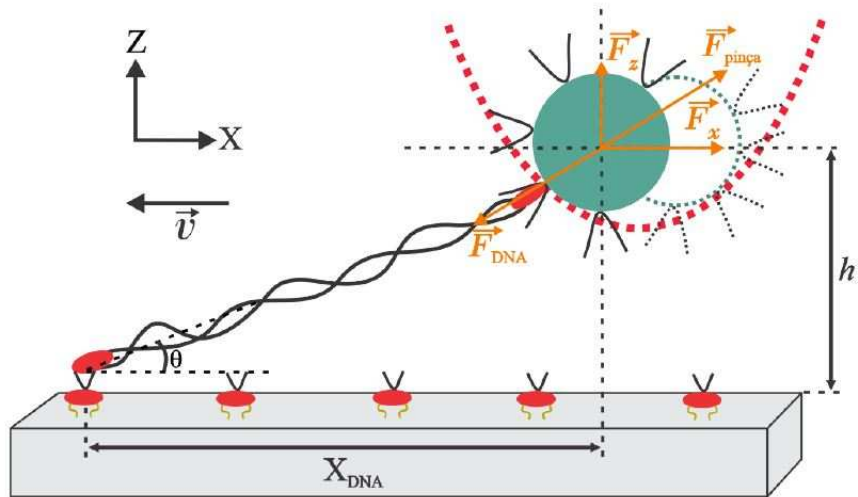


Figura 4.3: Esquema da realização dos estiramentos da molécula de DNA em um regime quase-estático. São mostradas duas posições da microesfera em instantes de tempo distintos, evidenciando o seu deslocamento dentro do poço de potencial gerado pela pinça óptica.

A força que o DNA exerce sobre a microesfera², em função do tempo, é dada por

$$F(t) = \kappa \Delta x(t) , \quad (4.2)$$

²Repare que esta força é igual a força óptica gerada pela pinça quando a microesfera se desloca dentro do poço de potencial da pinça. No entanto, conforme já discutimos acima, esta força é igual, em módulo, à força que a molécula de DNA exerce sobre a microesfera, visto que o experimento é realizado em um regime quase - estático.

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

onde κ é a constante de força da pinça óptica.

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

A Figura 4.4 mostra a curva típica obtida com esse procedimento, além do ajuste feito utilizando o modelo WLC[10]. Desse ajuste, obtivemos o comprimento de contorno L e o comprimento de persistência A da molécula de DNA.

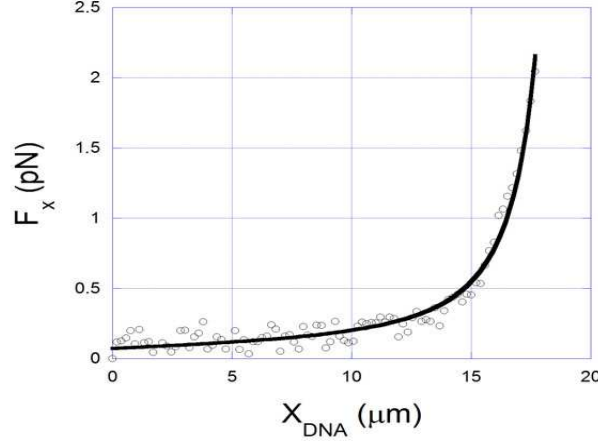


Figura 4.4: Curva típica da componente x da força x extensão do DNA. O ajuste é feito utilizando a equação WLC onde já discutimos no capítulo anterior deste trabalho.

Onde a expressão de Marko e Siggia é representado pela equação equação a seguir:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (4.3)$$

temos que k_B é a constante de Boltzmann, temos T como temperatura absoluta, A comprimento de persistência, L o comprimento de contorno e z a extensão da molécula de DNA.

A equação 4.3, apesar de ser válida para estiramentos arbitrários, possui ainda algumas limitações, por ser tratar de uma aproximação. Repare que a equação diverge quando fazemos $z = L$, portanto, sua validade vai até $z \sim 0,99L$ [10]. Além disso, a equação é válida somente quando as forças aplicadas não são suficientes para deformar as ligações químicas entre os nucleotídeos, no chamado limite entrópico.

4.3.6 Inserindo a proteína/fármaco na amostra

Uma vez terminado a série de estiramentos da molécula de DNA, devemos inserir o fármaco/proteína (dependendo da sequência do experimento) na amostra. As alíquotas contendo o fármaco/proteína foram inseridas diretamente na amostra, introduzindo a micropipeta no porta-amostras contendo a solução de DNA-microesferas. A Figura 4.5 ilustra esse procedimento.

Para realização da primeira parte desse trabalho fui utilizada a BSA produzida pela Sigma- Aldrich. No início dos experimentos variamos a concentração de Doxorubicina essa variação foi do intervalos de $20\mu\text{M}$ a $120\mu\text{M}$, em seguida inserimos uma concentração de BSA 20% em massa para compactar o DNA onde essa concentração foi diluída em solução 7.4. Na segunda parte do trabalho fizemos a sequência oposta ou seja inserimos primeiro a proteína e em seguida as concentrações de Doxorubicina, realizamos esse procedimento para termos certeza da eficácia da compactação e visualizar alguma mudança no padrão dos parâmetros mecânicos.

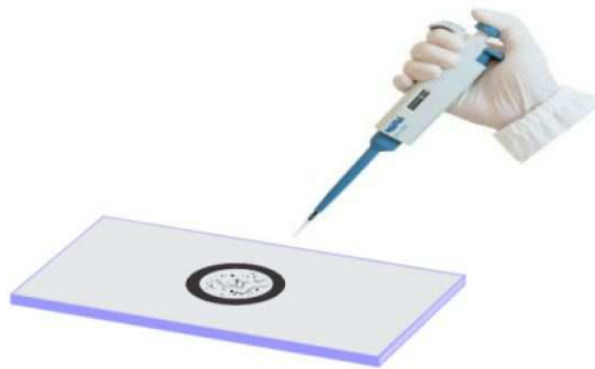


Figura 4.5: Ilustração do procedimento usado para a troca das alíquotas.

4.4 Interação DNA-BSA

Em nosso trabalho foi caracterizado pela primeira vez o processo de condensação do DNA induzida por BSA a nível molecular, utilizando pinçamento óptico para realizar espectroscopia de força. Procedimento experimental pra realizações desse experimento

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

está descrito [50, 78]. Usamos λ DNA que possui (48.500 pares de bases, e comprimento de contorno $16,5\mu\text{m}$) em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) com $[\text{NaCl}] = 125 \text{ mM}$. A figura abaixo ilustra a interação DNA-BSA e Doxorrubicina.

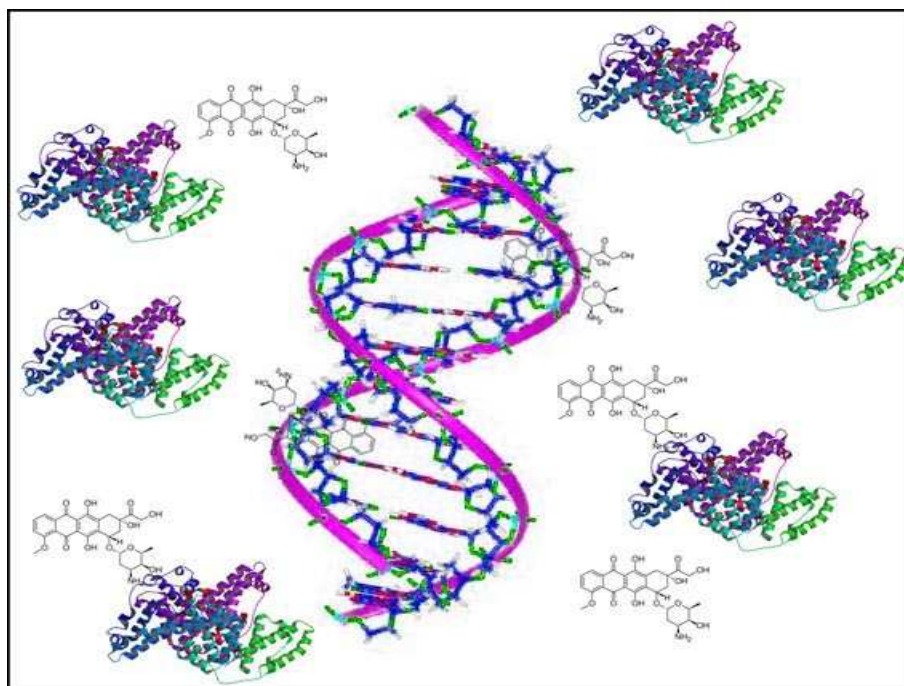


Figura 4.6: Interação DNA-BSA e Doxorrubicina

Antes de realizarmos os experimentos para analisarmos as interações entre DNA-BSA com fármaco, comparamos a proteína BSA em relação a outros agentes condensantes já conhecidos na literatura como na Figura 4.7, que mostra uma comparação entre as curvas força por extensão obtidos para três tipos de agentes condensantes de DNA.

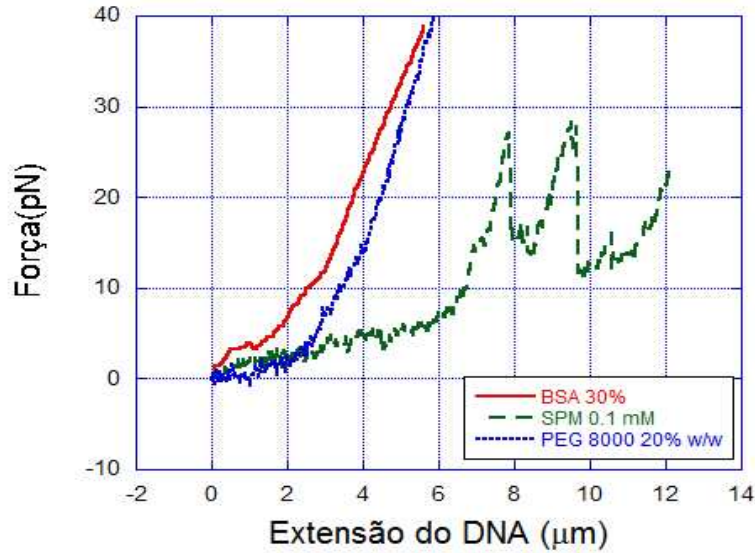


Figura 4.7: Curvas de força por extensão obtidos para três diferentes tipos de condensados de DNA: condensados induzidos por BSA, obtida com $C_{BSA} = 30\%$ (linha sólida vermelha), condensação do DNA induzida por cátions promovidas pela amina tetravalente espermina (SPM) em 0.1 mM (linha tracejada verde) e condensados de DNA promovido pelo polímero neutro polietileno-glicol (PEG) 8000 a 20% em massa (linha tracejada azul).

A Figura 4.7 descreve o comportamento dos agentes condensantes quando interagem com DNA, os resultados apresentados para espermina (SPM) e polietileno-glicol (PEG) foram previamente obtidos na referência [66]. Ambos os tipos de condensados foram obtidos em PBS, com $[NaCl] = 150$ mM para o PEG e 10 mM e para SPM. A baixa concentração de sal deve ser usada no caso de condensados de SPM, a fim de maximizar efeitos de condensação do DNA induzida pelos cátions. Podemos observar que o condensado induzido pela espermina nos fornece um padrão dente de serra que é uma característica da condensação induzida por cátions [79, 66, 68]. O padrão dente de serra não é observado nos condensados de DNA induzidos pelo PEG e a BSA porque a interação entre o polímero e o DNA ocorre geralmente por força de depleção.

Realizamos medidas para baixas e altas forças com finalidade de obtermos infor-

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

mações sobre a natureza da interação DNA-BSA. Na Figura 4.8 temos curvas típicas de força por extensão obtidas no regime de altas forças, para algumas concentrações de BSA.

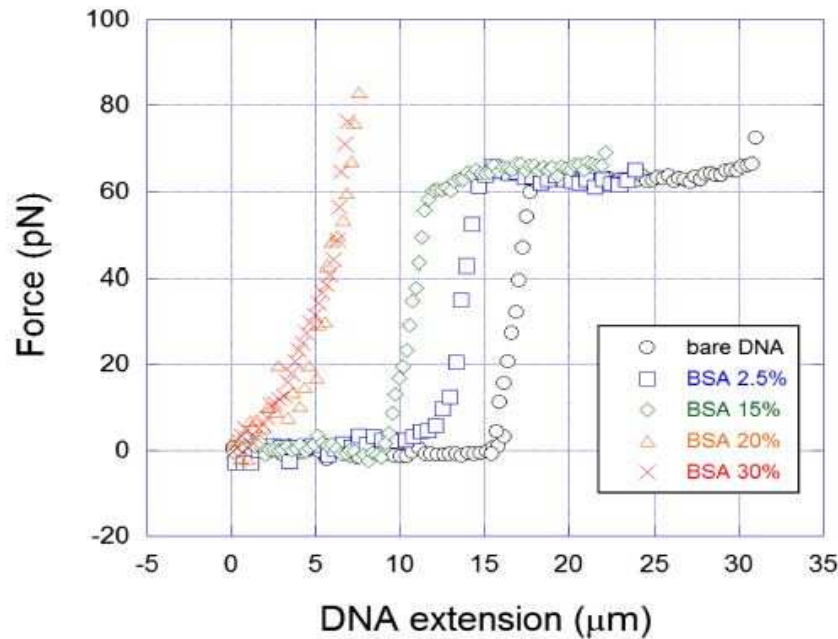


Figura 4.8: Curvas de força por extensão obtido no regime entálpico (altas forças) o λ -DNA encontra-se em PBS com $[\text{NaCl}] = 125 \text{ mM}$ e várias concentrações de BSA. O DNA puro está representado pela cor preta $C_{BSA} = 0\%$; e as concentrações de BSA, em azul $C_{BSA} = 2,5\%$ em massa; em verde $C_{BSA} = 15\%$ em massa; em vermelho $C_{BSA} = 30\%$ em massa; em laranja $C_{BSA} = 45\%$ em massa.

Observa-se que a curva correspondente ao DNA puro ($C_{BSA} = 0\%$) exibe o platô de desnaturalização bem caracterizado, promovido por forças de estiramento de aproximadamente 65 pN. Podemos observar que o platô de desnaturalização desaparece de forma gradual à medida que a concentração de BSA é aumentada, o que indica que a presença de BSA inibe o aparecimento do platô de desnaturalização na molécula de DNA, pelo menos para as forças $< 80 \text{ pN}$.

Este resultado está relacionado com o fato de que para estirar totalmente a molécula de DNA é preciso realizar um trabalho contra a pressão osmótica, no caso de

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

condensação do DNA induzida por força de depleção. Esta informação tem implicações biológicas importantes, pois a BSA induz um aumento da pressão osmótica no sistema, que se assemelha às condições intracelulares de alguns seres vivos. Com isso podemos modular processos intracelulares, tais como a transcrição e a replicação do DNA, uma vez que a estrutura de dupla hélice deve ser aberta em tais processos. Com o propósito de determinar com precisão os valores dos comprimentos de persistência e contorno aparente com uma força na escala intracelular [79], realizamos estiramentos no regime entrópico com a molécula de DNA, onde a molécula estava compactada devido a interação com a proteína. A Figura 4.9 mostra curva força por extensão do DNA variando a concentração de BSA.

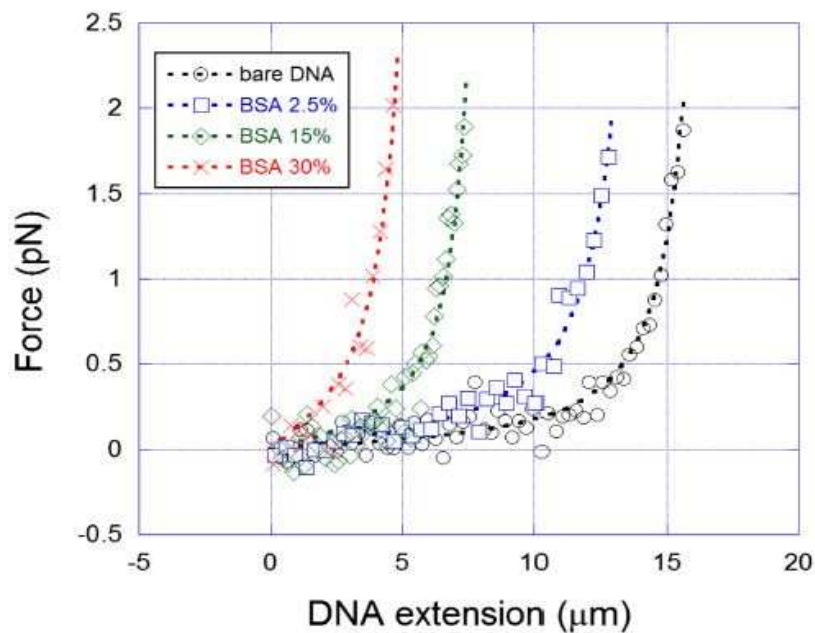


Figura 4.9: Curvas força por extensão são obtidos no regime entrópico (baixas forças), as curvas estão relacionadas com variação de concentração de BSA. O DNA puro está representado pela cor preta $C_{BSA} = 0\%$; e as concentrações de BSA, azul: $C_{BSA} = 2,5\%$ em massa; verde $C_{BSA} = 15\%$ em massa; vermelho $C_{BSA} = 30\%$ em massa; roxo $C_{BSA} = 45\%$ em massa.

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

As Figuras 4.10 e 4.11 descrevem o comportamento do comprimento de contorno aparente e de persistência em função da variação da concentração de BSA.

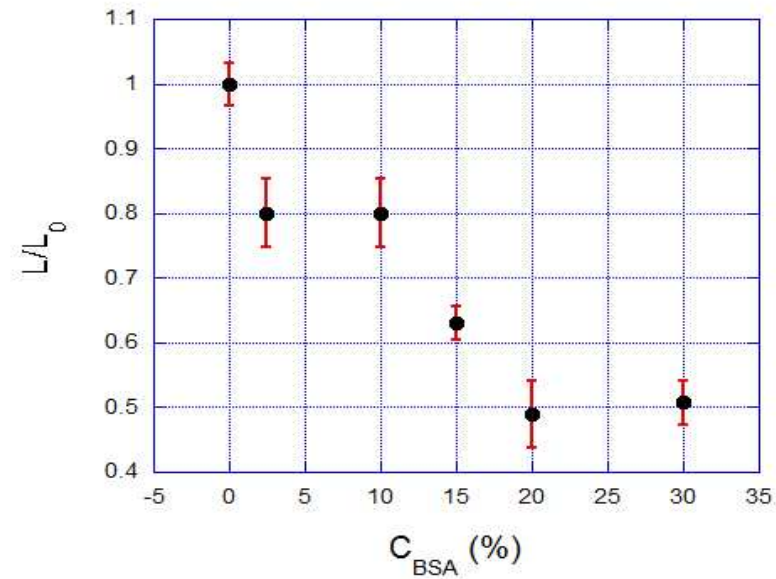


Figura 4.10: Comportamento do comprimento de contorno aparente pela variação da concentração de BSA.

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

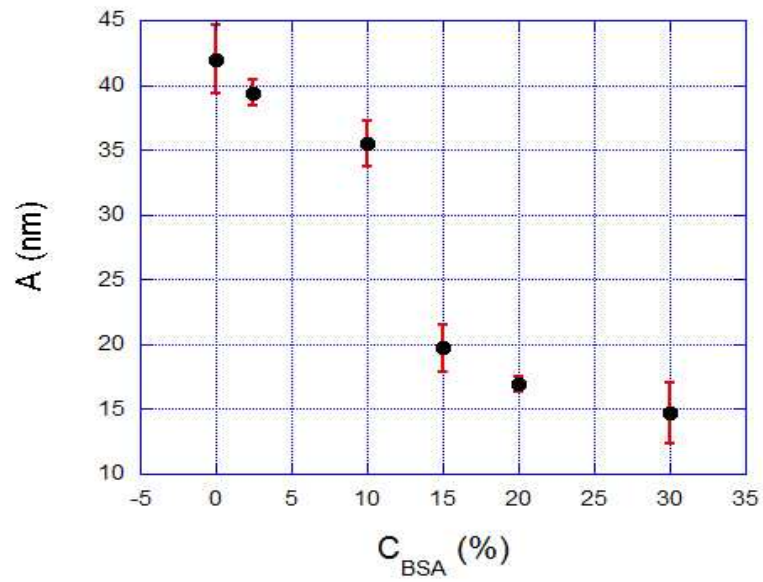


Figura 4.11: Comportamento do comprimento de persistência pela variação da concentração de BSA.

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

Podemos observar que mesmo em concentrações muito pequenas de BSA (2,5% em massa) foi detectada uma diminuição significativa no comprimento do contorno aparente e do comprimento de persistência do DNA, indicando que a proteína já causa compactações na molécula de DNA. Essas compactações aumentam até as concentrações de 20-30% de BSA, onde se atinge o máximo grau de condensação, caracterizado pelo menor comprimento de contorno aparente.

Durante o experimento tivemos o cuidado de analisar se a BSA com DNA estava em equilíbrio químico. Isso foi verificado analisando as curvas de força por extensão, onde não foi observada nenhuma curva de histerese nas curvas de forças quando os complexos de DNA -BSA eram esticados e relaxados, o que fortalece o argumento que os complexos estavam em equilíbrio. Uma observação importante sobre a realização do experimento é que durante o estiramento da molécula de DNA, existe uma realização de trabalho, devido o pinçamento óptico,[75] podemos expressar o trabalho realizado pela equação abaixo:

$$W = \Pi_{osm} V_0 \quad (4.4)$$

Sendo Π_{osm} a pressão osmótica da solução e V_0 o volume de sobreposição do condensado.

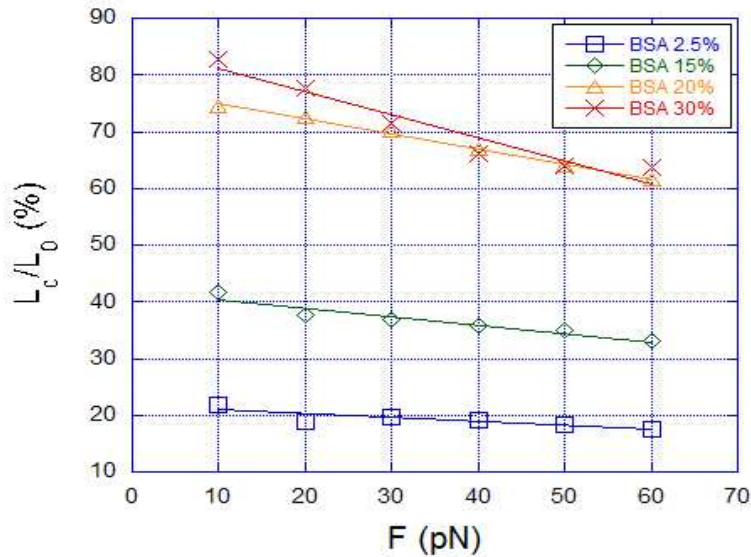


Figura 4.12: Relação do comprimento de contorno condensado pelo comprimento de contorno L_c/L_0 (%) em função da força F (pN), o λ -DNA está em PBS com $[\text{NaCl}] = 125$ mM e várias concentrações de BSA. Azul: $C_{BSA} = 2,5\%$ em massa; Verde: $C_{BSA} = 15\%$ em massa; Laranja M: $C_{BSA} = 20\%$ em massa; Vermelho: $C_{BSA} = 30\%$ em massa.

Na figura 4.12, apresentamos a relação do comprimento do contorno do condensado de DNA induzido pela BSA em função da força aplicada: Inicialmente, como já poderíamos esperar, a pressão osmótica cresce com o aumento da concentração BSA, o que está de acordo com os dados de microscopia de fluorescência de Yoshikawa [34]. Por outro lado, a força aplicada não é constante durante todo o processo de descompactação.

Observa-se que pra baixas concentrações de BSA (2,5%) e (15%) já existe um princípio de compactação do DNA, devido uma diminuição do comprimento de contorno, a figura 4 mostra esta característica. Para maiores concentrações de BSA (20%) e (30%) em massa, há uma diminuição do comprimento de contorno do DNA aproximadamente em 80% que é uma mudança significativa em sua topologia, embora forças tão altas, não consigam descompactar completamente o DNA. A variação da energia

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

livre do estado compactado ao descompactado, pode ser estimada a partir da equação de Gibbs-Duhem, uma vez conhecida a variação do comprimento de contorno.

As alterações resultantes na energia livre de Gibbs por unidade de comprimento (medida em $K_B T$ /nm) são mostradas na figura 4.13, podemos observar que há aproximadamente um aumento linear no potencial químico, quando aumentamos a concentração de BSA enquanto a fração condensada por unidade de comprimento ($-\Delta L_c/L_o$) diminui, a relação do potencial químico em função da força é representada pela expressão abaixo.

$$\Delta_\mu = \int_{L_0}^L \Delta L_c(F) dF \quad (4.5)$$

A simulação de dinâmica de Langevin realizada [75], mostrou que as medidas de força-extensão em cadeias semi-flexíveis condensadas, podem depender da morfologia do condensado e esta topologia pode influenciar na dinâmica do processo de condensação este resultado corrobora com nossos resultados experimentais.

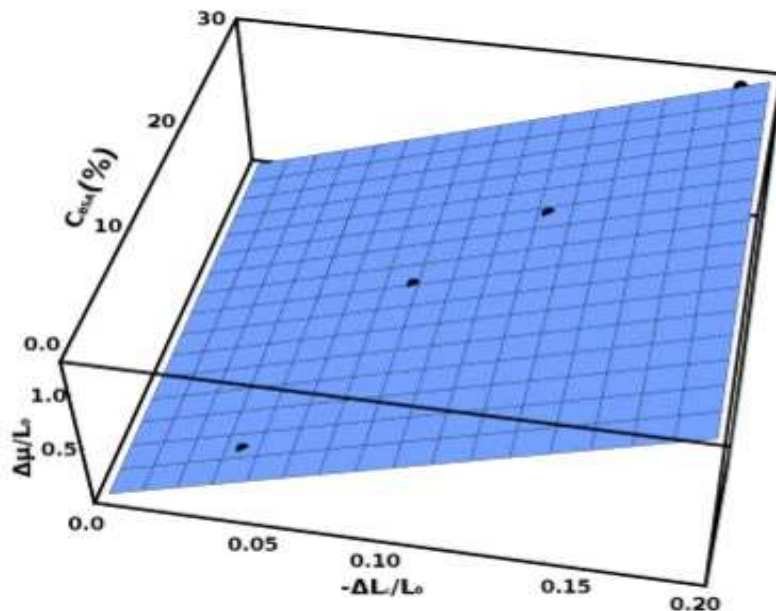


Figura 4.13: Variação do potencial químico por unidade de comprimento (Δ_μ/L_o) em função da variação do comprimento de contorno ($-\Delta L_c/L_o$), induzida pela concentração de BSA.

Esses resultados corroboram com os resultados obtidos [34, 75], e a principal

novidade que esses trabalhos não descreveram a caracterização mecânica da interação DNA com agente condensante, no nosso trabalho simulamos experimentalmente uma situação bem comum na dimensão celular que é o crowded [76] através da mudança dos parâmetros comprimento de contorno e persistência.

4.5 Interação do fármaco Doxorrubicina com DNA compactado induzido por BSA

Para condensar o DNA *in vitro*, deixando-o numa conformação semelhante à encontrada no interior do núcleo das células, usamos a Albumina Soro Bovino (BSA). A BSA é a proteína mais abundante no sangue bovino (concentração típica de 50mg/ml) e possui uma estrutura similar da HSA (Human Serum Albumin) cujo peso molecular é 66,000 g / mol a BSA pode formar dímeros principalmente em altas concentrações ou na forma cristalizada. A BSA é carregada negativamente no pH 7,0 e sofre mudança conformacionais no intervalo de pH entre 4 e 8[34].

Como já mencionamos foi demonstrado pelo grupo de Yoshikawa que, dependendo da concentração de sal na solução, a BSA tem a característica de induzir a condensação do DNA por interação de depleção[34].

Na situação inicial do trabalho, condensamos o DNA com BSA em solução fisiológica PBS [NaCl] = 125 mM e pH = 7.4 utilizando uma concentração de BSA de 20% em massa. Usando espectroscopia de força e videomicroscopia obtivemos curvas força por extensão, e utilizando modelo WLC [10] obtivemos os parâmetros mecânico que são, comprimento de persistência e o comprimento de contorno. Na segunda etapa do trabalho invertemos a ordem, ou seja, primeiro houve a interação da Doxorrubicina com complexo de DNA, em seguida inserimos a BSA. Para realizar essa tarefa, usamos a técnica de pinçamento óptico no regime de baixas forças ($F < 5$ pN) para estirar os complexos DNA-Doxorrubicina, nas condições experimentais desejadas.

Na Figura 4.14, temos o gráfico do comprimento de persistência x concentração de Doxorrubicina em uma concentração fixa de BSA (20% em massa). Neste gráfico inicialmente introduzimos a BSA e depois introduzimos o intercalante cuja a concentração

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

foi variada conforme podemos verificar abaixo.

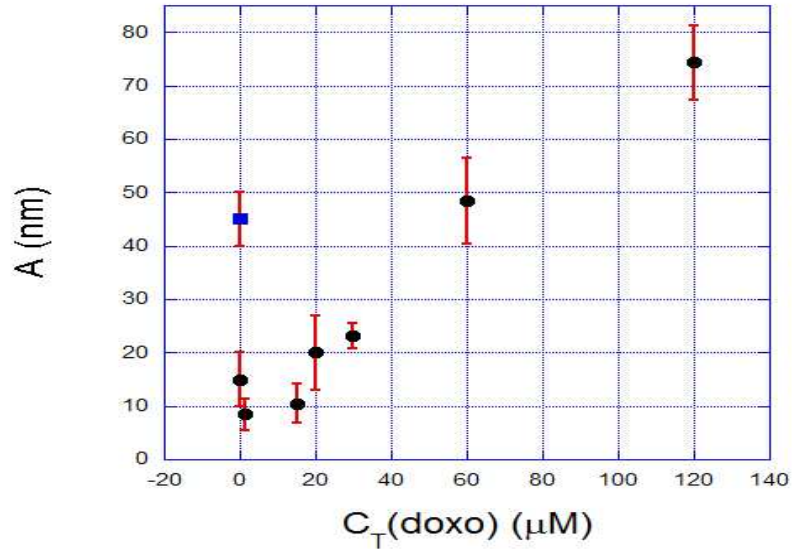


Figura 4.14: Comprimento de persistência dos complexos DNA-BSA em função da concentração total do ligante em solução, para uma concentração fixa de BSA.

Os círculos pretos representam o comprimento persistência do DNA, quando há BSA na solução o círculo azul representa o DNA puro. O comprimento de persistência cai drasticamente e, em seguida, aumenta monotonicamente com concentração de Doxorrubicina até alcançar o valor de saturação próximo de 70 nm em C_{Doxo} aproximadamente 80 mM.

Na Figura 4.15, temos a relação do comprimento de contorno por concentração de Doxorrubicina em uma concentração fixa de BSA (20% em massa).

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

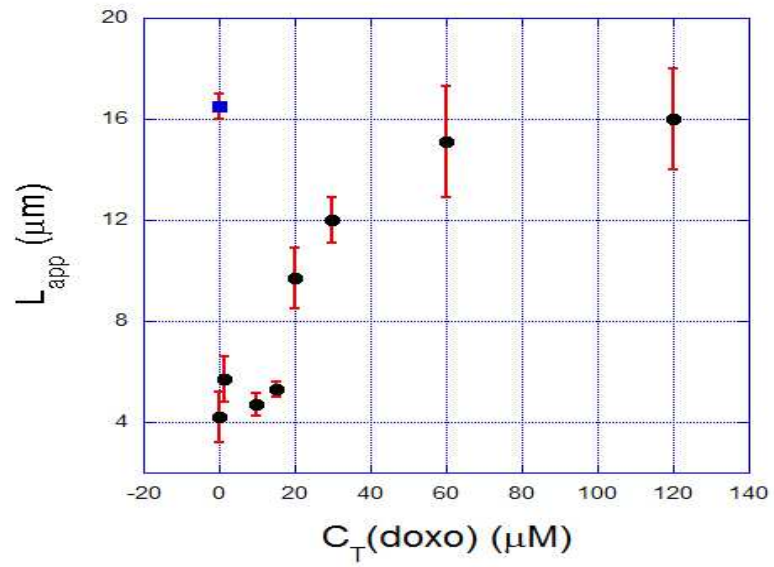


Figura 4.15: Comprimento de contorno dos complexos DNA-BSA em função da concentração total do ligante em solução, para uma concentração fixa de BSA.

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

As Figuras 4.16 e 4.17 mostram o comportamento do comprimento de persistência e contorno, na situação na qual é introduzido primeiramente o intercalante e na sequência a BSA.

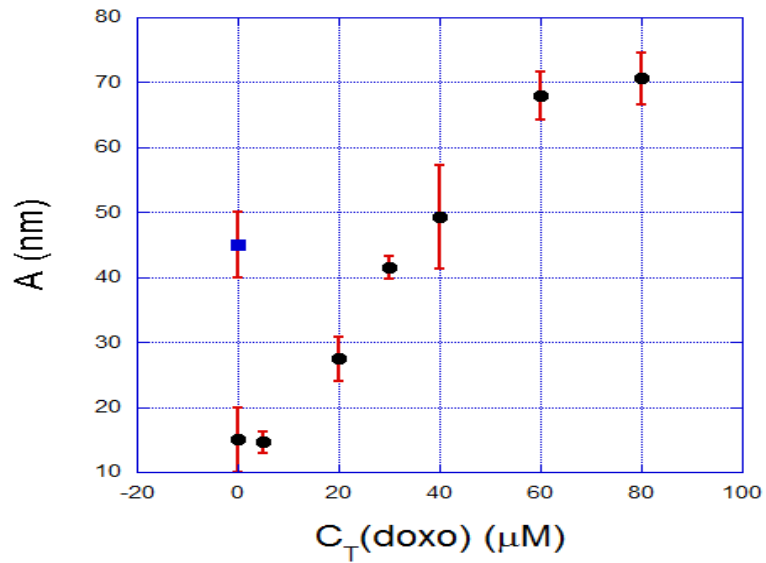


Figura 4.16: Gráfico do comprimento de persistência por concentração de Doxorrubicina e uma concentração de fixa de BSA (20% em massa).

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

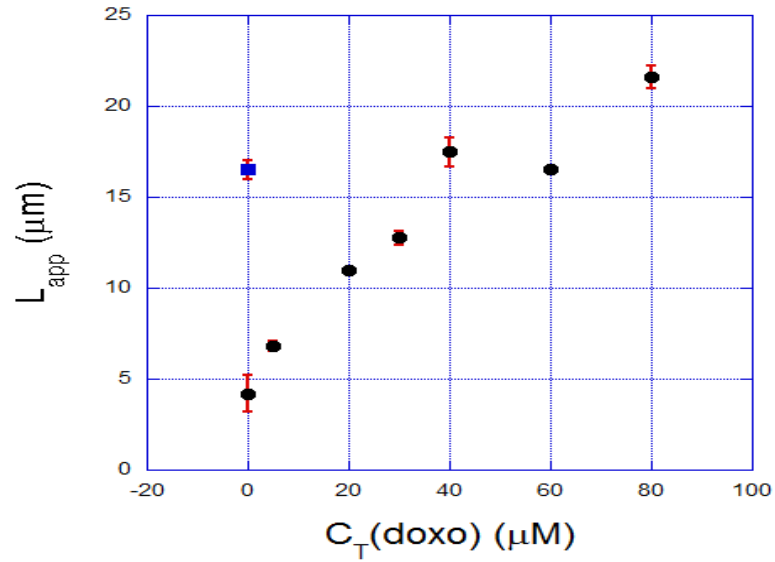


Figura 4.17: gráfico do comprimento de contorno por concentração de Doxorrubicina e uma concentração de fixa de BSA (20% em massa).

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

De forma qualitativa este resultado é semelhante ao que foi obtido no caso onde a BSA foi introduzida primeiramente. A principal diferença entre os resultados é que quando a BSA está interagindo primeiro no complexo de DNA é necessário uma concentração mais alta de Doxorrubicina para saturar o sistema. Os valores de saturação também são diferentes para o contorno ($16\mu\text{m}$ e $20\mu\text{m}$), diferentemente quando a Doxorrubicina intercala com DNA sem a presença da BSA.

Recentemente foram realizados experimentos com DNA-Doxorrubicina sem a presença da BSA, ou seja, o complexo de DNA não está compactado. As medidas foram realizadas nas mesmas condições experimentais do experimento com a BSA com a finalidade de comparar os resultados apresentados neste trabalho. As Figuras 4.18 e 4.19 mostram a variação do comprimento de contorno e persistência em função da concentração de Doxorrubicina, na ausência de BSA.

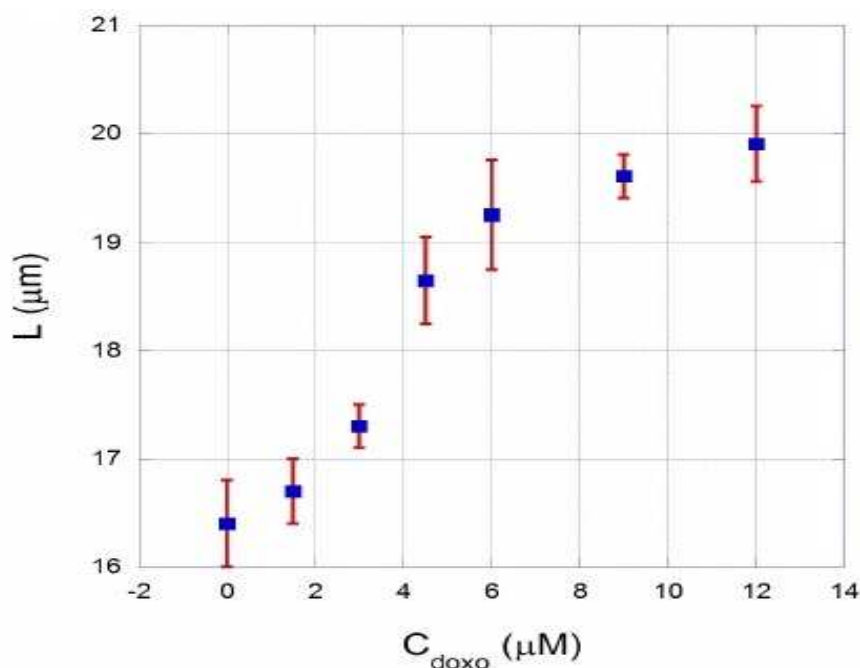


Figura 4.18: Comprimento de contorno dos complexos DNA-BSA em função da concentração total do ligante em solução. Nesse experimento não há BSA em solução [83].

Podemos observar que o comprimento de contorno cresce monótonicamente à medida que aumentamos a concentração de Doxorrubicina, o comprimento de contorno

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

do DNA puro tem valor aproximadamente de $16,5\mu\text{m}$ e evolui até a saturação, atingindo um valor aproximadamente $20\mu\text{m}$ obtido na $C_{Doxo} \sim 12 \mu\text{M}$.

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

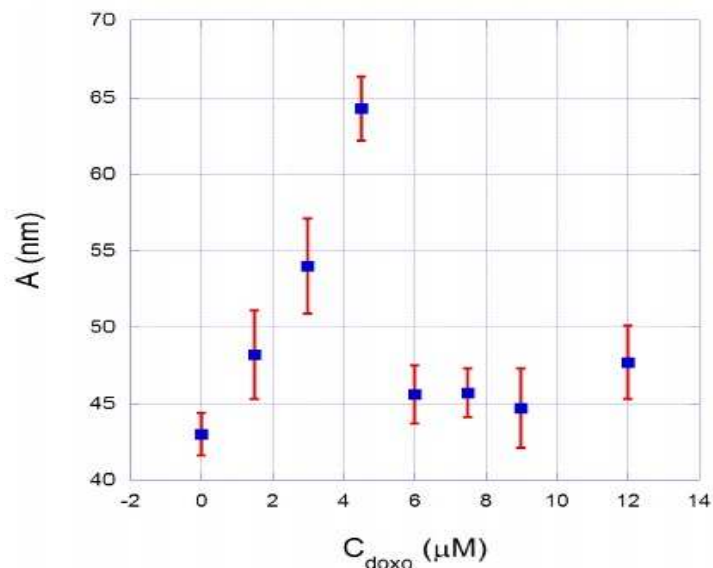


Figura 4.19: Comprimento de persistência dos complexos DNA em função da concentração total do ligante em solução, sem uma concentração fixa de BSA em solução[83].

A figura 4.19 mostra o comportamento do comprimento de persistência A do complexo Doxo-DNA em função da concentração total de Doxorrubicina. Podemos observar que o comprimento de persistência dos mesmos complexo aumentam até uma $C_{Doxo} \sim 4,5\mu M$ e diminui abruptamente. Esta diminuição do comprimento de persistência é devido provavelmente ao fato de que a força aplicada pela pinça óptica para fazer o estiramento pode induzir a desnaturação parcial da estrutura do complexo DNA-Doxorrubicina, formando bolhas de desnaturação que induzem uma diminuição no comprimento de persistência.

4.6 Conclusões

Nos experimentos iniciais, comparamos a interação DNA-BSA com outros agentes condensantes já conhecidos na literatura. Concluímos que a BSA, em certas condições experimentais consegue compactar o DNA por exclusão de volume devido a força de depleção. Esse resultado corrobora com resultados obtidos pelo Yoshikawa et al [34]. Uma vez caracterizado a BSA como agente condensante, realizamos um novo experimento dividido em duas etapas.

Na primeira etapa do nosso experimento, quando induzimos a condensação do DNA pela BSA a concentração utilizada mostram eficiente em reduzir o comprimento de contorno aparente da molécula em torno de 50% a 60%. Quando adicionamos diferentes concentrações de Doxorrubicina no sistema, observamos que para baixas concentrações do fármaco ($< 15 \mu\text{M}$) existe pouca interação, com isso a Doxorrubicina não consegue alterar o comprimento de contorno aparente do complexo. Entretanto, para altas concentrações ($> 30 \mu\text{M}$) verificamos que a Doxorrubicina desfaz o condensado de DNA-BSA, provavelmente devido ao aumento do comprimento de persistência induzido na molécula de DNA pelo intercalante.

Na etapa seguinte invertemos a ordem de aplicação dos compostos, com o intuito de avaliar a eficiência da BSA em condensar o DNA previamente intercalado com a Doxorrubicina. O resultado obtido é semelhante ao caso anterior, onde o comprimento de contorno aparente e o comprimento de persistência aumentam monotonicamente, entretanto a saturação desses dois parâmetros (contorno e persistência) ocorre em uma concentração menor de Doxorrubicina.

Para soluções contendo uma alta concentração de Doxorrubicina ($C_{Doxo} = 80 \mu\text{M}$), não temos processo de condensação do DNA induzido pela BSA, mas por outro lado, quando o DNA puro está previamente condensado por BSA(20% em massa), a Doxorrubicina só consegue descompactar estes condensados a partir da concentração $C_{Doxo} = 120 \mu\text{M}$. Podemos concluir que em qualquer caso, a presença de BSA influencia drasticamente a interação entre DNA e Doxorrubicina.

Os resultados obtidos no experimento em que temos a interação DNA e Do-

A interação DNA-BSA e DNA-BSA-Doxorrubicina

xorrubicina, onde o complexo de DNA não está condensado [83] de forma qualitativa foram semelhantes aos que foram obtidos no experimento DNA-Doxo com complexo DNA condensado induzido pela BSA. A diferença é que para o DNA previamente condensado necessita de uma alta concentração de Doxorrubicina para saturar o sistema, diferentemente do que ocorre quando o DNA não está compactado, isso ocorre pelo fato da BSA dificultar a interação da Doxorrubicina com DNA

Podemos observar analisando gráficos de comprimento de persistência, quando tem BSA em solução não existe aparecimento de bolha de desnaturação, situação diferente encontrado quando o experimento é usado na ausência de BSA, ou seja a BSA inibi a formação de bolhas.

Outro aspectos importante é que, quando a BSA está presente, é necessário um doxo muito maior concentrações para atingir a saturação do comprimento do contorno. Esse resultado implica que a BSA, além de condensar as moléculas de DNA, também altera o equilíbrio químico entre DNA e doxo, reduzindo a "afinidade efetiva" entre essas duas moléculas, no sentido de que se precisa muito mais moléculas de fármaco em solução para saturar a sitios de ligação de DNA disponíveis

Também investigamos a existência de uma interação direta entre doxo e BSA, que competiria com a interação DNA-doxo estudada nas experiências de pinças ópticas. Uma vez que uma interação BSA-doxo não pode ser detectada em tais experiências, realizamos medições de ressonância plasmática superficial (SPR) com BSA e doxo para avaliar a interação entre os dois compostos e os resultados evidenciaram essa interação

Capítulo 5

Interação DNA-Histonas

5.1 Interação DNA-Histonas e Resultados

Como já descrito nesse texto, quando imaginamos a cromatina devemos imaginar um sistema dinâmico e não estático,[13] esse processo em uma descrição simples faz com que haja uma compactação e uma descompactação do DNA, dependendo da conjectura da cromatina a figura 5.1 descreve essa dinâmica.

A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo que consiste em, aproximadamente, 146 pares de bases do DNA enroladas ao redor de um octâmero central de proteínas conhecidas como histonas. Essas proteínas, inicialmente, foram consideradas como componentes meramente estruturais, mas agora são reconhecidas pelo importante papel que desempenham na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina o octâmero é formado por quatro histonas [17] a figura 5.2 descreve o octâmero, que tem sua composição as proteínas H1, H2a, H2b, H3 e H4 [84].

Interação DNA-Histonas

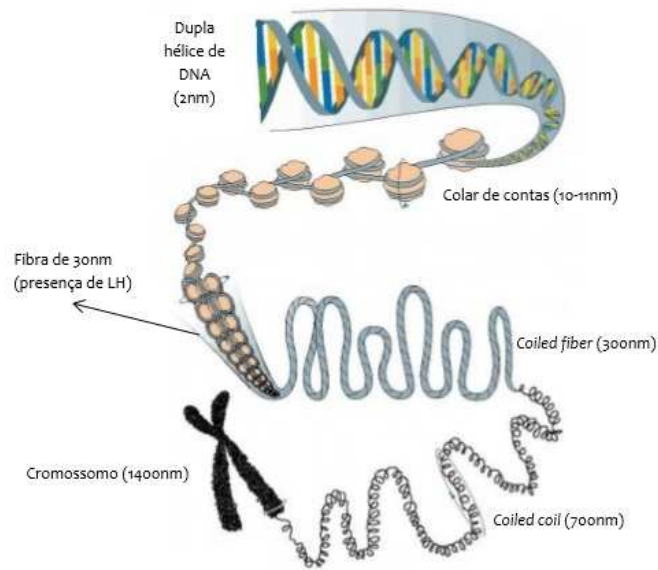


Figura 5.1: Dinâmica da compactação sofrida pela cromatina em eucariotos. Níveis consecutivos de condensação são mostrados, partindo do DNA livre, passando pelas fibras de 10nm, também chamada colar de contas, e de 30 nm, até alcançar níveis que culminam com a compactação máxima, representada pelo cromossomo [85].

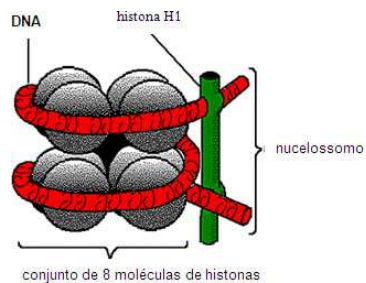


Figura 5.2: Modelo descreve a relação entre nucleossomo, cromatossomo e partícula central do nucleossomo na presença da linker histona, formando o octâmero [85].

Interação DNA-Histonas

Na condensação do DNA, pouco se sabe sobre a magnitude e a origem das forças que atuam nas fibras de cromatina, que regulam as características genéticas. Estas fibras mudam de conformação de acordo com a evolução da compactação do DNA no ciclo celular [13] existe algumas técnicas experimentais que ajudam a responder certas perguntas sobre a cromatina, por exemplo: espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia de força atômica (AFM) e pinça óptica [87, 88, 89].

Uma maneira de responder a estas perguntas é estirar uma única fibra de cromatina por suas extremidades para determinar padrões mecânicos, como já discutidos anteriormente. Em nossos experimentos utilizamos um conjunto de histonas produzido pela New England Biolabs e as proteínas contida são (H1, H2a, H2b, H3 e H4). Nas figura 5.3 e 5.4 temos as curvas típicas força por extensão obtidos no regime de altas e baixas forças, para algumas concentrações de histona.

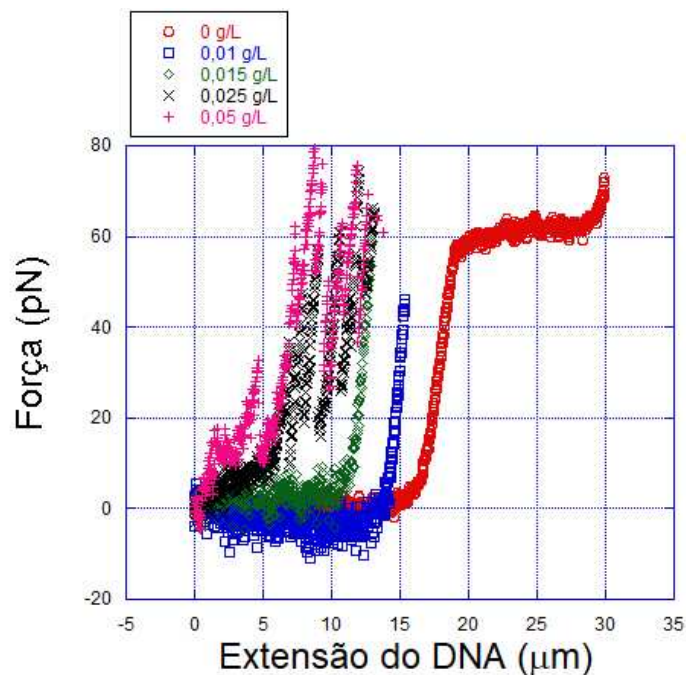


Figura 5.3: Curvas de força por extensão obtidos no regime de entálpico (altas forças). As curvas de variação de concentração de histonas, onde temos: o DNA puro representada pelas cor vermelha $C_{histonas} = 0$; e as concentrações de histonas temos, azul $C_{histona} = (0,01g/L)$; verde $C_{histona} = (0,015g/L)$; preto $C_{histona} = (0,025g/L)$ e rosa $C_{histona} = (0,05g/L)$

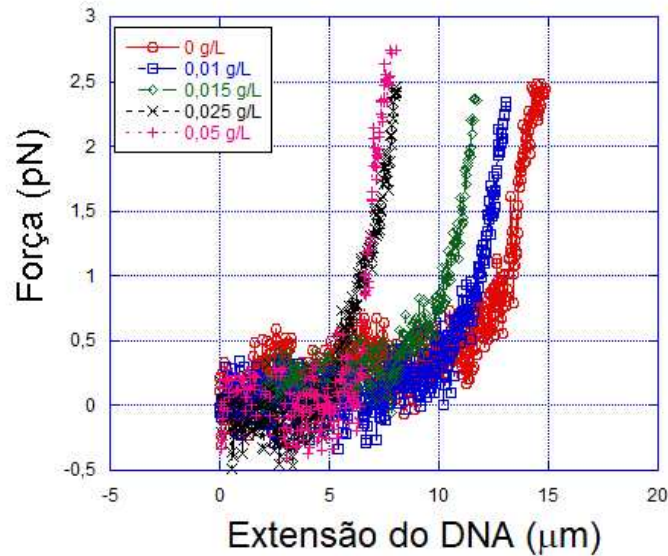


Figura 5.4: Curvas de força por extensão obtidos no regime de entálpico (altas forças). As curvas de variação de concentração de histonas, onde temos: o DNA puro representada pelas cor vermelha $C_{histonas} = 0$; e as concentrações de histonas temos, azul $C_{histona} = (0,01g/L)$; verde $C_{histona} = (0,015g/L)$; preto $C_{histona} = (0,025g/L)$ e rosa $C_{histona} = (0,05g/L)$

Podemos observar que os resultados encontrados para a interação DNA-histonas para altas forças, quando aumentamos a concentração de histonas surge o aparecimento de dente de serra,[?] essa característica surge devido aumento da formação de octâmeros, como estamos no regime de altas forças, nesse caso estou considerando forças maiores do que 10 pN, conseguimos desfazer octâmero, simulando uma transcrição celular.[90]

Já para forças menores que 10 pN não aparece o padrão dente de serra, mas podemos observar que este resultado no sistema entálpico é bem parecido com a interação entre DNA-BSA. Sabemos que o processo de compactação do DNA nessas duas situações ocorre por interações distintas. A interação DNA-histona é eletrostática enquanto a interação DNA-BSA por força de depleção.

Sabemos que na dinâmica celular, o DNA compacta e descompacta, e uma das causas dessas mudanças de conformação da molécula é a sua interação com as histonas.

Interação DNA-Histonas

A concentração dessas proteínas variam de acordo com a função específica da cromatina [11]. Realizamos medidas variando a concentração de histonas no complexo de DNA e obtivemos padrões mecânicos da interação DNA-histona que estão relacionados com a condensação do DNA. Os gráficos 5.5 e 5.6 descrevem esses resultados.

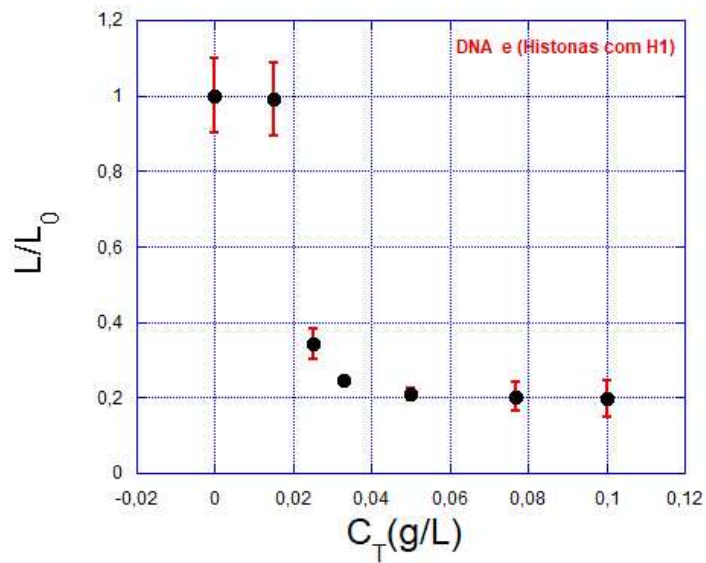


Figura 5.5: Gráfico do comprimento de contorno em função da variação de concentração de histonas.

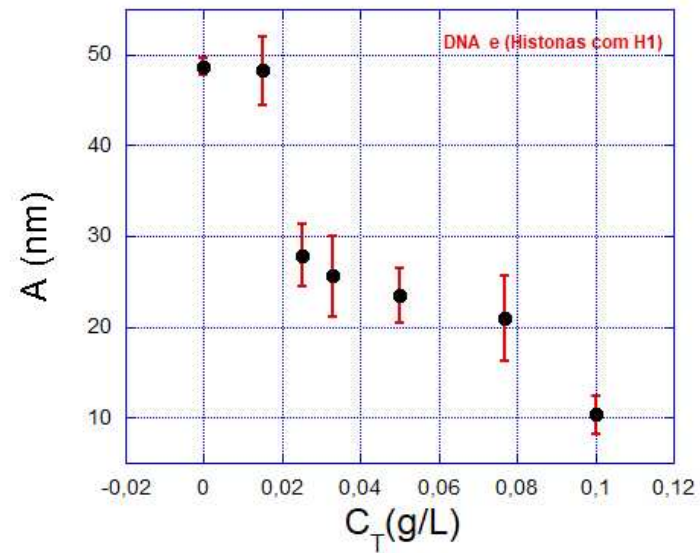


Figura 5.6: Gráfico do comprimento de persistência em função da variação de concentração de histonas.

Podemos observar que, nas 5.5 e 5.6 quando aumentamos a concentração de histonas o comprimento de contorno e de persistência diminuem. Essas mudanças conformacionais mostram que a molécula está compactando.

5.2 Interação DNA-Histonas sem H1 e Resultados

Compreender a cinética e a termodinâmica da compactação e desdobramento da cromatina é essencial para a interpretação da função gênica. A ativação do gene eucariótico requer a condensação de seções específicas da fibra de cromatina para acessar o DNA para processos como transcrição, replicação e reparo do DNA.

O decifrado das forças necessárias para desdobrar a fibra de cromatina é desafiador, porque dependem de muitos fatores, que incluem o ambiente iônico, para que interajam de uma forma que modifique a conformação do DNA para que isso ocorra temos diversos componentes químicos que corroboram para que ocorra o empacotamento e o descompactamento do DNA. Acredita-se que a histona H1 esteja envolvida na organização da cromatina estabilizando a estrutura da cromatina. A histona H1 também conhecida linker é geralmente visto como um repressor de transcrição, pois impede o acesso de fatores de transcrição e complexos de remodelação da cromatina ao DNA.[91, 92]

Determinar as propriedades de ligação da histona H1 à cromatina in vivo é fundamental para entender como ela exerce essas funções. Utilizamos técnicas de pinçamento óptico para descrever a influência da H1 na cromatina. O gráfico abaixo descreve o comportamento dos parâmetros mecânicos (comprimento de contorno e persistência) do fio de cromatina sem H1.

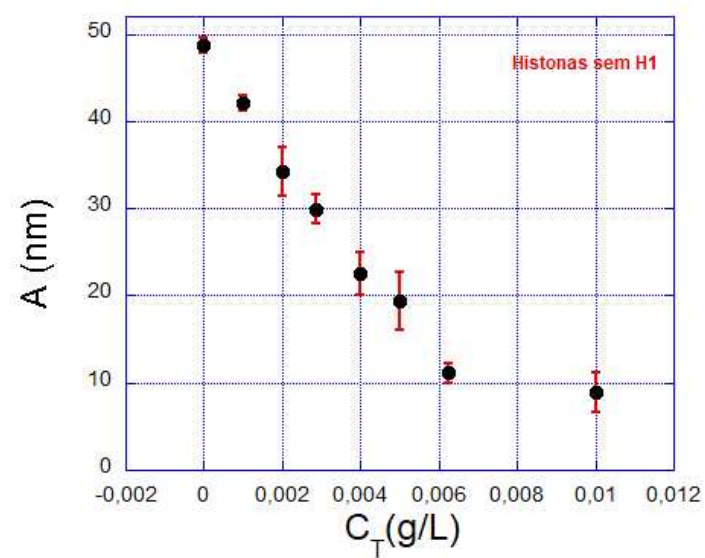


Figura 5.7: Gráfico do comprimento de persistência em função da variação de concentração de histonas.

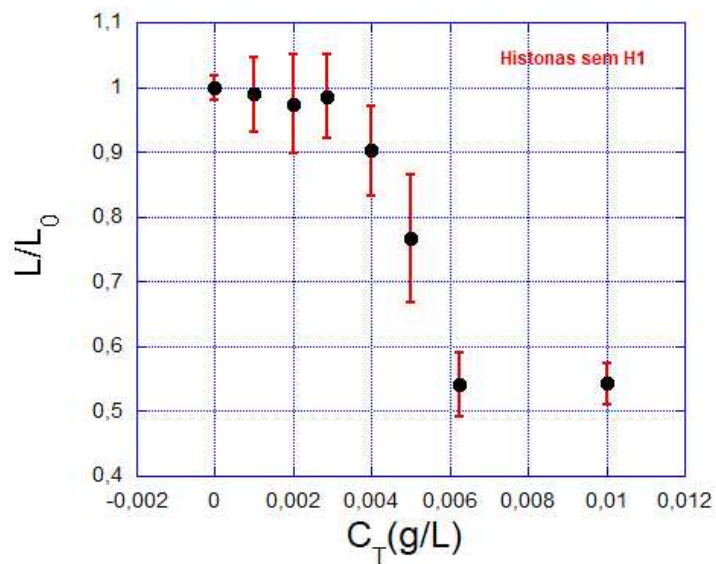


Figura 5.8: Gráfico do comprimento de contorno em função da variação de concentração de histonas.

Comparando o gráficos 5.7 e 5.8 com 5.6 e 5.5 temos:

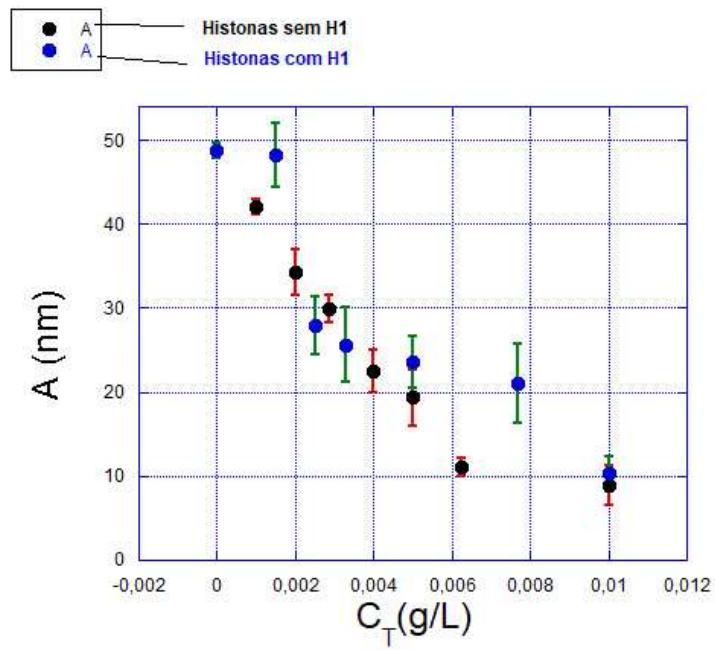


Figura 5.9: Gráfico do comprimento de persistência em função da variação de concentração de histonas.

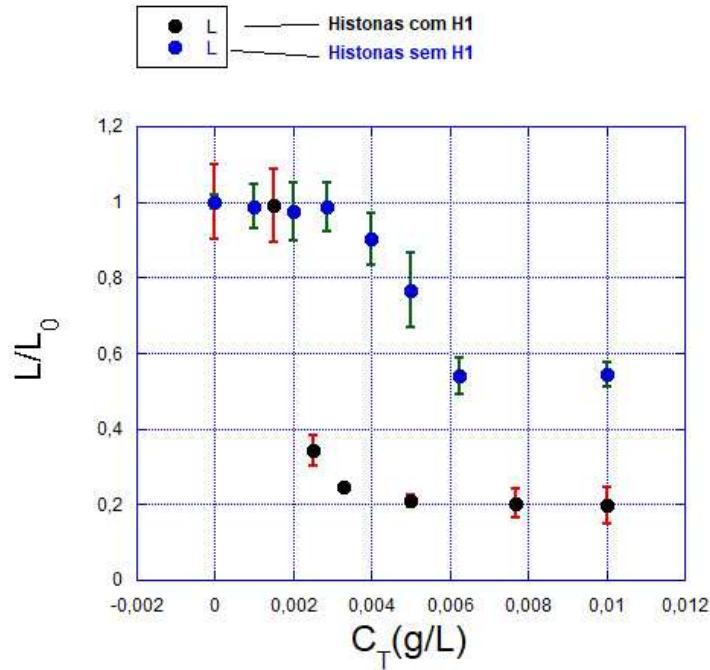


Figura 5.10: Gráfico do comprimento de contorno em função da variação de concentração de histonas.

Podemos observar que a variação do comprimento de persistência com o sem H1 o comportamento qualitativo é o mesmo, mas quando analisamos o comprimento de contorno, percebemos que sem H1 há um atraso na compactação em quase 50 % do comprimento de contorno esses resultado de grande importância pois corrobora com trabalhos computacionais.[91, 92, 94]

5.3 Conclusões

Podemos afirmar que a concentração da histona linker é de extrema importância no desenvolvimento da regulação do nucleossomo, ficou evidente pelos resultados de pinçamento óptico que há uma redução significativa no atraso da compactação do DNA, em comparação com a interação do DNA com as histonas incluindo a H1[89].

As histonas compactam o DNA fortemente em comparação a interação DNA e BSA. No desenvolvimento dos experimentos nós tentamos fazer medidas do complexo DNA-histona e em seguida intercalar o complexo usando Doxorubicina, mas a estru-

Interação DNA-Histonas

tura do octâmero formado pelas histonas, impediram que o intercalante, se acople nos pares de base do DNA [84, 11, 86].

Manipulando as concentrações de histonas nosso caso a H1 para que o nucleossomo fique numa conformação que facilite a intercalação conseguimos visualizar o comportamento de intercalação do fio de cromatina e a doxorrubicina a partir desses resultados iniciais vamos tentar caracterizar por espectroscopia de força a influência da proteína H1 no processo de interação fio de cromatina e ligantes.

Nossos resultados iniciais da interação DNA-Histonas sem H1 são promissores pois corroboram com a premissa que a doxorrubicina tem característica de fazer uma torção na cromatina desestabilizando com nucleossomo para que ocorra a intercalação[93]. As figuras ?? e ?? mostra um compartimento característico de intercalação [56, 83]. Experimento anteriores que realizamos com as cinco histonas, não conseguimos visualizar tal comportamento variamos concentração de Doxorrubicina de 20mM até 120mM.

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas

6.1 Resultados e Perspectivas

Neste trabalho, utilizando o modelo Worm Like-Chain (WLC) desenvolvido por Marko e Siggia [26], foi possível monitorar as mudanças nas propriedades mecânicas da molécula de DNA ao interagir com a BSA e as histonas onde esses parâmetros mecânicos nos dão uma informação importantíssima para descrever os aspectos conformacionais do DNA. A quase totalidade dos trabalhos disponíveis na literatura a respeito das interações de intercalantes com o DNA foram realizados com este último disperso em solução, numa conformação muito diferente da encontrada no interior das células, onde o DNA está fortemente compactado formando a cromatina.

Na primeira parte do trabalho utilizamos a técnica de pinçamento óptico para estudar a interação BSA e DNA e os efeitos do fármaco intercalante doxorubicina em condensados de DNA induzidos pela proteína BSA. Para a interação DNA e BSA concluímos que o processo de compactação se dá por interação de depleção, pelos resultados obtidos observamos que está de acordo com outros trabalhos da literatura, descrevemos um potencial termodinâmico do sistema em função da concentração de BSA onde esses resultados corroboraram com os trabalhos [75, 76]

Caracterizar a interação do intercalante com o DNA em uma conformação mais próxima da que este se encontra no núcleo celular. Na primeira etapa, condensamos o DNA com BSA em solução fisiológica PBS $[Na] = 125$ mM utilizando uma concen-

6. Conclusões e Perspectivas

tração de BSA de 20% em massa. Esta concentração mostrou-se eficiente em reduzir o comprimento de contorno aparente da molécula em torno de 50% a 60%. A seguir, adicionamos doxorrubicina no sistema em diversas concentrações diferentes, observando o efeito do fármaco no condensado.

Nos experimentos iniciais, comparamos a interação DNA-BSA com outros agentes condensantes já conhecidos na literatura. Concluimos que a BSA, em certas condições experimentais consegue compactar o DNA por exclusão de volume devido a força de depleção. Esse resultado corrobora com resultados obtidos pelo Yoshikawa et al [34]. Uma vez caracterizado a BSA como agente condensante, realizamos um novo experimento dividido em duas etapas.

Na primeira etapa do nosso experimento, quando induzimos a condensação do DNA pela BSA a concentração utilizada se mostraram eficiente em reduzir o comprimento de contorno aparente da molécula em torno de 50% a 60%. Quando adicionamos diferentes concentrações de Doxorrubicina no sistema, observamos que para baixas concentrações do fármaco ($< 15 \mu\text{M}$) existe pouca interação, com isso a Doxorrubicina não consegue alterar o comprimento de contorno aparente do complexo. Entretanto, para altas concentrações ($> 30 \mu\text{M}$) verificamos que a Doxorrubicina desfaz o condensado de DNA-BSA, provavelmente devido ao aumento do comprimento de persistência induzido na molécula de DNA pelo intercalante.

Na etapa seguinte invertemos a ordem de aplicação dos compostos, com o intuito de avaliar a eficiência da BSA em condensar o DNA previamente intercalado com a Doxorrubicina. O resultado obtido é semelhante ao caso anterior, onde o comprimento de contorno aparente e o comprimento de persistência aumentam monotonicamente, entretanto a saturação desses dois parâmetros (contorno e persistência) ocorre em uma concentração menor de Doxorrubicina.

Para soluções contendo uma alta concentração de Doxorrubicina ($C_{Doxo} = 80\mu\text{M}$), não temos processo de condensação do DNA induzido pela BSA, mas por outro lado, quando o DNA puro está previamente condensado por BSA(20% em massa), a Doxorrubicina só consegue descompactar estes condensados a partir da concentração $C_{Doxo} = 120\mu\text{M}$. Podemos concluir que em qualquer caso, a presença de BSA influencia

6. Conclusões e Perspectivas

drasticamente a interação entre DNA e Doxorrubicina.

Os resultados obtidos no experimento em que temos a interação DNA e Doxorrubicina, onde o complexo de DNA não está condensado [83] de forma qualitativa foram semelhantes aos que foram obtidos no experimento DNA-Doxo com complexo DNA condensado induzido pela BSA. A diferença é que para o DNA previamente condensado necessita de uma alta concentração de Doxorrubicina para saturar o sistema, diferentemente do que ocorre quando o DNA não está compactado, isso ocorre pelo fato da BSA dificultar a interação da Doxorrubicina com DNA

No trabalho das histonas ficou evidente pelos resultados de pinçamento óptico que há uma redução significativa no atraso da compactação do DNA, em comparação com a interação do DNA com as histonas incluindo a H1. Resultados iniciais da interação doxorrubicina e fio de cromatina via espectroscopia de força já mostra uma evidência da influência da proteína H1 no processo de interação fio de cromatina e ligantes.

Como perspectivas deste trabalho iremos terminar as medidas da interação fio de cromatina e doxorrubicina e em seguida estudar outra histona linker que é a H5 e analisar a influência do colesterol no processo de compactação do DNA.

Apêndice A: Artigos publicados

Apêndice A

Artigos publicados

Neste apêndice apresentamos os artigos publicados durante o período do doutorado do autor desta tese, sob orientação do professor Márcio Santos Rocha: (março de 2014 a março de 2018).

A.1 Artigos Publicados Relacionados a Tese

- Artigo Publicado na Revista *Journal of Chemical Physics*

C. H. M. Lima, M. S. Rocha and E. B. Ramos, Unfolding DNA condensates produced by DNA-like charged depletants: a force spectroscopy study . *Journal of Chemical Physics*. (2017)

- Artigo Publicado na Revista *Biopolymers*.

C. H. M. Lima, H. M. C. de Paula, L. H. M. da Silva and M. S. Rocha, Doxorubicin hinders DNA condensation promoted by the protein bovine serum albumin (BSA): a force spectroscopy study . *Biopolymers*. (2017)

Este trabalho foi capa da revista.

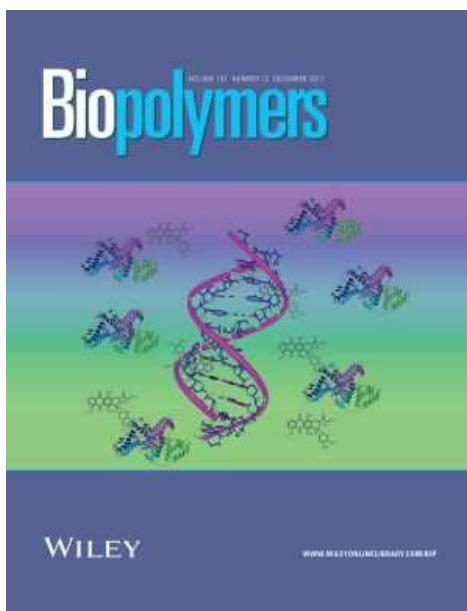


Figura A.1: Capa da Revista Biopolymers, Dezembro de 2017

A.2 Artigos Publicados em outros Projetos

- Artigo publicado na Revista *Soft Matter*

R. F. Bazoni, C. H. M. Lima, E. B. Ramos and M. S. Rocha, Force-dependent persistence length of DNA-intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments. *Soft Matter*. **11**, 4306-4314. (2015).

- Artigo Publicado na Revista *International Journal of Biological Macromolecules*.

B.C. Publio, T.A. Moura, C.H.M. Lima, M.S. Rocha, Biophysical characterization of the DNA interaction with the biogenic polyamine putrescine: A single molecule study. *International Journal of Biological Macromolecules*. (2018)

- Artigo Publicado na Revista *BBA - General Subjects*.

C.H.M. Lima, G.O. Almeida, M.S. Rocha, A cooperative transition from the semi-flexible to the flexible regime of polymer elasticity: Mitoxantrone-induced DNA condensation. *BBA - General Subjects*. (2018)



Soft Matter

PAPER

View Article Online
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/c5sm00706b

Force-dependent persistence length of DNA–intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments

R. F. Bazoni, C. H. M. Lima, E. B. Ramos and M. S. Rocha*

Received 25th March 2015,
Accepted 20th April 2015

DOI: 10.1039/c5sm00706b

www.rsc.org/softmatter

By using optical tweezers with an adjustable trap stiffness, we have performed systematic single molecule stretching experiments with two types of DNA–intercalator complexes, in order to investigate the effects of the maximum applied forces on the mechanical response of such complexes. We have explicitly shown that even in the low-force entropic regime the persistence length of the DNA–intercalator complexes is strongly force-dependent, although such behavior is not exhibited by bare DNA molecules. We discuss the possible physicochemical effects that can lead to such results. In particular, we propose that the stretching force can promote partial denaturation on the highly distorted double-helix of the DNA–intercalator complexes, which interfere strongly in the measured values of the persistence length.

1. Introduction

The study of DNA interactions with ligands such as drugs or proteins is an interdisciplinary field important both in the investigation of many intracellular processes as well as in applications on the health sciences, especially in cancer chemotherapies and gene therapies. From the early 90's, the advent of single molecule techniques such as optical and magnetic tweezers has allowed one to investigate these interactions by manipulating and stretching single DNA–ligand complexes, since the mechanical response of these complexes usually changes upon ligand binding. In fact, along the past few years various approaches were developed in order to deduce the ligand binding mode(s) and to extract physicochemical information of the interaction from mechanical data obtained by performing single molecule stretching on DNA–ligand complexes.^{1–20}

Although nowadays the mechanical behavior of bare DNA molecules is well understood, the mechanics of DNA–ligand complexes is still a topic with many contradictory results in the literature, especially when comparing data obtained from single molecule stretching techniques with those obtained from typical ensemble-averaging techniques. In single molecule stretching experiments performed with optical or magnetic tweezers, each individual DNA–ligand complex is stretched from its equilibrium configuration in solution to an approximately straight configuration, and the mechanical properties are determined by fitting the force \times extension curve to some theoretical model of polymer

elasticity. In ensemble-averaging techniques such as dynamic light scattering, viscosimetry and gel electrophoresis, otherwise, the complexes are not mechanically manipulated and the mechanical properties are deduced from the conformation of a set of many molecules.

Intercalators are well known DNA binding drugs much used in various types of cancer chemotherapies. The binding of these drugs introduces strong structural perturbations into the double-helix structure, increasing the DNA contour length and unwinding the double-helix by a certain angle per intercalated molecule.^{7,21–25} Despite the large use of intercalators in cancer chemotherapies and the large number of studies concerning the interactions of these drugs with DNA, there are still some contradictory results in the literature about the effects of these compounds on the DNA persistence length. In fact, there are some studies such as the ones of Sischka *et al.*⁷ and Husale *et al.*,⁸ performed with optical tweezers; Maaloum *et al.*,²⁶ performed with atomic force microscopy (AFM); Murade *et al.*,²⁷ performed with optical tweezers and fluorescence microscopy; and Lipfert *et al.*,²⁸ performed with magnetic tweezers, which have reported a decrease in the persistence length of DNA complexes formed with intercalators. On the other hand there are studies that report an increase in the persistence length of DNA–intercalator complexes upon drug binding, such as those reported by Reinert *et al.*,²⁹ performed with viscosimetry; Quake *et al.*,³⁰ performed with optical tweezers and fluorescence microscopy; Berge *et al.*,³¹ performed with AFM; and the studies from the group of Yoshikawa,^{32–35} all performed with fluorescence microscopy. Finally, there are studies that have reported that intercalators in general firstly increase the DNA persistence length at low ligand concentrations, but can decrease this parameter at high ligand

Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. E-mail: marcos.rocha@ufv.br; Fax: +55-31 3899-2483; Tel: +55-31 3899-3399

Unfolding DNA condensates produced by DNA-like charged depletants: a force spectroscopy study

C. H. M. Lima, M. S. Rocha and E. B. Ramos^{1, a)}

Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa. Av. P. H. Rolfs s/n, CEP 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.

(Dated: 19 January 2017)

In this work we have measured, by means of optical tweezers, forces acting on depletion-induced DNA condensates due to the presence of the DNA-like charged protein bovine serum albumin (BSA). The stretching and unfolding measurements performed on the semi-flexible DNA chain reveal (1st) the softening of the uncondensed DNA contour length and (2nd) a mechanical behavior strikingly different from those previously observed: the force-extension curves of BSA-induced DNA condensates lack the “saw-tooth” pattern and applied external forces as high as $\approx 80pN$ are unable to fully unfold the condensed DNA contour length. This last mechanical experimental finding is in agreement with force-induced “unpacking” detailed Langevin dynamics simulations recently performed by Cortini *et al* on model rod-like shaped condensates. Furthermore, a simple thermodynamics analysis of the unfolding process has enabled us to estimate the free energy involved in the DNA condensation : the estimated depletion-induced interactions vary linearly with both the condensed DNA contour length and the BSA concentration, in agreement with analytical and numerical analysis performed on model DNA condensates. We hope that future additional experiments can decide whether the rod-like morphology is the actual one we are dealing with (*e.g* pulling experiments coupled with super-resolution fluorescence microscopy).

PACS numbers: 87.80.Nj; 82.37.Rs; 87.14.gk; 87.80.Cc

Keywords: DNA condensation, depletion interactions, BSA, force spectroscopy

I. INTRODUCTION

DNA condensation or DNA compaction is a term usually used to describe a process in which disperse DNA molecules are compacted into tiny, nanometer-sized forms often presenting a globule, rod or tours-like morphology¹. In such process, the micrometer-sized, worm-like DNA chain is folded in a highly dense and liquid-crystalline ordered structure, with a drastic reduction in its spanned volume.

In vitro, DNA condensation can be usually achieved by using cationic molecules with charge equal or higher than +3 (cation-induced condensation)^{1,2} or neutral polymers such as polyethylene-glycol(PEG) and monovalent salt (ψ -condensation)³. In the former case, the positional correlation among the cationic ligands onto the DNA double-helix acts promoting DNA segment-segment attraction resulting in the collapse of the DNA molecule⁴, whereas in the latter one, the condensing agent doesn't bind the double-helix and the compaction process is driven by the exclusion of the depletants surrounding the DNA segments, thus giving rise to attractive depletion-induced DNA segment-segment interactions⁵. Since the amounts of depletants usually needed to achieve DNA condensation are in the range of ~ 10 -30%(w/w%), the solution conditions are termed “crowded”⁶.

An inverse scenario is presented *e.g.*, by the ejection of phages genomic DNA from within its capsid into bacte-

ria. The highly confined DNA chain is released into the cytosol and the bending and electrostatic energies needed to confine the viral DNA inside its capsid are responsible for the ejection. It has also been shown that crowding can suppress partially or totally the DNA ejection from T4 phages into a neutral polymer (PEG) solution⁷. The ejection of phage DNA into bacteria is an example of biological process which is, to some extent, related to pulling experiments performed with single DNA chains in PEG solutions where fractions of the condensed DNA contour length are pushed into a crowded environment⁸: here crowding plays both roles of keeping the condensate structure (keeping the chain confined within the condensate volume) and opposing the swell or release of the semi-flexible chain into the crowded solution, in such a way that, an external force is needed to unfold the condensate.

On the one hand, there is an abundant literature on force spectroscopy of cation-induced DNA condensates under several solution conditions showing *e.g.*, the well known stick-release pattern in the force-extension curves (a signature of this sort of condensate), the unfolding of its loops, changes in the free energies involved and *etc*⁹⁻¹². On the other hand, very few experimental works have focused on the mechanics of depletion-induced DNA condensation in a crowded environment^{13,14}, despite the known relative importance of crowding in the nuclear architecture and functioning in eukariotic cells¹⁵ (and references therein). More recently¹⁶, Langevin dynamics simulations were used to study the details involved in the folding/unfolding of torus and rod-like DNA condensates. Rod and torus-like condensates seem to have

^{a)}Electronic mail: esio@ufv.br

Received: 18 July 2017 | Revised: 22 September 2017 | Accepted: 27 September 2017

DOI: 10.1002/bip.23071

ORIGINAL ARTICLE

WILEY **Biopolymers**

Doxorubicin hinders DNA condensation promoted by the protein bovine serum albumin (BSA)

C. H. M. Lima¹ | H. M. C. de Paula² | L. H. M. da Silva² | M. S. Rocha¹ 

¹Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

²Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Correspondence

M. S. Rocha, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
Email: marcos.rocha@ufv.br

Abstract

In this work, we have studied the interaction between the anticancer drug doxorubicin (doxo) and condensed DNA, using optical tweezers. To perform this task, we use the protein bovine serum albumin (BSA) in the working buffer to mimic two key conditions present in the real intracellular environment: the condensed state of the DNA and the abundant presence of charged macromolecules in the surrounding medium. In particular, we have found that, when doxo is previously intercalated in disperse DNA, the drug hinders the DNA condensation process upon the addition of BSA in the buffer. On the other hand, when bare DNA is firstly condensed by BSA, doxo is capable to intercalate and to unfold the DNA condensates at relatively high concentrations. In addition, a specific interaction between BSA and doxo was verified, which significantly changes the chemical equilibrium of the DNA-doxo interaction. Finally, the presence of BSA in the buffer stabilizes the double-helix structure of the DNA-doxo complexes, preventing partial DNA denaturation induced by the stretching forces.

KEYWORDS

bovine serum albumin (BSA), DNA condensation, doxorubicin, intercalation

1 | INTRODUCTION

The investigation of DNA interactions with binding drugs is important to understand the physicochemical details of the mechanism(s) of action of such drugs when used in chemotherapies, gene therapies, and other applications. In fact, a number of researchers have paid attention to this topic in the past years, characterizing many types of interactions that can exist between DNA and small drug molecules. For recent reviews on the subject, see Refs. 1,2.

Despite the large number of studies in the field, almost the totality of these works were performed using disperse DNA molecules in ordinary buffer solutions, which contain basically only counter- and co-ions (Na^+ , Cl^- , etc). Although the interactions between DNA and drugs can be characterized in many aspects under such conditions, there is no guarantee that such interactions will occur in the same way inside living cells. On the contrary, they should be distinct in many aspects, since in the intracellular environment the DNA molecules are usually subjected to very different conditions: they are condensed during most time and, in addition, the surrounding medium contains a lot of other macromolecules (proteins, sugars, and others) that contribute to regulate cell volume and fluid balance. Such macromolecules can directly or indirectly

interfere in the natural intracellular DNA-related processes and in the DNA-drug interactions, by changing water activity on the double-helix, or even by directly interacting with the biopolymer and/or with the drug used.^[3–9] Despite the relevance of such topic, few works have used force spectroscopy to investigate the DNA condensation process at a single molecule level^[10–15] and the interactions of condensed DNA with drugs.^[14,16–18]

In this work, we have studied the interaction between condensed DNA and the drug doxorubicin (doxo) by using the protein bovine serum albumin (BSA) to mimic two key intracellular conditions: DNA condensation and the presence of charged macromolecules in the surrounding medium. Although histones are the real proteins that condense the DNA molecule inside most cells, the use of BSA here has some advantages for letting one to get first insights on the general behavior of the drug inside cells, because the two intracellular conditions above mentioned can be achieved simultaneously by using a single protein in the buffer. Thus, in the present work we created a simplified *in vitro* environment that somewhat mimics some important intracellular conditions. This environment is closer to what occurs inside prokaryote cells, in which the DNA condensation also depends on the depletants present in the surrounding medium.^[19]



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



Biophysical characterization of the DNA interaction with the biogenic polyamine putrescine: A single molecule study



B.C. Publio, T.A. Moura, C.H.M. Lima, M.S. Rocha*

Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2017
Received in revised form 19 January 2018
Accepted 20 January 2018
Available online xxxx

Keywords:

Putrescine
DNA
Single molecule force spectroscopy

ABSTRACT

We have performed a biophysical characterization, at single molecule level, of the interaction between the DNA molecule and the biogenic polyamine putrescine. By using force spectroscopy, we were able to monitor the complexes formation as putrescine is added to the sample, determining the mechanical properties of such complexes and the physicochemical (binding) parameters of the interaction for three different ionic strengths. In particular, it was shown that the behavior of the equilibrium binding constant as a function of the counterion concentration deviates from the prediction of the Record-Lohman model. The measured constants were $(1.3 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, $(2.1 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for $[\text{Na}] = 10 \text{ mM}$, and $(2.2 \pm 0.3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$. The cooperativity degree of the binding reaction, on the other hand, increases with the ionic strength. From these analysis, the DNA-putrescine binding mechanisms are inferred, and a comparison with results reported for ordinary bivalent ions like magnesium is performed. Such study provides new insights on the general behavior of the DNA interactions with biogenic polyamines.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The biogenic polyamines putrescine, spermine and spermidine play important roles in various intracellular biochemical processes, from macromolecular synthesis to cell proliferation and differentiation [1,2]. Some of these functions are mediated by the interactions of polyamines with nucleic acids (RNA and DNA) [3]. Thus, characterizing such interactions is essential to allow a robust comprehension of these biochemical processes at molecular level. Although the general aspects of such interactions were elucidated along the past years, many peculiarities remain unknown and are subject of controversy [4]. In particular, single molecule studies of the complexes formed between these polyamines and the nucleic acids are rare.

In the present work we have performed a biophysical characterization of the interaction between the DNA molecule and the polyamine putrescine, at single molecule level. To perform such a task, we use optical tweezers to perform single molecule stretching experiments of the DNA-putrescine complexes, at various different ligand concentrations. Such experiments allow one to promptly measure the changes on the mechanical properties of such complexes as the putrescine concentration increases in the sample. From these data, the binding mode can be deduced and the physicochemical

(binding) parameters of the interaction can also be determined with accuracy [5]. Although the DNA-putrescine interaction was studied in some aspects by other experimental techniques and computer simulations [4,6–12], a complete single molecule study varying the putrescine concentration and the ionic strength of the surrounding buffer is lacking. Such study is now presented here, allowing one to get new insights on both the mechanical and physicochemical behavior of the DNA-putrescine complexes.

Putrescine is a compound related to the odor of putrefying flesh and bad breath. It is a linear polyamine with $\sim 0.8 \text{ nm}$ length, having a positive charge at each end when protonated in solution. Fig. 1 shows the chemical structure of this compound. An important feature for its interaction with the DNA molecule is the fact that the $2+$ charge is linearly distributed along the molecule, and not centrally concentrated like in ordinary bivalent ions such as magnesium (Mg^{2+}) or calcium (Ca^{2+}).

2. Materials and methods

2.1. Experimental details

The optical tweezers used here to perform the experiments consist of a 1064 nm ytterbium-doped fiber laser operating in the TEM₀₀ mode (IPG Photonics) mounted on a Nikon Ti-S inverted microscope with a $100\times$ NA 1.4 objective.

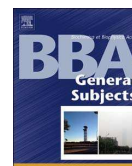
* Corresponding author.
E-mail address: marcios.rocha@ufv.br (M.S. Rocha).



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen



A cooperative transition from the semi-flexible to the flexible regime of polymer elasticity: Mitoxantrone-induced DNA condensation



C.H.M. Lima, G.O. Almeida, M.S. Rocha*

Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
DNA condensation
Mitoxantrone
Polymer elasticity
Force spectroscopy

ABSTRACT

We report a high cooperative transition from the semi-flexible to the flexible regime of polymer elasticity during the interaction of the DNA molecule with the chemotherapeutic drug Mitoxantrone (MTX). By using single molecule force spectroscopy, we show that the force-extension curves of the DNA-MTX complexes deviate from the typical worm-like chain behavior as the MTX concentration in the sample increases, becoming straight lines for sufficiently high drug concentrations. The behavior of the radius of gyration of the complexes as a function of the bound MTX concentration was used to quantitatively investigate the cooperativity of the condensation process. The present methodology can be promptly applied to other ligands that condense the DNA molecule upon binding, opening new possibilities in the investigation of this type of process and, more generally, in the investigation of phase transitions in polymer physics.

1. Introduction

The interactions of the DNA molecule with ligands such as proteins and drugs is a field important to many areas of knowledge, from the comprehension of basic intracellular processes to the application in medical sciences, especially in cancer chemotherapies. Along the past years, single molecule techniques such as optical and magnetic tweezers, as well as atomic force microscopy, have promoted a major step in the understanding of such interactions [1–6]. In fact, these techniques have opened the possibility of manipulating single DNA-ligand complexes, allowing the determination of force-extension curves (FECs) from which the mechanical properties of the complexes (and the physical chemistry of the interaction [1]) can be extracted. This type of approach is usually known as single molecule force spectroscopy (SMFS).

When using SMFS to study the interactions of the DNA molecule with drugs or proteins, the straightforward approach employed to determine the mechanical parameters of the complexes formed is to fit the experimental FECs to the worm-like chain (WLC) model [7–9]. Nevertheless, such model has its intrinsic limitations, for example, it is valid only for semi-flexible polymers. The bare DNA molecule has a peculiar chemical structure, with two strands forming a double-helix that sets important properties to the biopolymer such as a well-defined negative charge density and a bending stiffness which places DNA in the class of semi-flexible polymers [7,9–11]. When a ligand binds to the double-helix, however, it can change the local bending stiffness as well as the

local charge density. Thus, if these changes make the DNA-ligand complex much stiff or soft, the WLC model may fail and the mechanical parameters obtained from the fitting of the FEC are maybe not much realist. Fortunately, a large number of DNA ligands change only slightly the DNA persistence length upon binding. Thus, the complex formed is still a semi-flexible polymer, which justifies the use of the WLC model to analyze the data. Nevertheless, this is not a general property, and there are some ligands that can change drastically the mechanical properties of the DNA molecule upon binding. Maybe the most known examples are ligands that condense the DNA molecule, such as the polyamines spermine and spermidine, and the histone proteins. These cationic ligands considerably reduce the effective persistence length of the complexes formed at low ionic strengths [12,13], facilitating the DNA condensation process. Small drug molecules that induce substantial changes on the DNA persistence length upon binding, however, are much less common.

While SMFS was largely employed in the past to study DNA condensation induced by various compounds such as polyamines and proteins [12,14–17], the DNA complexes formed with Mitoxantrone (MTX) were never characterized at single molecule level. Here we report a SMFS characterization of this interaction using optical tweezers to stretch the DNA-MTX complexes in the entropic regime (forces < 10 pN). While higher forces (tens of pN) may bring information on the structure and structural transitions of these complexes, inside cells the DNA molecule is submitted to very small net forces, on the order of a few picoNewtons [18]. Therefore, to characterize the DNA-drug

* Corresponding author.

E-mail address: marcios.rocha@ufv.br (M.S. Rocha).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.01.019>

Received 27 November 2017; Received in revised form 17 January 2018; Accepted 30 January 2018

Available online 02 February 2018

0304-4165/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Referências Bibliográficas

- [1] A. Ashkin, “*Acceleration and trapping of particles by radiation pressure.* Phys. Rev. Lett, **24**, 1560-1672, (1970).
- [2] A. Ashkin and J. M. Dziedzic, “*Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria.* Phys. Rev. Lett, **235**, 1517-1520, (1987).
- [3] A. Ashkin, “*Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime.* Biophys. J., **61**, 569-582, (1992).
- [4] E. Stellamanns, S. Uppaluri, A. Hochstetter, N. Heddergott, M. Engstler, T. Pfohl “*Optical trapping reveals propulsion forces, power generation and motility efficiency of the unicellular parasites Trypanosoma brucei brucei*” Sci Rep **4**, 6515-6520 (2014).
- [5] M. Schwingel, M. Bastmeyer “*Force Mapping during the Formation and Maturation of Cell Adhesion Sites with Multiple Optical Tweezers*” Plos One **4**, 50-58 (2013).
- [6] A. A. Rebane, L. Ma, Y. Zhang “*Structure-Based Derivation of Protein Folding Intermediates and Energies from Optical Tweezers*” Biophys J **110**, 441-454 (2016).
- [7] L. Galla, A. J. Meyer, A. Spiering, A. Sischka, M. Mayer, A. R. Hall, et al “*Hydrodynamic Slip on DNA Observed by Optical Tweezers-Controlled Translocation Experiments with Solid-State and Lipid-Coated Nanopores*” Nano Lett **110**, 4176-4182 (2014).
- [8] D. J. D. Stevenson, F. Gunn-Moore, K. Dholakia “*Light forces the pace: optical manipulation for biophotonics*” BIOMEDO **15**, 041503-041521 (2010).

Referências Bibliográficas

- [9] F. Ritort “*Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications*” J. Phys. Condens. Matter **18**, 531-583 (2006).
- [10] J. F. Marko, E. D. Siggia, “*Stretching DNA. ? Macromolecules*. Macromolecules, **4**, 8759-8770, (1995).
- [11] J.D Watson and F.H.C. Crick, “*A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*”, Nature, (1953).
- [12] A. Zaha, H. Ferreira, A. Schrank and L. Passaglia , “*A estrutura dos Ácidos Nucléicos Biologia Molecular Básica* ”, 5^a Ed. Artmed, (2003).
- [13] Alberts , “*Biologia molecular da célula*”, 5^a ed, (2010).
- [14] I. Rouzina, M. C. Williams e J. Wenner , “*Effect of pH on the Overstretching Transition of Double-Stranded DNA: Evidence of Force-Induced DNA Melting*”, Biophysical Journal **80**, 874-881 (2001).
- [15] I. Rouzina, M. C. Williams, J. Wenner e V. A. Bloomeld , “*Force-Induced Melting of the DNA Double Helix :Effect of Solution Conditions*”, Biophysical Journal **80**, 338-339 (2001).
- [16] A. Bhattacharya. *Structures of desire*”, Nature **459**, 24-27 (2009).
- [17] V. Ramakrishnan. *Histone structure and the organization of the nucleosome. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*”, Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **26**, 83-112 (1997).
- [18] K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, “*Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*”, Nature **389**, 251-260 (1997).
- [19] P. J. J. Robinson, W. An, A. Routh, et al, “*30 nm Chromatin Fibre Decompaction Requires both H4-K16 Acetylation and Linker Histone Eviction*”, Journal of Molecular Biology **381**, 816-825 (2008).

Referências Bibliográficas

- [20] Y. Fan, T. Nikitina, J. Zhao, et al, “*Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation*”, Cell **123**, 199-212 (2005).
- [21] G. Li, D. Reinberg, “*Chromatin higher-order structures and gene regulation*”, Current Opinion in Genetics e Development **21**, 175-186 (2011).
- [22] A. Annunziato, “*DNA packaging: Nucleosomes and chromatin*”, Nature **11**, 1 (2008).
- [23] L. Bintu, T. Ishibashi, M Dangkulwanich, et al “*Nucleosomal Elements that Control the Topography of the Barrier to Transcription*”, Cell **151**, 738-749 (2012).
- [24] F. Thoma, T. H. Koller, A Klug, “*Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-dependent Superstructures of Chromatin*”, Journal of Cell Biology **81**, 403-427 (1979).
- [25] L. Hood, D. Galas, “*The digital code of DNA*”, Nature **421**, 444-448 (2003).
- [26] T. Schalte, S. Duda, D. F. Sargent, T. J. Richmond “*X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre*”, Nature **436**, 138-141 (2005).
- [27] J. T. Finch, A. Klug “*Solenoidal model for superstructure in chromatin*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **6**, 1897-1901 (1976).
- [28] A. Worcel, S. Strogatz, D. Riley “*Structure of chromatin and the linking number of DNA*”, Proc. Natl. Acad. Sci. **78**, 1461-1465, (1981).
- [29] K. Yoshikawa, S. Hirota, N. Makita, Y. Yoshikawa, “*Compaction of DNA Induced by Like-Charge Protein: Opposite Salt-Effect against the Polymer-Salt-Induced Condensation with Neutral Polymer*”, J. Phys. Chem. Lett. **38**, 1763-1766 (2010).
- [30] S. Curry, P. Brick e N. Franks, “*Fatty Acid to Human Serum Albumin: New Insights from Crystallographic Studies*”, Biochim Biophys Acta. **1441**, 131-140 (1999).

Referências Bibliográficas

- [31] K. Hirayama, et all, “*Rapid Confirmation and Ravision of Primary Structure of Bovine Serum Albumin by Esims and Frit Lab Lc Ms*”, Biochemical and Biophysical Research Communications. **173**, 639-646 (1990).
- [32] D,C Carter and J. X Ho, “ *Structure of Serum-Albumin. Advances in Protein Chemistry*”, **45**, 153-203 (1994).
- [33] J. E. B. R. Júnior, “*Condensação psi do DNA um estudo teórico e experimental.*”, Tese de Doutorado, Unesp, São Jose do Rio Preto, SP, Brasil (2009).
- [34] K. Yoshikawa, S. Hirota, N. Makita, Y. Yoshikawa, “*Compaction of DNA Induced by Like-Charge Protein: Opposite Salt-Effect against the Polymer-Salt-Induced Condensation with Neutral Polymer*”, J. Phys. Chem. Lett **38**, 1763-1766 (2010).
- [35] V. A. Bloomfield, “*DNA Condensation*”, Curr. Opin. Struct. Biol. **6**, 334-341 (1996).
- [36] S. Asakura, F. Oosawa,“*On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules.* The Journal of Chemical Physics, **22**, 1255-1256, (1954).
- [37] H. N. W. Lekkerkerker, R. Tuinier, “*Colloids and the depletion interaction*”, . Springer, (2011).
- [38] S. Asakura, F. Oosawa,“*Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules.* The Journal of Polymer Science, **33**, 183-192, (1958).
- [39] M. Adams, S. Fraden,“*Phase behavior of mixtures of rods (tobacco mosaic virus) and spheres (polyethylene oxide, bovine serum albumin).* Biophysical journal, **74**, 669-677, (1998).
- [40] K. Park, H. Koerner, R. A. Vaia“*Epletion-Induced Shape and Size Selection of Gold Nanoparticles.* Biophysical journal, **10**, 1433-1439, (2010).
- [41] T. G. Mason “*Osmotically driven shape-dependent colloidal separations.* Physical Review E, **66**, 1433-1439, (2002).

Referências Bibliográficas

- [42] R. Fahraeus, S. Fraden, “*The suspension stability of the blood*. *Physiological Reviews*, **9**, 241-279, (1929).
- [43] GRAY, H. Human red blood cells. 1918. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray453-ab.png>>. Acesso em: 20 Out. 2016. a
- [44] E. S. Bedell, B. T Bush, “*Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts*. *The American journal of medicine*, **78**, 1001-1009, (1985).
- [45] A. Ashkin, “*Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*. *P. Natl. Acad. Sci*, **94**, 4853-4860, (1997).
- [46] K. Svoboda and S. M. Block, “*Biological applications of optical forces*. *Annu. Rev. Bioph. Biom.*, **23**, 247-285, (1994).
- [47] D. G. Grier, “*A revolution in optical manipulation*. *Nature.*, **424**, 810-816, (2003).
- [48] A. Mazolli and P. A. Maia Neto and H. M. Nussenzveig, “*A revolution in optical manipulation*. *Nature.*, **459**, 3021-3041, (2003).
- [49] P. A. Maia Neto and H. M. Nussenzveig, “*Theory of optical tweezers*. *Europhys. Lett.*, **50**, 702-708, (2000).
- [50] F. A. P Crisafuli, “*Caracterização das Interações do DNA com as Moléculas Actinomicina de Gelred.*”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil (2016).
- [51] M. S. Rocha, “*Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicações no estudo das interações DNA-fármacos*”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2008).
- [52] H. Faxen, “*La lévitation optique de sphères*. *Can. J. Phys.*, **57**, 1260-1279, (2000).
- [53] G. Roosen, “*he resistance against the movement of a rigour sphere in viscous fluids, which is embedded between two parallel layered barriers*. *Ann. Phys*, **10**, 89-119, (1922).

Referências Bibliográficas

- [54] N. B. Viana, “*Pinças ópticas e aplicações*”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2002).
- [55] I. D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nuñez, I. Rouzina and M. C. Williams, “*Quantifying force-dependent and zero force DNA intercalation by single - molecule stretching*. Nat. Methods, **4**, 517-522, (2007).
- [56] R. F. Bazoni, C. H. M. Lima, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “*Force-dependent persistence length of DNA intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments*. Soft Matter, **4**, 1000-1039, (2015).
- [57] D. Boal, “*Mechanics of the cell*. Cambridge University Press, (2002).
- [58] L. D. Landau and E. M. Lifshitz, “*Theory of elasticity*”, 2^a Ed., Pergamon Press, (1970).
- [59] G. Arscott, A. Z. Li, and V. A. Bloomfield, “*Condensation of dna by trivalent cations. 1. effects of dna length and topology on the size and shape of condensed particles*”, Biopolymers**30**, 619-630, (1990)
- [60] E. Plum, P. G. Arscott, and V. A. Bloomfield, “*Condensation of dna by trivalent cations. 2. effects of cation structure*”, Biopolymers **30**, 631-643, (1990)
- [61] L. Martin, M. C. Davies, B. J. Rackstraw, C. J. Roberts, S. Stolnik, S. J. B. Tendler, and P. M. Williams, “*Observation of dna polymer condensate formation in real time at a molecular level*”, FEBS Lett **480**, 106-112, (2000)
- [62] C. Gosule and J. A. Schellman, “*Compact form of dna induced by spermidine*”, Nature **259**, 333-335, (1976)
- [63] A. Bloomfield, “*Dna condensation by multivalent cations?* Biopolymers **44**, 269-282, (1997).
- [64] C. Gosule and J. A. Schellman, “*A transition to a compact form of dna in polymer solutions*”, Proc. Natl. Acad. Sci **68**, 1886-1890, (1971)

Referências Bibliográficas

- [65] A. Evilevitch, L. Lavelle, C. M. Knobler, E. Raspaud, and W. M. Gelbart, “*Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage*”, *Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9292-9295, (2003)
- [66] M. S. Rocha, A. G. Cavalcante, and R. Silva and E. Ramos, “*On the effects of intercalators in dna condensation: a force spectroscopy and gel electrophoresis study*”, *J. Chem. Phys.* **118**, 4832-4839 (2014).
- [67] . W. C. Lau¹, A. Prasad² and Z. Dogic, “*Condensation of isolated semi-flexible filaments driven by depletion interaction* ”, *EPLA*, **87**, 1886-1890, (2009)
- [68] G. Baumann, V. A. Bloomeld, S. B. Smith, C. Bustamante, M. D. Wang, and S. M. Block, “*Stretching of single collapsed dna molecules*”, *Biophys J.* **78**, 1965-1978 (2000).
- [69] Y. Murayama, H. Wada, and N. Sano, “*Dynamic force spectroscopy of a single condensed DNA*”, *Europhys. Lett.* **79**, 1902-1910 (2007).
- [70] A. Shirahata, T. J. Thomas, B. A. Todd, V. A. Parsegian, and D. C. Rau, “*Attractive forces between cation condensed DNA double helices*”, *Biophys. J.* **94**, 4775-4782 (2008).
- [71] B. Van Den Broek, M. C. Noom, J. van Mameren, C. Battle, F. C. MacKintosh, and G. J. L. Wuite,, “*Visualizing the formation and collapse of DNA toroids*”, *Biophys. J.* **98**, 1902-1910 (2010).
- [72] H. Ojala, G. Ziedaite, A. E. Wallin, Dennis, D. H. Bamford, and E. Haeggstrom, “*Optical tweezers reveal force plateau and internal friction in peg-induced DNA condensation*”, *Eur. Biophys.* **43**, 71-79 (2014).
- [73] Xu and S. J. Muller, “*Polymer-monovalent salt-induced DNA compaction studied via single-molecule microfluidic trapping*”, *Lab Chip.* **12**, 647-651 (2012).
- [74] Huet, C. Lavelle, H. Ranchon, P. Carrivain, J. M. Victor, and A. Bancaud, “*Relevance and limitations of crowding, fractal, and polymer models to describe nuclear architecture*”, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **307**, 443-479 (2014).

Referências Bibliográficas

- [75] R. Cortini, B. R. Caré, J.-M. Victor, and M. Barbi, “*Theory and simulations of toroidal and rod-like structures in single molecules dna condensatin*”, J. Chem. Phys. **142**, 1-9 (2015).
- [76] De Vries, “*Depletion-induced instability in protein-DNA mixtures: Influence of protein charge and size*”, J. Chem. Phys. **125**, 1-4 (2006).
- [77] S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, “*Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules*”, Science. **5250**, 795-799 (1996).
- [78] F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos, and M. S. Rocha, “*cisplatina interaction studied with single molecule stretching experiments*”, Integr. Biol. , 568?574 (2012).
- [79] R. Blosssey H. Schiessel, “*The dynamics of the nucleosome: thermal effects, external forces and atp*”, FEBS J. **278**, 3619-3632 (2011).
- [80] R. F. Bazoni, C. H. M. Lima, E. B. Ramos and M. S. Rocha, “*Force-dependent persistence length of DNA-intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments.*”, Soft Matter. **11**, 4306-4314.(2015).
- [81] Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, and T. Kanbe, “*Daunomycin unfolds compactly packed dna*”, Biophys. Chem. **61**, 93-100 (1996).
- [82] N. Yoshinaga, T. Akitaya, and K. Yoshikawa, “*Intercalating fluorescence dye yoyo-1 prevents the folding transition in giant duplex dna*”, Biochem. Biophys. Res. **286**, 264-267(2001).
- [83] E. F. Silva, R. F. Bazoni, E. B. Ramos, and M. S. Rocha, “*Dna - doxorubicin interaction peculiarities studied with optical tweezers, atomic force microscopy and dynamic light scattering*”, J. Phys. Chem. **117**, 1621-1632 (2016).
- [84] D. P. Snustad, M. and J. Simmons, “*Fundamentos de Genética*”, Guanabara Kogan **3**, 185-237 (2001).

Referências Bibliográficas

- [85] M. S. B. Leite , “*Estrutura da Cromatina: Ação de Detergentes e Busca Por Peptídeo Ideal Ligante Do Path Acído*”, Disertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil (2013).
- [86] F. Yanga, S. Tevesa, C. J. Kempb, and S. Henikoff, “*Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*”, *Biochim Biophys Acta.* **1841**, 84-89 (2014).
- [87] L. Martin, Bennink¹, H. Leuba, H. Leno, J. Jordanka, Z. Zlatanova , G. de Grooth¹, and J Greve¹, “*Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers*”, *Nature Structural Biology.* **8**, 606-610 (2001).
- [88] Y. Liu¹, M. Guthold, J. Matthew. S. Snyder, and H. Lu¹, “*AFM of self-assembled lambda DNA-histone networks*”, *Colloids Surf B Biointerfaces.* **134**, 17-25 (2015).
- [89] R. Lopez, Bettina, H. Lindner, S. Bartolomé, I. Ponte¹, P. Suau¹ and A. Roque¹ “*Linker histone partial phosphorylation: effects on secondary structure and chromatin condensation*”, *Nucleic Acids Research* **43**, 4463-4476 (2015).
- [90] L. Martin, L. Bennink, H. Sanford, H. Gregory, H. Leno, J. Zlatanova and J Greve “*Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers*”, *Nature Letters* **9**, 606-610 (2001).
- [91] T Misteli^{A,D}, Gunjan and T. Brown “*histone H1 to chromatin in living cells*”, *Nature* **408**, 877-881 (2000).
- [92] M. Lever, P. Th?ng and M. J. Hendzel “*Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells*”, *Nature* **408**, 873-876 (2000).
- [93] Fan, Sheila S. Teves, Christopher, J. Kemp and S. Henikoff “*Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*”, *Biochimica et Biophysica Acta* **1845**, 84-89 (2014).
- [94] R. Collepardo-Guevara[?] and T. Schlick “*The Effect of Linker Histones Nucleosome Binding Affinity on Chromatin Unfolding Mechanisms*”, *Biophysical Journal* **101**, 1670-1680 (2011).

Referências Bibliográficas

- [95] F. Yang, S. Sheila, A. Teves, A. Christopher, J. Kemp and Steven Henikoff “*Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics*”, *Biochimica et Biophysica Acta* **1845**, 84-89 (2014).
- [96] C.F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T.E. Klein, R.B. Altman “*Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, Pharmacogenet*”, *Genomics* **21**, 440-446 (2011).
- [97] C.F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T.E. Klein, R.B. Altman “*Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, Pharmacogenet*”, *Genomics* **21**, 440-446 (2011).