

LEANDRO DE OLIVEIRA

**ESPECTROSCOPIA DE FORÇA EM MOLÉCULA ÚNICA
APLICADA A INTERAÇÃO DE DNA COM DERIVADOS DE PLATINA**

*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.*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

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

T

Oliveira, Leandro de, 1986-
O48e Espectroscopia de força em molécula única aplicada a interação
2019 de DNA com derivados de platina / Leandro de Oliveira. - Viçosa, MG,
2019.

xiii, 78 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 73-78.

1. Espectroscopia de laser. 2. Pinças ópticas. 3. DNA. 4.
Cisplatina. 5. Carboplatina . I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. II.
Título.

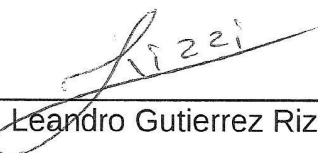
CDD 22. ed. 535.84

LEANDRO DE OLIVEIRA

**ESPECTROSCOPIA DE FORÇA EM MOLÉCULA ÚNICA APLICADA A
INTERAÇÃO DE DNA COM DERIVADOS DE PLATINA**

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*.

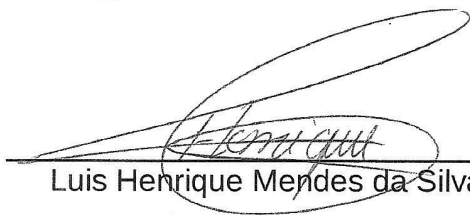
APROVADA: 26 de fevereiro de 2019.



Leandro Gutierrez Rizzi



Sukarno Olavo Ferreira



Luis Henrique Mendes da Silva



José Paulo R. Furtado de Mendonça



Márcio Santos Rocha
(Orientador)

Dedico esse trabalho ao meu melhor
amigo de uma vida inteira,
meu Pai, Fernando.

In Memoriam

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho.

– Primeiramente a minha família e em especial a meus pais: Fernando (*In Memoriam*) e Marlene, que sempre me deram apoio e condições para continuar essa tarefa, mesmo no dia em que tivemos que nos separar, conseguimos manter unidos através dos telefonemas frequentes e seções de Skype, sempre encorajando-me, para que continuasse essa luta, mesmo na reta final a qual meu melhor amigo não pode mais estar presente ao meu lado, mas sei que olha por mim lá de cima. Também as minhas irmãs, Fernanda e Sônia, que de alguma forma acho que elas se orgulham de mim (risos), pelo menos sempre me estimularam a prosseguir este caminho e que mesmo distantes dedicaram cuidados e preocupações. Sem esquecer dos pequenos sobrinhos, Bruninho, Beatriz ‘bíblica’ e Arthur ‘tutu’, que me alegravam ao saber das bagunças do dia-a-dia, quando deixavam as mães doidas(risos) e também a cada visita nos curtos períodos de ‘folga’ 1 vez ao ano.

– A minha esposa, Sumaia Suzart A. Nunesmaia, por ter me acompanhado nessa jornada desde o início, em outra cidade, outros locais, outras pessoas, outro tudo. Obrigado pelas horas abdicadas para realização desse projeto e acima de tudo por abster-se de sua família, amigos, emprego e vir comigo nessa jornada. E também por todo carinho, compreensão e companheirismo que sempre demonstrou. Sempre me lembrando que já estava próximo do fim. Obrigado Linda, por tudo! “Valeu meu parça!”

– Ao meu orientador Dr. Márcio Santos Rocha, que foi o primeiro quem me acolheu no grupo e dedicou uma parte do seu tempo para auxiliar a execução deste trabalho, sanando minhas dúvidas dotado de extrema paciência e compreensão com minhas dificuldades, sempre me apresentando novos horizontes e fazendo-me apaixonar por essa linha de pesquisa. Grato por tudo Márcio! Não teria conseguido sem sua ajuda e amizade.

– Aos novos amigos, que fui capaz de fazer e de conviver, todo o pessoal da Sala 102 durante todo esse tempo, que me acolheram e me ensinaram muito, em especial: Carlos, Vivi’s, Sylvestre ‘Selva’, Eduardo, Ana, Luana, José Roberto ‘Zé’, Rafael ‘Bacon’, Renan ‘Gordo’, Raniela, ao pessoal do IC: Rayane ‘Ray’, José Caquito ‘Zé’ e aos antigos que mesmo distantes eram amigos: Willian, Cleiton ‘Carai’, Vitor, Enesson, Audi, Lucas ‘doido’, a dupla de argentinos Arturo e Alejandro ‘bigode’ eram os mesmo nos reencontros nos finais de ano e mesmo assim eram capazes de me dar apoio.

– Não posso esquecer de dois caras que me acolheram em viçosa na minha chegada, e permitiram viver 3 meses de insanidade: o mineirim de Jequeri, Fabricio Leão ‘Zero-Meia’ e o carioca Rodrigo ‘Viado-Medeiros’. Obrigado a vocês dois por tudo que pudemos compartilhar no meu curto período de república... ótima amizade e rodas de conversas e mudanças usando carrinho de super-

mercado. E vários planos de negócios! Vocês são du Karalho! Melhor Batalhão!

– Ao Marcos do programa de Pós-graduação, sempre presente e disposto a auxiliar na parte burocrática.

– A CAPES, CNPQ, e FAPEMIG pelo apoio financeiro a este projeto.

– A Universidade Federal de Viçosa, pelo espaço cedido e condições disponibilizadas.

– E principalmente a todo o grupo de pesquisa da Sala 103: Laboratório de Física Biológica, LFB-UFV!

*Assim como uma grande bagagem, levo comigo
grandes amigos, que mais parecem irmãos!
Não é um grupo grande não! Mas um grupo
de notável admiração!*

*Que gostavam de dizer num bar, entre rodadas de cerveja,
no intervalo entre uma canção ou outra, ou mesmo na
pausa para o café, que se repetia todos os dias
depois do meio-dia, ou nos momentos em busca de fé
que dividíamos, que dias melhores virão!
“A gente se fudeu aqui, mas se divertiu nessa porra!”
“Sentirei falta de vocês meus amigos!”*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	4
2 METODOLOGIA	5
2.1 Teoria de pinças ópticas	5
2.1.1 Teoria da Óptica Geométrica (OG)	9
2.1.2 Teoria Rayleigh	10
2.1.3 Teoria MDSA	10
2.2 Montagem experimental	11
2.3 Análise experimental	13
3 A Molécula de DNA	15
3.1 Abordagem histórica	15
3.1.1 DNA do vírus λ	17
3.2 Mecânica de polímeros	17
3.2.1 Modelo WLC - Worm-Like Chain	19
4 Rotina Experimental	22
4.1 Preparação de Amostra	22
4.2 Procedimento Experimental	22
5 Análises e Resultados	25
5.1 Cisplatina $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$	25
5.1.1 Interação DNA-Cisplatina	26
5.2 Carboplatina $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$	35
5.2.1 Interação DNA-Carboplatina	36
5.2.2 Paralelo comparativo entre Carboplatina e Cisplatina	40
5.3 Oxaliplatina $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$	43

5.3.1	Interação da molécula de DNA e Oxaliplatina	44
5.4	Paralelo comparativo entre Oxaliplatina, Carboplatina e Cisplatina no Regime Entrópico	48
5.5	Paralelo comparativo entre Oxaliplatina, Carboplatina e Cisplatina no Regime Entálpico	51
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	Apêndice	57
	Apêndice A - Outra abordagem sobre a Teoria de Pinça Óptica	57
	Apêndice B - Calibração da pinça óptica	60
	Apêndice C - Modelo de Hill	63
7	Artigos Publicados	66
8	Artigos Submetidos	67
9	REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

2.1	Esquema do aprisionamento da microesfera no foco do feixe de luz, devido ao equilíbrio entre as duas forças que surgem devido aos raios refletidos (Pressão de Radiação) e aos raios refratados (Força de Gradiente) sobre a microesfera.	7
2.2	Esquema de ação da <i>pressão de radiação</i> . A força resultante neste caso, age empurrando a microesfera no sentido de incidência do feixe.	8
2.3	Esquema de ação da <i>força de gradiente</i> em ação numa microesfera: a) abaixo da região do foco e b) acima da região do foco. A força resultante neste caso, age empurrando a microesfera na direção do foco.	9
2.4	Esquema do aparato experimental utilizado nas medidas.	12
3.1	Figura adaptada[1], da molécula de DNA, com pareamento das moléculas das bases nitrogenadas.	17
3.2	Do lado esquerdo, temos o esquema do comprimento de contorno L_o . Enquanto do lado direito, apresentamos o esquema para o comprimento de persistência A	18
4.1	Esquema do porta-amostra e a solução de λ -DNA com microesferas.	23
4.2	Configurações para o DNA em meio a solução de microesferas.	23
4.3	Esquema do experimento de estiramento da molécula de DNA num regime quase-estático.	24
5.1	Apresentamos em (a) a fórmula estrutural plana e inerte de Cisplatina, enquanto em (b) temos sua forma ativa.	25
5.2	Comparativo dos nossos dados de comprimento de persistência para DNA-Cisplatina com um trabalho anterior do grupo[2], ambos normalizados, mostrando a reprodutibilidade do experimento.	27
5.3	Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[Na] = 150$ mM.	28
5.4	Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[Na] = 10$ mM.	29
5.5	Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[Na] = 1$ mM.	29
5.6	Constante de ligação K como função da concentração de sal, em escala log-log.	31
5.7	Comprimento de persistência na saturação A_1 (quadrados azuis) e expoente de Hill (n) (círculos negros) como função da concentração de contra-íon.	31
5.8	Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[Na] = 150$ mM.	33

5.9 Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de [Na] = 10 mM.	34
5.10 Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de [Na] = 1 mM.	35
5.11 Apresentamos em (a) a fórmula estrutural plana e inerte de Carboplatina, enquanto em (b) temos sua forma ativa.	36
5.12 Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Carboplatina em solução de [Na] = 150 mM.	37
5.13 Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Carboplatina em solução de [Na] = 1 mM	38
5.14 Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Carboplatina em solução de [Na] = 150 mM.	39
5.15 Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Carboplatina em solução de [Na] = 1 mM.	39
5.16 (a) Cisplatina. (b) Carboplatina.	40
5.17 Paralelo comparativo do comprimento de persistência como função da concentração de Fármaco entre a Cisplatina e Carboplatina. a) PBS 150 mM, b) PBS 1 mM.	41
5.18 Paralelo comparativo do comprimento de contorno como função da concentração de Fármaco entre a Cisplatina e Carboplatina. a) PBS 150 mM, b) PBS 1 mM.	42
5.19 Apresentamos em (A) a fórmula estrutural plana e inerte de Oxaliplatina, enquanto em (B) temos sua forma ativa.	44
5.20 Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Oxaliplatina em solução de [Na] = 150 mM.	45
5.21 Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Oxaliplatina em solução de [Na] = 1 mM	46
5.22 Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Oxaliplatina em solução de [Na] = 150 mM.	47
5.23 Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Oxaliplatina em solução de [Na] = 1 mM.	47
5.24 (a) Cisplatina. (b) Carboplatina. (c) Oxaliplatina.	48
5.25 Paralelo comparativo do comprimento de persistência como função da concentração de Fármaco entre a Cisplatina, Carboplatina e Oxaliplatina. a) PBS 150 mM, b) PBS 1 mM.	49
5.26 Paralelo comparativo do comprimento de contorno como função da concentração de Fármaco entre a Cisplatina, Carboplatina e Oxaliplatina. a) PBS 150 mM, b) PBS 1 mM.	50

5.27	Curva de força por extensão de DNA-Cisplatina em PBS [Na] = 1 mM depois de 0.5 horas (Círculos pretos), 5 horas (quadrados vermelhos) e 15 horas (losangos azuis) de incubação.	52
5.28	Curva de força por extensão de DNA-Oxaliplatina em PBS [Na] = 1 mM depois de 0.5 horas (Círculos pretos), 5 horas (quadrados vermelhos) e 15 horas (losangos azuis) de incubação.	53
5.29	Curva de força por extensão de DNA-Carboplatina em PBS [Na] = 1 mM depois de 0.5 horas (Círculos pretos), 5 horas (quadrados vermelhos) e 15 horas (losangos azuis) de incubação.	53
6.1	(a) Microesfera aprisionada na posição de equilíbrio imersa no poço de potencial criado pela pinça óptica. (b) Situação em que a microesfera é colocada em movimento, logo sofre ação do fluido e tende a alcançar uma nova posição de equilíbrio dentro do poço de potencial. Deste modo, na nova posição de equilíbrio, a força de Stokes, $\vec{F}_{Stokes}$ é igual em módulo, à força óptica, $\vec{F}_{OP}$ aplicada.	60
6.2	Ligações simultâneas de moléculas de Oxigênio à Hemoglobina.	63

LISTA DE TABELAS

5.1	Parâmetros físicos obtidos com base nas concentrações iônicas e suas respectivas barras de erros	28
5.2	Parâmetros físicos obtidos para interação DNA-Carboplatina com base nas concentrações iônicas e suas respectivas barras de erros	37
5.3	Parâmetros de ligação obtidos pelo modelo teórico para $[Na] = 150 \text{ mM}$	41
5.4	Parâmetros de ligação obtidos pelo modelo teórico para $[Na] = 1 \text{ mM}$	42
5.5	Parâmetros físico-químicos obtidos para interação DNA-Oxaliplatina com base nas concentrações iônicas e suas respectivas barras de erros	45
5.6	Parâmetros de ligação obtidos pelo modelo teórico para $[Na] = 150 \text{ mM}$	49
5.7	Parâmetros de ligação obtidos pelo modelo teórico para $[Na] = 1 \text{ mM}$	50

RESUMO

OLIVEIRA, Leandro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Espectroscopia de força em molécula única aplicada a interação de DNA com derivados de Platina.** Orientador: Márcio Santos Rocha.

Neste trabalho, estudamos a interação da molécula de DNA com alguns fármacos de Platina. Nós utilizamos espectroscopia de força de molécula única, que permite manipular pequenas partículas de escala micrométrica. Dessa forma, conseguimos estabelecer uma análise sob as alterações ocorridas no experimento de estiramento para as propriedades mecânicas dos complexos DNA-fármacos formados, e descrevê-los como função de alguns parâmetros de interesse, tais como: tempo de difusão do fármaco, concentração de fármaco em solução, dentre outros. A essas alterações é proposto um modelo teórico para avaliar as mudanças em um dos parâmetros mecânicos, o comprimento de persistência, como função da concentração do fármaco utilizado. Com base nesse e em outro parâmetro mecânico, o comprimento de contorno, essa análise se torna uma poderosa ferramenta e permite verificar ainda, as propriedades relacionadas ao modo de ligação, o estado de compactação da molécula, a cinética da reação. Nossa análise envolveu fármacos comumente utilizados em tratamentos quimioterápicos derivados de um mesmo elemento químico, a Platina: Cisplatina, Carboplatina, Oxaliplatina. Todos os experimentos foram realizados sob mesmas condições, envolveram soluções tamponadas de diferentes concentrações iônicas e foram realizados para dois diferentes regimes de forças: entrópico e entálpico.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Leandro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Force spectroscopy in single molecule applied to the interaction of DNA with derivatives of Platinum.** Adviser: Márcio Santos Rocha.

In this work, we studied the DNA molecule with some Platinum drugs. We use single molecule force spectroscopy, which allows manipulating small particles of micrometer scale. Thus, we were able to establish an analysis of the changes that occurrrs in stretching experiments for the mechanical properties of the DNA-drug complexes formed and to describe them as a function of some parameters of interest, such as time of drug diffusion, drug concentration in solution, among others. A theoretical model is proposed to evaluate the changes in one of the mechanical parameters, the persistence length, as a function of the drug concentration used. Based on this and on another mechanical parameter, the contour length, this analysis becomes a powerful tool and allows to verify properties related to the binding mode, the compaction state of the molecule and the kinetics of the reaction. Our analysis involved drugs commonly used in chemotherapeutic treatments derived from the same chemical chain, based on Platinum: Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin. All experiments were carried out under the same conditions, involving buffered solutions of different ionic concentrations and were performed for two different regime of forces: entropic and enthalpic

1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, várias pesquisas tem sido realizadas, algumas delas envolvendo duas grandes áreas da ciência, a Física e a Biologia. Em meados de 1969, Arthur Ashkin et. al [3], foi quem utilizou pela primeira vez um laser de argônio de 1 watt de potência, o qual possibilitou o aprisionamento e manipulação de pequenas partículas dielétricas[3]. Essa notícia na comunidade científica gerou um enorme fascínio aos pesquisadores, devido justamente a grande aceleração que as partículas alcançavam quando atingidas. Isso abriu um novo leque para pesquisas que ficou conhecido como técnica de pinçamento óptico. Este feito rendeu a Ashkin o Premio Nobel de Física do ano de 2018[4].

Ashkin definiu de maneira muito simples a técnica como sendo um feixe de laser fortemente focalizado através de uma lente objetiva, sendo assim passível de manipulação e aprisionamento as pequenas partículas. Entretanto, foi na Biologia que surgiu sua grande utilidade. Por volta de 1987, Ashkin et.al [5, 6] realizaram a micromanipulação de partículas biológicas com ajuda de uma lente objetiva de um microscópio próximo a região focal do feixe do laser. Essa análise permitiu inferir propriedades ainda desconhecidas sobre os sistemas biológicos.

Os trabalhos de Watson e Crick [7, 8](1953) sobre a estrutura do DNA incentivaram ainda mais as pesquisas. A necessidade de se conhecer o comportamento nos processos das atividades celulares se tornou interesse de muitas áreas do conhecimento. Como as interações por exemplo: do DNA com ligantes como fármacos e proteínas. Este estudo veio com grande interesse devido às aplicações na medicina, especialmente em terapias gênicas e tratamentos quimioterápicos. Atualmente, a técnica de pinçamento óptico possui inúmeras aplicações em vários tipos de experimentos e, no nosso caso, utilizamos a pinça óptica para realizar estiramento da molécula de DNA com intuito de obter informações sobre propriedades mecânicas da molécula ao interagir com os fármacos mais utilizados pela indústria farmacêutica no tratamento de câncer.

Durante os últimos anos, outros tipos de técnicas foram desenvolvidas além da pinça óptica (do inglês, *optical tweezers*), como a pinça magnética (do inglês, *magnetic tweezers*) e AFM (do inglês, *atomic-force microscopy*), aplicadas a sistemas biológicos em estudo de interações de patógenos causadores de doenças com a membrana celular, estudos de regulação osmótica celular, dentre outros[9, 10]. Em observações realizadas a respeito dos efeitos de fármacos sobre o λ -DNA, notou-se que a estrutura secundária varia conforme a concentração de fármaco utilizada. Para a Cisplatina, fármaco mais comumente usada em tratamentos anti-câncer, foi possível observar que sua citotoxicidade é proveniente da formação de aductos¹ com a molécula de DNA. Também notou-se que o

¹Espécie de ligação covalente entre fármacos e bases nitrogenadas do molécula de DNA. Existem ainda os chamados monoadductos, quando há apenas uma ligação química e os diadductos, quando há duas ligações químicas entre o DNA e o ligante.

DNA reage diferentemente com a concentração e fármaco, sendo que para baixas concentrações temos a molécula de DNA mais flexível com uma forma mais retilínea da cadeia, enquanto numa concentração mais elevada ocorre o fenômeno de condensação da estrutura dupla hélice, com formação de micro-loops e cross-link² é uma característica importante da interação DNA-Cisplatina. Esse mesmo caminho é esperado para outros compostos derivados de Platina, tais como a Oxaliplatina e Carboplatina, conforme estudo relatado por Hou et al.[11].

Esse efeito de formação de micro-loops e crosslink ocorre quando a Cisplatina é ativada numa solução aquosa os dois íons de cloretos se dissociam do composto original, dando lugar a duas moléculas de água ou íons hidroxilas. Na reação da Cisplatina em estado ativo em solução com o DNA, as moléculas de água são substituídas na posição do N7 átomo de guanina ou adenina para formação dos monoaductos e diaductos, formando um DNA com ligação cruzadas (do inglês, *cross-link*) entre cadeias (do inglês, *interstrand*) com átomos idênticos opostos a uma distância média de 0.7 nm[12]. Outros estudos realizados avaliaram a dependência das concentrações de sal e suas alterações induzidas na molécula de DNA em presença de fármaco em solução como realizado por Hatch et al.[13].

Neste trabalho, utilizamos fármacos derivados de um mesmo elemento químico usados em tratamentos de doenças humanas (quimioterapias e/ou terapias gênicas), a Platina, sendo eles: a Cisplatina, fármaco mais comumente utilizada em tratamentos anti-câncer, como exemplo: cabeça, cervical, ovários, pescoço, pulmão e testículos [14, 15]; a Carboplatina, uma Platina de 2^a geração, apresenta atividade tumoral equivalente a Cisplatina, todavia, com menor nefrotoxicidade [16, 17, 18] ; e Oxaliplatina, uma Platina de 3^a geração, que expressa uma maior eficácia no combate a alguns tipos específicos de câncer quando comparado a Cisplatina e Carboplatina[19], e também possui uma nefrotoxicidade quase desprezível [20, 21].

Nosso interesse nesse trabalho foi realizar um estudo dos efeitos causados pela interação destes fármacos com a molécula de DNA via experimentos de estiramentos de moléculas únicas, realizados com uso da técnica de pinça óptica (do inglês, *Optical Tweezers*). Este experimento permite obter as propriedades mecânicas dos compostos fármaco-DNA sob diferentes concentrações iônicas. Uma vez sendo conhecida a constante de força da pinça óptica é possível traçar as curvas de força $\times$ extensão para interação de complexos únicos de DNA-fármacos, tal que ajustamos as curvas com auxílio do modelo teórico de Marko e Siggia[22] e extraímos dois importantes parâmetros mecânicos: o comprimento de contorno e o comprimento de persistência. Todos os detalhes destes procedimentos serão discutidos nos Capítulos 2,3,4.

Em resumo, no Capítulo 2, discutimos o princípio de funcionamento e uma breve abordagem da técnica de pinça óptica e as teorias envolvidas.

No Capítulo 3, abordaremos aspectos importantes sobre a molécula de DNA e discutiremos

²Cross-link ocorre quando duas partes diferentes da molécula de DNA ficam unidas por um diaducto, na forma de ligação cruzada na molécula.

os aspectos físicos e matemáticos relevantes para a modelagem da molécula como polímero.

No Capítulo 4, abordamos a rotina experimental, desde o início da confecção da amostra até o procedimento experimental.

No Capítulo 5, apresentamos a análise de resultados e discutimos a interação do DNA com os fármacos.

Finalmente, no Capítulo 6, apresentamos as conclusões deste trabalho.

No Capítulo 7, apresentamos os trabalhos publicados.

Por fim no Capítulo 8, os trabalhos atualmente submetidos para publicação.

1.1 Objetivos

Esta trabalho, tem como objetivo o estudo dos parâmetros mecânicos e físico-químicos na formação do complexo DNA-fármaco com a utilização da técnica de pinça óptica que permite a micromanipulação de partículas únicas.

Vale ressaltar, que os fármacos utilizados no estudo são todos derivados de Platina, e comumente usados em tratamentos quimioterápicos. São eles: Cisplatina, Carboplatina e Oxaliplatina.

Deste modo, podemos estabelecer uma análise sobre as alterações ocorridas nas propriedades mecânicas e físico-químicas dos complexos DNA-fármaco, e descrevê-los como função das alterações nos parâmetros de interesse, tais como: concentração do fármaco e de íons da solução salina.

2 METODOLOGIA

Neste capítulo, faremos uma breve introdução a respeito da teoria de pinçamento óptico. Também abordamos as teorias aproximadas, como a Óptica Geométrica e a Teoria de Rayleigh e ainda a teoria mais completa, a Teoria MDSA. Mostraremos também a montagem experimental utilizada com suas características e o procedimento de calibração do experimento.

2.1 Teoria de pinças ópticas

Era meados do século XIX, quando surgiu a teoria eletromagnética implementada por James Clerk Maxwell, foi demonstrado teoricamente que a luz era capaz de transferir momento para um meio ao incidir sobre este, assim exercendo uma força sobre o meio. À vista desse fato, temos a base do pinçamento óptico, quando um feixe de luz fortemente focalizado transfere momento pra uma micropartícula, exercendo assim uma força.

Essa força vai depender da potência da luz incidente e da velocidade de propagação no meio de incidência. Quanticamente, entendemos que a origem do fenômeno do pinçamento óptico decorre do fato que a luz transporta momento linear em seus fótons e dessa forma é capaz de exercer força sobre objetos ao transferir momento a eles. Isso é verificável experimentalmente, utilizando feixes muito intensos, provenientes de lasers com alguns mW³ de potência, e pequenos objetos na escala de micrômetros⁴, como no nosso caso uma microesfera de poliestireno, que se comporta como uma partícula dielétrica. Assim sendo, cada fóton do feixe possui momento linear ($\vec{p}$) dado por

$$\vec{p} = \hbar \vec{k} \quad (2.1)$$

sendo $\vec{k}$ o vetor de onda e $\hbar$ a constante de Planck dividida por 2π . Em módulo, pode-se reescrever como

$$p = \hbar k = \hbar \frac{w}{c} = \frac{E}{c} \quad (2.2)$$

tal que c representa a velocidade da luz, w a frequência angular da luz incidente e a energia dada para cada fóton como $E = \hbar w$. Agora para um feixe de luz formado por N fótons, teremos que $E_{tot} = N\hbar w = NE$.

Deste modo, a força total exercida por um feixe dotado de N fótons por segundo incidindo sobre a microesfera pode ser obtida a partir da equação (2.2). Aplicando a 2ª Lei de Newton, teremos

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{E_{tot}}{c} \right) = \frac{P_{tot}}{c}, \quad (2.3)$$

³Potência típica usada nesse tipo de experimento. 10^{-3} W. No SI $W = [J/s]$ e $J = [kg.m^2/s^2]$.

⁴Micrômetro = 10^{-6} m.

sendo P_{tot} é a potência total do feixe incidente.

Normalmente, a estimativa para o valor da força na equação (2.3) em experimentos que envolvem material biológico é dada por

$$F \approx \frac{1 \times 10^{-3} W}{3 \times 10^8 m/s} \approx 10^{-11} N = 10 \text{ pN}^5. \quad (2.4)$$

Esta é de fato a magnitude típica das forças num experimento de pinças óptica, ou seja, na escala de pico-Newtons.

De forma qualitativa, a técnica de pinça óptica está relacionada com a análise das forças que atuam sobre a microesfera. Inicialmente para vários raios incidentes atingindo a microesfera numa interface entre dois meios, origina raios refletidos e raios refratados. A primeira força, chamada pressão de radiação, observando apenas um único raio refletido pode ser descrita como

$$F \propto \frac{P_{raio}}{v}, \text{ tal que } v = \frac{c}{n_m} \quad (2.5)$$

sendo P_{raio} a potência do raio e n_m o índice de refração do meio de incidência.

Por outro ponto de vista, a luz é capaz de exercer um segundo tipo de força sobre um objeto, devido agora aos raios refratados. Esta força surge devido ao fato do momento linear total do sistema raio-objeto ter que ser conservado. Assim observando um único feixe de luz incidente, ao atingir o objeto é refratado e então geralmente desviado de sua trajetória original se o índice de refração do objeto e o índice de refração do meio forem diferentes. Dessa forma, o momento linear do raio refratado será em uma direção diferente do raio incidente. Assim, pela 2ª Lei de Newton, o objeto sofrerá uma variação de momento de mesmo módulo e sentido contrário à variação de momento do raio. Em resumo, temos que uma certa força atua sobre a partícula impondo uma variação no seu momento.

Vale relembrar, que toda nossa análise anterior foi realizada para uma partícula dotada de massa, no caso experimental, usamos microesferas de poliestireno da ordem de μm . Também vem ao caso, que o esquema utiliza apenas um único raio. Imaginemos agora, ao invés de um único raio, temos um feixe de luz composto por diversos raios, focalizados em um certo ponto. Seja esse certo ponto nossa microesfera, atingida pelos nossos raios que compõe o feixe, então teremos que cada raio incidente sobre a microesfera origina um raio refletido e um raio refratado. Dessa forma, os raios refletidos, dão origem à pressão de radiação, enquanto que os raios refratados, originam forças de gradiente, que tendem a mover a microesfera para o foco do feixe quando o índice de refração da microesfera for maior que o índice de refração do meio que a cerca. A competição entre essas duas forças, pressão de radiação e força de gradiente, é o que fundamenta a origem do pinçamento óptico conforme a Figura (2.1).

⁵Pico-Newton = 10^{-12}N .

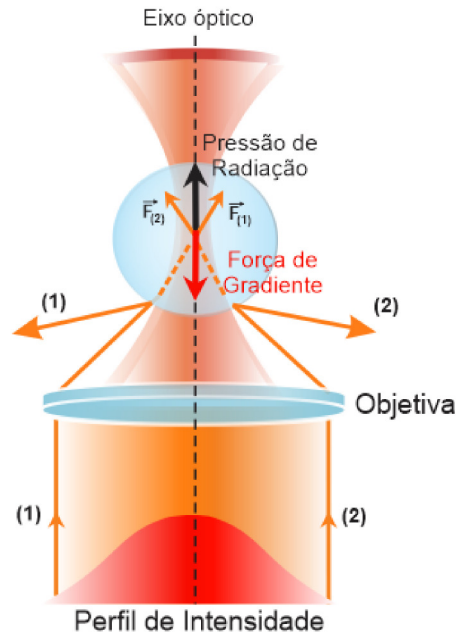


Figura 2.1: Esquema do aprisionamento da microesfera no foco do feixe de luz, devido ao equilíbrio entre as duas forças que surgem devido aos raios refletidos (Pressão de Radiação) e aos raios refratados (Força de Gradiente) sobre a microesfera.

A fim de elucidar melhor este efeito, começaremos analisando o fenômeno sob o regime da óptica geométrica. A Figura (2.2) apresenta dois raios do feixe de laser gaussiano incidindo sobre a lente em extremidades opostas, bem como os raios refletidos na superfície da microesfera dielétrica. Em virtude dos efeitos de reflexão, os desvios dos raios originam as forças que agem sobre a microesfera. O raio (1) dá origem à força $\vec{F}_1$ sobre a microesfera, enquanto o raio (2) exerce a força $\vec{F}_2$. Assim, a força resultante, nesse caso, tende a empurrar a microesfera no sentido de incidência do feixe e recebe o nome de Pressão de Radiação.

Agora, concluindo a análise no limite da óptica geométrica, vamos examinar os efeitos da refração dos raios sobre a microesfera. Temos pela Figura (2.3) uma microesfera situada numa região abaixo do foco e deslocada do eixo central do perfil de intensidade do laser da pinça óptica. O raio incidente central (1) sofre um desvio em sua trajetória ao passar pela microesfera, portanto haverá uma variação em seu momento linear. Como o momento linear total do sistema raio-microesfera deve ser conservado, ocorrerá o surgimento de outra variação de momento linear sobre a microesfera de mesmo módulo e sentido oposto à variação do momento linear do raio (1). Na verdade, isso ocorre originando a força $\vec{F}_1$ como apresenta a Figura (2.3). O mesmo ocorre com o raio (2), proveniente da outra extremidade. No entanto, como temos um perfil gaussiano de intensidade para o laser, o raio proveniente da região central terá uma força $\vec{F}_1$ maior, em módulo, que a força $\vec{F}_2$ do outro raio (2) provindo das extremidades da lente. Assim, a força resultante aponta para a esquerda e para cima, empurrando a microesfera para a região do foco do feixe.

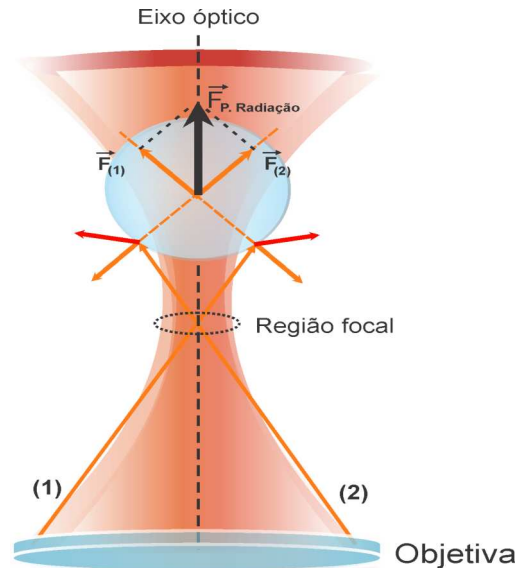


Figura 2.2: Esquema de ação da *pressão de radiação*. A força resultante neste caso, age empurrando a microesfera no sentido de incidência do feixe.

Para situação que a microesfera ultrapassa a região do foco, teremos o caso da Figura (2.3)B. Perceba o que ocorre nessa situação, temos que a esfera situada acima do foco é similar ao que acontece quando situada abaixo da região focal, ou seja, do mesmo modo que o anterior, surgirão forças sobre a microesfera de forma a conservar seu momento linear total do sistema raio-microesfera. Agora no entanto, com a microesfera situada em uma região acima do foco, a força resultante sobre a microesfera apontará para baixo, de forma a empurrar novamente a microesfera na direção da região focal do feixe de laser. Dessa forma, através das análises realizadas no limite da óptica geométrica na Figura (2.3), quando o raio da microesfera é muito maior que o comprimento da luz incidente ($a \gg \lambda$), é possível entender as condições reais necessárias para o aprisionamento próximo a região focal de micropartículas. Na prática essas são as condições necessárias para que ocorra o pinçamento óptico.

Segundo Rocha [23, 24], para o raio da microesfera muito menor que o comprimento de onda da luz incidente ($a \ll \lambda$), estamos trabalhando no limite Rayleigh, dessa forma, a microesfera assume um comportamento de um dipolo elétrico induzido sob ação de um campo elétrico, sendo sua força proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico associado à onda eletromagnética incidente. O que em resumo, faz com que a microesfera se mova em direção de maior intensidade do campo, isto é, em direção ao foco[25]. Consequentemente, o efeito resultante será o aprisionamento da microesfera na região focal. Uma outra abordagem, um pouco mais complexa, pode ser encontrada no **Apêndice A**, no qual desenvolvemos a análise com base nos tensores de stress de Maxwell para tratar a força de pressão de radiação e força de gradiente.

Por último, as pinças ópticas [26, 27] veem se tornando uma importante ferramenta na manipulação de pequenos objetos, tanto que recentemente, em 2018, foi contemplada com o Prêmio

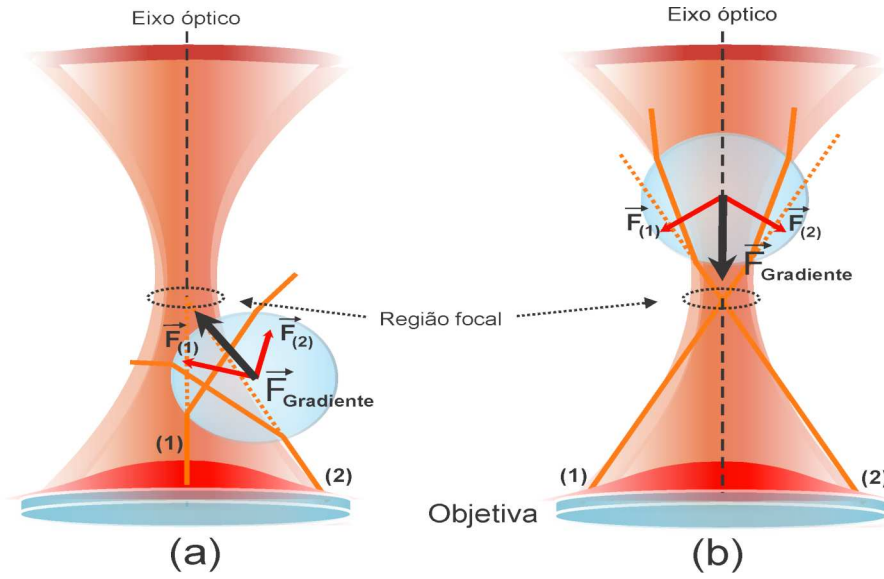


Figura 2.3: Esquema de ação da *força de gradiente* em ação numa microesfera: a) abaixo da região do foco e b) acima da região do foco. A força resultante neste caso, age empurrando a microesfera na direção do foco.

Nobel de Física[4] entregue à Arthur Ashkin pelas suas contribuições[3, 5, 6]. Suas aplicações podem ser encontradas em diversas áreas de pesquisa[9, 28, 29].

2.1.1 Teoria da Óptica Geométrica (OG)

Em uma situação em que as microesferas utilizadas possuem raio a muito maior que o comprimento de onda (λ) do feixe incidente, ou seja, com $a \gg \lambda$ todas as análises podem ser realizadas sobre a óptica geométrica. Dessa forma, deve-se levar em consideração as múltiplas reflexões e refrações no interior da esfera para se obter a força exercida na superfície de separação meio-esfera por um único feixe. Em seguida, para se obter a força total para todo o feixe, realiza-se uma integral da força. Mais informações em detalhes sobre o regime da óptica geométrica podem ser encontrados no trabalho de Ashkin[6].

Ashkin [3, 5, 6] em seus trabalhos, determinou estas forças tanto analiticamente como numericamente. Com base na expressão obtida para a força exercida pela pinça óptica sobre a microesfera é possível determinar a constante de força da pinça óptica (k_x) que age numa determinada direção como:

$$k_x = - \left(\frac{\partial F_x}{\partial x} \right)_{\vec{r}_{eq}} \quad (2.6)$$

sendo $\vec{r}_{eq}$ é a posição de equilíbrio da microesfera aprisionada pela pinça.

Dessa forma, obtiveram que para o regime da óptica geométrica, a constante da força é inversamente proporcional ao raio a da microesfera aprisionada, logo

$$k_{OG} \propto \frac{1}{a} \quad (2.7)$$

assim, a curva $k_{OG} \times a$ se apresenta como sendo uma hipérbole.

A teoria de óptica geométrica é a mais simples quando comparada a teorias mais recentes, à exemplo a Teoria MDSA (Mie Debye Spherical Aberration) [30, 31, 32].

2.1.2 Teoria Rayleigh

Em contrapartida, para situação em que as microesferas possuem tamanho muito menor que o comprimento de onda do feixe incidente ($a \ll \lambda$), o tratamento pela óptica geométrica falha. Logo, nesse caso tomamos por uma excelente aproximação o tratamento da microesfera como sendo um dipolo induzido imerso num campo elétrico aproximadamente uniforme. Segundo Rocha[23] e Mazolli[32], essa consideração pode ser tomada devido a lenta variação espacial do campo elétrico na região próxima a esfera. Com isso determina-se a força que um campo elétrico externo exerce sobre o dipolo induzido, neste caso, sobre a microesfera, e fazendo uso da equação (2.6), torna-se possível determinar a constante de força da pinça óptica, como sendo:

$$k_x = \frac{K-1}{K+2} a^3 \left(\frac{\partial^2 E^2}{\partial x^2} \right)_{\vec{r}_{eq}}, \text{ sendo } K = \frac{\epsilon}{\epsilon_m}, \quad (2.8)$$

sendo ϵ e ϵ_m as permissividades elétrica do material da esfera e do meio que a circunda, respectivamente.

A aproximação de campo uniforme é usada apenas para determinar o momento de dipolo induzido sobre a microesfera, caso contrário um campo elétrico constante resultaria num valor nulo para a derivada parcial da equação (2.8). Atente também que a constante de força no eixo-x está vinculada a componente x do Laplaciano E^2 , isto é, a constante de força é proporcional ao Laplaciano da intensidade do campo ($I \propto E^2$), em outras palavras, a força deve ser proporcional ao gradiente da intensidade do campo. Essa condição garante que a ação da força sobre a microesfera aponte para o ponto de maior intensidade do campo, o foco.

Outra análise que é permitida, é quanto ao regime Rayleigh, sendo a constante da força da pinça óptica proporcional ao cubo do raio da microesfera aprisionada, ou seja, $k_{Rayleigh} \propto a^3$, resultado diferente do esperado pela óptica geométrica.

2.1.3 Teoria MDSA

Até agora, analisamos apenas as microesferas com $a \gg \lambda$ (sob regime da óptica geométrica) e com $a \ll \lambda$ (sob regime Rayleigh). No entanto, esferas de tamanhos arbitrários também são utilizadas nos experimentos. Por conseguinte, seria útil que existisse uma teoria capaz de descrever

a constante da força para experimento de pinça óptica para qualquer tamanho de microesferas. Isso foi exatamente o que A. Mazolli, P. A. M. Neto e H. M. Nussenzveig [30, 31, 32] fizeram.

Em um trabalho realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, calcularam as forças axial e transversa que agem sob a microesfera com raio e índice de refração arbitrário num experimento de pinça óptica. Eles se basearam na representação de Debye para feixe focalizado além da objetiva e na teoria de espalhamento Mie que trata a interação do feixe com a microesfera, também levaram em conta os efeitos de aberração esférica⁶ da luz devido à refração na superfície de interação, interface, vidro-água do porta amostra. Outra consideração foi levar em conta a condição do seno de Abbe⁷ da objetiva do microscópio. A essa teoria deu-se o nome *Teoria MDSA* (que são as iniciais de Mie-Debye Spherical Aberration). Dessa forma, fica possível calcular a constante de força da pinça óptica através da equação (2.6).

Atualmente a teoria MDSA⁺ [33] é a mais completa e mais geral que existe hoje para experimentos de pinça óptica, permitindo o uso de microesferas em qualquer faixa de tamanho e com qualquer índice de refração. Lembrando que para $a \gg \lambda$ a teoria MDSA se reduz a Óptica Geométrica, enquanto $a \ll \lambda$ se reduz a Rayleigh. Mais detalhes podem ser encontrados nas referências citadas acima.

2.2 Montagem experimental

A Figura (2.4) representa um esquema do aparato experimental utilizado em nossas medidas.

A região delimitada pelas linhas pontilhadas esboça o microscópio utilizado (Nikon Eclipse Ti-U, com óptica corrigida no infinito, objetiva com aumento de 100X e abertura numérica⁸ $NA = 1,4$). Essa, é responsável por focalizar o feixe de laser infravermelho e aprisionar micropartículas na região focal.

A radiação é emitida pelo laser infravermelho (IV), que possui comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm com potência máxima de 2 W que opera no modo TEM_{00} . A radiação emitida ainda passa por um conjunto óptico, ou caminho óptico, que possibilita o alinhamento da pinça óptica.

O caminho óptico apresenta uma primeira lente, lente 1 (L_1), que expande o diâmetro do feixe do laser, enquanto a lente 2 (L_2) corrige a divergência do laser tornando-o cilíndrico. E_1 e E_2 são os espelhos que permitem ajustar o alinhamento da pinça óptica.

O feixe de luz adentra o microscópio e encontra o primeiro componente óptico, E_3 , um

⁶Aberração esférica é uma aberração óptica resultante do fato dos raios incidentes em regiões próximas à borda das lentes são muito mais refratados do que os raios que incidem próximos ao eixo óptico central, da mesma forma que os raios serem de luz incidentes próximos a região das bordas em espelhos são refletidos além do foco. No nosso caso, a mais importante ocorre na interface entre o líquido da amostra e a lamínula de vidro.

⁷A relação do seno de Abbe é uma condição que deve-se cumprir para lentes e outros sistemas ópticos para poder produzir imagens nítidas de objetos em ambos eixos ópticos.

⁸Abertura numérica é um parâmetro adimensional que caracteriza o intervalo de ângulos sobre os quais o sistema pode receber ou emitir luz, definido por $NA = n(\sin \theta)$, sendo n o índice de refração do meio do qual esta trabalhando, θ o semi-ângulo do cone máximo de luz.

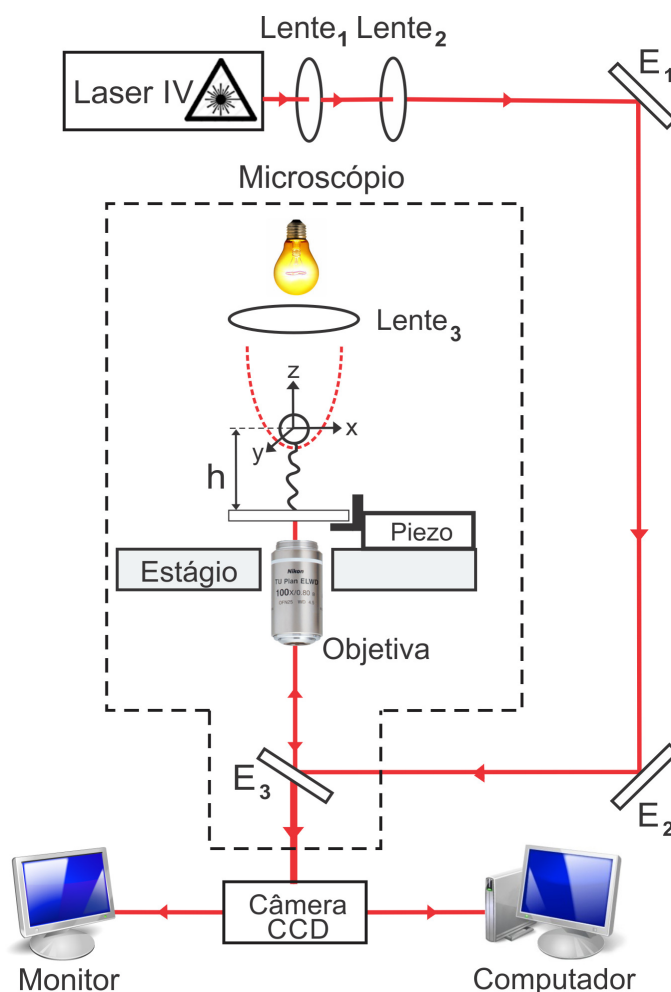


Figura 2.4: Esquema do aparato experimental utilizado nas medidas.

espelho dicróico⁹ que apresenta alta reflectância para luz do tipo infravermelho e ao mesmo tempo é transparente para luz visível. Em sequência, encontra a objetiva do microscópio.

Acoplado ao estágio do microscópio existe um piezo, controlado por computador e responsável por deslocar a plataforma de apoio para amostras com precisão nanométrica.

A lente 3 L_3 representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio. Abaixo da lente L_3 está o porta amostra contendo a solução aquosa de microesferas. Também representamos o poço de potencial criado pela pinça óptica e o sistema de referência utilizado. Por conseguinte, observa-se na região do porta amostra a existência de uma lamínula comercial (aproximadamente $150\mu\text{m}$ de espessura), a qual uma das extremidades da molécula de DNA se encontra ligada a uma microesfera enquanto a outra extremidade está adsorvida a superfície da lamínula. Seja ainda, h a distância entre o centro de massa da microesfera pinçada com relação à superfície da lamínula.

Por fim, temos as 2 saídas do microscópio. Em uma delas conectamos uma câmera CCD modelo Jai BM-500GE enquanto na outra temos uma CCD Jai CM-140GE, que encaminha as imagens até um monitor enquanto a outra leva a um computador, de forma que tenhamos uma visualização

⁹Espelho dicróico funciona como um filtro de cores, ou seja separa luz conforme determinadas cor a ser usada. Dessa forma a cor da luz (comprimento de onda) selecionada é refletida enquanto todas as outras cores o atravessam.

e posteriormente uma filmagem do experimento. Vale ressaltar, que o sistema foi previamente calibrado conforme teoria apresentada no **Apêndice B**.

2.3 Análise experimental

As análises obtidas pelas filmagens do experimento são realizadas com auxílio do modelo teórico de Marko e Siggia[22] datado de 1995 e também conhecido como modelo de Cadeia Vermiforme WLC (do inglês, *Worm - Like Chain*), que permite realizar ajustes sobre as curvas de força por extensão para cadeias de polímeros semiflexíveis, extraindo assim as propriedades mecânicas dos complexos DNA-fármaco de forma direta.

O modelo WLC faz parte da classe dos modelos de polímeros de cadeias semi-flexíveis reais, que considera os gastos de energia para curvar o polímero quando vence sua rigidez, que é o que ocorre para molécula de DNA. Temos que esse tipo de polímero, quando inserido em soluções aquosas, sofre alterações na sua conformação até atingir o estado equilíbrio termodinâmico, isto é, quando os choques entre as partículas que constituem a solução já não são mais capazes de alterar sua distância ponta-a-ponta.

Outro item que merece destaque na caracterização desse tipo de polímeros está relacionado ao regime de forças utilizadas nos experimentos de estiramento aplicado a moléculas de DNAs. Uma das duas condições existentes se utiliza da análise de modos de ligação, enquanto a outra, trata da descompactação e desnaturação de complexos-DNA. A primeira delas é o regime entrópico, o qual determina um limite de forças (ou um valor mínimo de energia) tal que a estrutura química do DNA não é alterada, ou seja, não há quebra de ligações, e sim apenas mudança na conformação e consequentemente na entropia.

A segunda condição é conhecida como regime entálpico e ocorre quando as forças aplicadas podem provocar alterações nas características intrínsecas do material, como exemplo, rompimento das pontes de hidrogênio do polímero ou danos nas ligações químicas¹⁰. Sabe-se que, para um DNA de conformação B¹¹ em condições fisiológicas, o valor da força limite para condição natural flutua em torno de 65 pN, uma vez que para valores superiores a este observa-se um patamar de desnaturação, caracterizando uma mudança de fase na estrutura da molécula de DNA.

Assim sendo, a ordem de grandeza da força-limite que separa os dois regimes varia de acordo com as propriedades intrínsecas de cada polímero. Para situação de uma molécula de DNA, o regime

¹⁰Os danos as ligações químicas de uma estrutura de DNA podem ocorrer por clivagem (que são as quebras ou rupturas na estrutura), ação de radiação ultravioleta, por reação a algumas substâncias genotóxicas (substâncias que são subprodutos do metabolismo celular), dentre outras formas[34].

¹¹Na natureza existem três formas típicas de encontrar a molécula de DNA em condições fisiológicas. A mais comumente encontrada é na conformação do tipo B (mesma utilizada no experimento), com um comprimento médio de 0.34 nm por par de base e diâmetro médio da hélice de aproximadamente 2.37 nm, sendo ainda 10.4 pares de base por volta da hélice. Outro tipo encontrado é na forma A, que é menos hidratada e mais compactada com em média 0.26 nm por par de base e um diâmetro médio de 2.55 nm. Por último na conformação do tipo Z, que possui um arcabouço em ziguezague com comprimento médio de 0.456 nm por par de base e um diâmetro médio de 1.84 nm, e possui uma hélice com giro para a esquerda, diferentemente da conformação A e B em que o giro é pra direita.

entrópico é garantido apenas para forças menores que 5 pico-Newtons ($F \leq 5$ pN).

A expressão final de Marko e Siggia assume a condição para estiramentos arbitrários dentro do regime entrópico da molécula de DNA[22],

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - \frac{z}{L})^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (2.9)$$

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

Utilizando a equação 2.9, conseguimos então ajustar os dados experimentais obtidos pelas análises das filmagens e extrair parâmetros importantes como: o comprimento de contorno, L (que apresenta informação sobre o tamanho linear da cadeia polimérica) e o comprimento de persistência, A (que apresenta informação sobre a rigidez da molécula).

3 A Molécula de DNA

Neste capítulo, daremos uma pequena abordagem histórica sobre a molécula de DNA. Também abordaremos o modelo obtido por Marko e Siggia [22], que realiza uma abordagem sobre a molécula de DNA como um polímero semi-flexível.

3.1 Abordagem histórica

Datada de meados do século XIX, a descoberta do DNA por Friedrich Miescher[35] serviu de pilar para o início da ciência genética pelas mãos do monge austríaco Gregor Mendel, que divulgou o resultado de seus experimentos no qual afirmava que informações eram repassadas entre gerações. Sabe-se, que as propriedades biológicas de um organismo é o produto final de uma sequência de etapas para o desenvolvimento e que essas informações são supostamente passadas entre gerações através de processos de replicação que copiam as estruturas portadoras de tais informações. Do mesmo modo, é necessário que haja outro processo que leia, ou seja, traduza essas informações para a nova estrutura. Com base na leitura dessas informações surge a possibilidade de ocorrerem erros durante a leitura, o que ocasionaria modificações, ditas mutações, que podem estar relacionadas as evoluções de espécies ancestrais. O acúmulo dessas mutações podem ainda possibilitar até formação de novas estruturas que continuam a ser repassadas entre gerações, que novamente estariam sujeitas a novas mutações e por conseguinte em novas estruturas. Por consequência, a abundância de evidências durante o decorrer do século XX, levou à conclusão que o DNA é o material genético[36].

Já no século XX, Watson e Crick[7, 8] propuseram a estrutura molecular do DNA (ácido desoxirribonucleico) como tendo conformação do tipo B-DNA e sendo constituída por dois filamentos(cromátides de nucleotídeos) enrolados um no outro gerando uma cadeia dupla hélice, que intrinsecamente é composto de quatro tipos de nucleotídios, que se repetem infinitamente. Posto isso, com suporte nas informações genéticas codificadas na sequência de base dos nucleotídeos que compõem o filamento de DNA, é plausível então a determinação da sequência do outro filamento de DNA, esse pode ser transmitido hereditariamente.

O DNA sofre o processo de replicação tal que o emparelhamento das bases nitrogenadas ocorre da seguinte forma: A se emparelha com T , enquanto C com G , desta maneira a quantidade de nucleotídeos pirimidínicos ($T+C$) é igual a quantidade de purínicos ($A+G$). Em vista disso, a quantidade de A é igual a quantidade de T , e a quantidade de G é igual de C . As bases que formam pares recebem a nome de complementares, o que foi verificado por Erwin Chargaff [36] quando abordou uma gama de DNA's de organismos diferentes. Outra importante contribuição veio do trabalho de Rosalind Franklin, com experimentos em que raio-X foi disparado nas fibras de DNA e com isso foi possível observar a dispersão desses raios em filme fotográfico e concluir que a molécula

é helicoidal[37, 38].

Os nucleotídeos são formados por um grupo fosfato (PO_4^-), um açúcar do tipo pentose¹² e uma base nitrogenada. Essa última, é a parte responsável por diferenciar os nucleotídeos entre si devido a estrutura química, sendo elas divididas em purinas com dois anéis aromáticos: adenina (*A*) e guanina (*G*), e as pirimidinas com apenas um anel aromático: timina (*T*) e citosina (*C*).

Resumindo, temos que as moléculas de ácidos nucleicos são formadas por repetições de suas unidades básicas, com sequência definida[35]. A estrutura tridimensional da molécula de DNA fica definida como sendo formada por duas fitas de nucleotídeos torcidos e unidos através de ligações de hidrogênio formando a dupla hélice, enquanto os filamentos de nucleotídeos de uma mesma fita se fixam através de ligações fosfodiéster¹³. Assim a cadeia é organizada segundo os átomos de carbono do grupo açúcar numerado de 1' a 5', sendo que a ligação fosfodiéster conecta o átomo de carbono 5' ($5'PO_4$) de uma desoxirribose ao átomo de carbono 3' da desoxirribose seguinte. São representadas como 5'-AACGTTGCTATCGT-3'.

A conformação dupla hélice ocorre devido a interação entre os pares de base, que são estruturas planas achatadas, que empilham-se umas sobre as outras. Esse empilhamento confere estabilidade à maioria das moléculas de DNA, sendo a mais estável resultante em uma dupla hélice com dois tamanhos distintos de sulcos: o sulco maior e sulco menor. Watson e Crick, confirmaram o observado por Chargaff, que *T* só parecia com *A*, enquanto *C* só parecia com *G*, assim concluíram que cada par de base consiste em um emparelhamento de base purina ligada a uma base pirimidina. Desse modo, na molécula de DNA (3.1), a guanina se liga a citosina através de três pontes de hidrogênio, enquanto adenosina se liga a timina por duas pontes de hidrogênio, sendo esse pareamento específico entre as bases que permite a replicação da molécula de DNA.

Conforme relatado em alguns trabalhos[39, 40], o calor pode afetar o DNA, causando uma separação entre os filamentos de DNA devido a quebra das ligações de hidrogênio, processo conhecido como desnaturação ou fusão (do inglês, *melting*). Sendo que a ligação *G-C* necessita de maiores temperaturas para dissociação devido ao fato de possuir três ligações de Hidrogênio. O processo contrário é quando o DNA sofre uma renaturação ou reanelamento (do inglês, *annealing*) tal que se reconstitui formando uma nova dupla fita, sendo as características originais da dupla hélice restabelecidas.

Finalmente, as cadeias de fosfato-açúcar são carregadas negativamente e interagem com cátions em solução, o que garante a estabilidade da dupla hélice devido a neutralização parcial da repulsão eletrostática entre os nucleotídeos.

¹²Pentose é um tipo de monossacarídeo formado por 5 átomos de carbono. A desoxirribose possui apenas um átomo de hidrogênio (*H*) ligado a um carbono no grupo aldeído, diferente do grupo ribose que tem um grupo hidroxila (*OH*) nessa posição.

¹³Ligação de fosfodiéster, é estabelecida entre o grupo hidroxila ligado ao carbono 3' (3'OH) da pentose de um nucleotídeo e o fosfato do nucleotídeo seguinte.

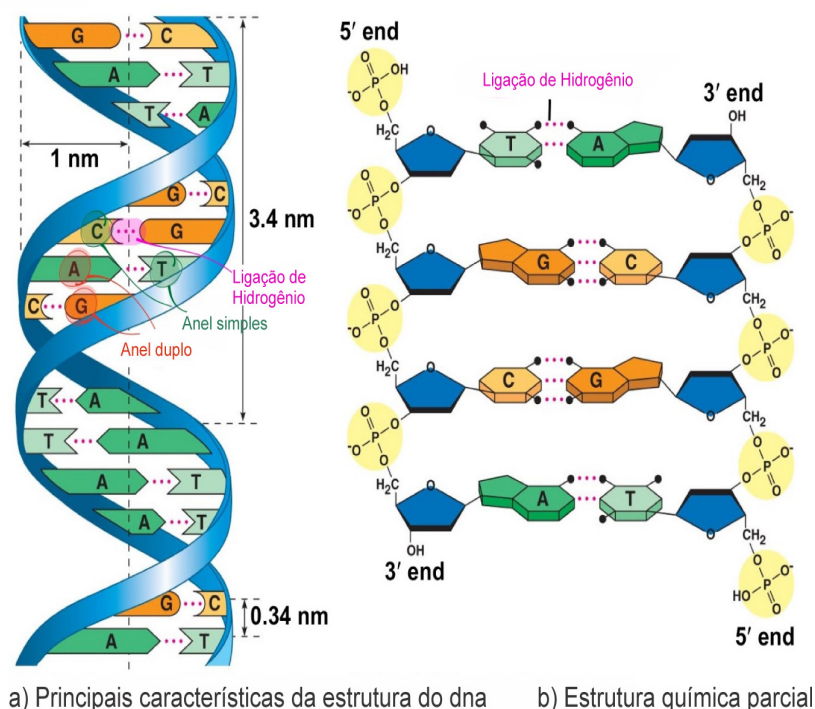


Figura 3.1: Figura adaptada[1], da molécula de DNA, com pareamento das moléculas das bases nitrogenadas.

3.1.1 DNA do vírus λ

Nesse trabalho, utilizamos o DNA o proveniente do fago λ que infectam a bactéria *E. Coli*[35], por se adequar ao nosso experimento. Ele possui cerca de 48.500 pares de base e em alguns momentos nos restringiremos a chama-lo apenas de DNA. A molécula de DNA possui um comprimento médio ponta a ponta (comprimento de contorno) de $\sim 16,5 \mu\text{m}$ [24].

3.2 Mecânica de polímeros

Polímeros são constituídos basicamente pela repetição de algumas unidades, ditas monômeros. A repetição deste processo de polimerização dá origem ao polímero cuja formação consiste de n repetições de unidades[41].

Nosso trabalho enfatiza os polímeros biológicos de cadeias semi-flexíveis,

Conseguimos compreender melhor a ocorrência das mudanças conformacionais quando sua configuração atinge um estado de equilíbrio termodinâmico com o meio, isto é, quando após as inúmeras colisões entre as moléculas presentes em um meio e o polímero se equilibram, o mesmo ocorre nas interações entre segmentos adjacentes de um mesmo polímero e/ou entre polímeros distintos. Estas colisões são capazes de modificar a disposição do polímero em solução fazendo com que as extremidades da molécula de DNA linear se aproximem ou se afastem[42].

Quando se atinge o estado de equilíbrio com o meio, as colisões ainda existentes não são

mais capazes de realizar modificações no valor médio da distância entre as pontas (comprimento ponta-a-ponta) e as configurações atingem um patamar de saturação, que é denominado estado de entropia máxima (S), que pode ser expresso por:

$$S = k_B \ln \Omega, \quad (3.1)$$

sendo k_B é a constante de Boltzmann, e Ω é o número de microestados possíveis para o sistema. O valor médio da distância entre as pontas, ou seja, comprimento ponta-à-ponta, da molécula de DNA no estado de equilíbrio termodinâmico não sofre alteração, uma vez que já se encontra em equilíbrio.

Podemos determinar algumas das propriedades mecânicas da molécula de DNA. No nosso caso, temos interesse no comprimento de contorno L_o e no comprimento de persistência A , conforme apresentado na Figura 3.2. Usualmente esses parâmetros são determinados ajustando o modelo Worm-Like Chain aos dados obtidos no experimento de estiramento. Sendo então, o comprimento de contorno L_o a distância ponta-à-ponta da molécula quando encontra-se completamente estirada numa conformação puramente retilínea, ou seja, medida ao longo da cadeia polimérica, enquanto o comprimento de persistência A (ou comprimento de correlação), nos fornece informações sobre a elasticidade da molécula, ou seja, quanto maior o número de dobras do polímero (mais flexível) menor é o valor de A . A definição de A é dada por:

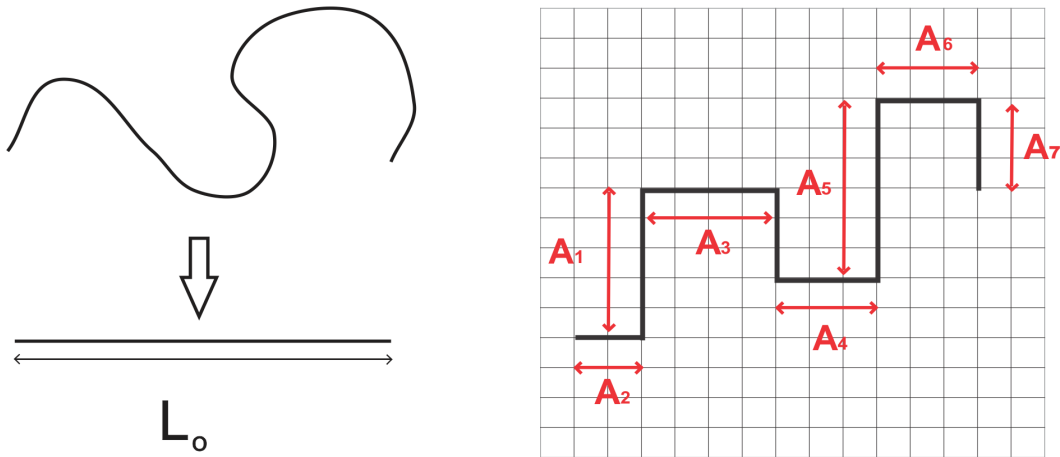


Figura 3.2: Do lado esquerdo, temos o esquema do comprimento de contorno L_o . Enquanto do lado direito, apresentamos o esquema para o comprimento de persistência A .

$$A = \frac{k_f}{K_B T} \quad (3.2)$$

sendo k_f é o termo de rigidez flexural do polímero, que está relacionado com a estrutura e a distribuição de carga em solução, enquanto T é a temperatura. Ou ainda, pode ser entendido por

um espaço discreto como a média entre duas dobras consecutivas:

$$A = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A_i \quad (3.3)$$

sendo o comprimento de persistência A uma característica intrínseca do polímero quando imerso em meio aquoso, tal que seu valor é independente da técnica utilizada para caracterização.

Outro item que merece destaque na caracterização de polímeros é o regime de forças utilizadas no experimentos de estiramento envolvendo moléculas de DNA. Uma das duas formas existentes é útil para análise de modos de ligação, enquanto a outra, trata da descompactação e desnaturação de complexos-DNA. A primeira delas é o regime entrópico, o qual determina um limite de força tal que a estrutura química do DNA não é alterada, ou seja, não há quebra de ligações na estrutura dupla hélice do DNA e sim, apenas uma mudança na conformação e consequentemente na entropia. O limite de forças utilizado nesse trabalho varia entre 2-10 pN, deste modo, todo desenvolvido está dentro do regime entrópico, tal qual as forças aplicadas não são capazes de alterar as configurações do polímero puro, isto é, após o polímero ser estirado ele consegue retornar a conformação de equilíbrio original devido a força restauradora entrópica.

A segunda forma, é conhecido como regime entálpico e estabelece um limite no qual a partir de um dado valor da força aplicada as características intrínsecas do polímero se alteram, como exemplo, rompimento das pontes de hidrogênio ou distorção das ligações químicas, o que implica num comprimento maior que o seu comprimento de contorno natural. Para um DNA de conformação B em condições fisiológicas o regime entálpico começa em 10 pN aproximadamente, uma vez que para valores superiores observa-se um patamar de desnaturação do polímero caracterizado por uma mudança de fase na estrutura da molécula de DNA. Logo, este regime apresenta mudanças nas propriedades polímero de forma irreversível, ou seja, o polímero não volta a conformação de equilíbrio original [24].

Assim sendo, a ordem de grandeza da força-limite que separa os dois regimes varia devido as propriedades intrínsecas de cada polímero. Por conseguinte, para situação de uma molécula de DNA, o regime entrópico é garantido apenas para baixas forças próximas de 5 pico-Newtons ($F \leq 5$ pN)[24].

3.2.1 Modelo WLC - Worm-Like Chain

O modelo de Cadeia Vermiforme WLC (do inglês, *Worm - Like Chain*), foi desenvolvido por Marko e Siggia[22] em 1995 e possui como característica a reprodução do comportamento de polímeros semiflexíveis quando submetidos a ação de uma força externa, tanto para estiramentos pequenos (próximos à conformação de equilíbrio) quanto para longos (próximos à conformação retilínea, vareta rígida), desde que as forças aplicadas sejam suficientemente pequenas (< 10 pN),

ou seja, no regime entrópico. Este modelo é de notável importância para caracterização das propriedades mecânicas de moléculas biológicas, como exemplo o DNA.

A força para pequenos estiramentos, próximos a conformação de equilíbrio, pode ser aproximada pela Lei do Hooke:

$$F = -Kz, \quad (3.4)$$

sendo K a constante de mola efetiva e z o eixo de estiramento da molécula. Logo, a extensão z do polímero é dada como a distância quadrática média entre as duas extremidades do polímero (r_{ee}), tal que:

$$z \simeq \sqrt{\langle r_{ee}^2 \rangle}. \quad (3.5)$$

Para o limite flexível, sendo o comprimento de contorno é muito maior que o comprimento de persistência ($L \gg A$), obtemos $\langle r_{ee}^2 \rangle \simeq 2AL$ [22], dessa forma

$$z \simeq \sqrt{2AL}. \quad (3.6)$$

Fazendo uso agora, do teorema de equipartição de energia para energia potencial elástica, temos

$$\frac{1}{2}kz^2 = \frac{3}{2}K_B T, \quad (3.7)$$

e usando a equação 3.6, conseguimos determinar a constante k da mola, como

$$k = \frac{3k_B T}{2AL}. \quad (3.8)$$

Logo, a força aproximada¹⁴ para o regime de pequenos estiramentos é dada segundo

$$F = -\frac{3k_B T}{2A} \frac{z}{L}. \quad (3.9)$$

Em contrapartida, para longos estiramentos, a energia aproximada pode ser expressa pelo modelo de Kratky - Porod [43], o qual exclui o trabalho exercido pela força necessário para manter a molécula em determinada configuração, ou seja,

$$E_{WLC} = \frac{1}{2}k_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz, \quad (3.10)$$

sendo a força F aqui um vínculo, ou seja, um multiplicador de Lagrange para manter z constante. Como $z \sim L$, o vetor $\hat{t}$ é praticamente paralelo à curva $\vec{r}(s)$ a qual descreve a conformação da molécula. Dessa forma, utilizando a transformada de Fourier para fazer a decomposição da energia em modos normais, chegamos ao resultado

¹⁴Uma análise mais profunda da dedução pode ser obtida nos trabalhos de Marko & Siggia[22]

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_B T \int \frac{\partial q}{2\pi} \left[A q^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_\perp(q)|^2 - FL, \quad (3.11)$$

agora a partir da equação 3.11, podemos calcular o valor quadrático médio de $|\tilde{t}_\perp|$,

$$\langle |\tilde{t}_\perp|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}, \quad (3.12)$$

tal que fazendo uso da aproximação $z/L \cong t_z \cong 1 - |t_\perp|/2$, obtemos

$$\frac{z}{L} \cong 1 - \frac{1}{2} \sqrt{k_B T F A}, \quad (3.13)$$

isolando F , obtemos a equação para longos estiramentos¹⁵

$$F = \frac{1}{4} \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{(1 - \frac{z}{L})^2} \right] \quad (3.14)$$

No entanto, a equação 3.14 apresenta uma inconsistência matemática, sendo sua expansão em primeira ordem deveria resultar na equação 3.9, que é a equação para estiramentos de curto alcance. Entretanto ao realizar a expansão obtém-se um resultado diferente. Esse problema foi resolvido por Marko e Siggia se utilizando de uma interpolação. Eles acrescentaram dois termos para corrigir a equação para grandes estiramentos, tal que se $z \sim L$ os termos se tornam desprezíveis. A correção realizada consiste basicamente em somar os termos $z/L - 1/4$ dentro da expressão. Dessa forma obtemos a expressão final de Marko e Siggia para a força entrópica da molécula de DNA como função da extensão[22],

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - \frac{z}{L})^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (3.15)$$

A equação 3.15, é válida para estiramentos arbitrários, todavia, possui ainda algumas limitações, por ser uma expressão aproximada, tal que, a equação diverge quando tomamos $z = L$, na prática, sua validade vai até $z \sim 0,9L$ [22], enquanto para valores superiores, a força aplicada se torna forte suficiente capaz de deformar as ligações químicas entre os nucleotídeos, fora portanto do regime entrópico.

¹⁵A dedução completa pode ser obtida nos trabalhos de Kratky-Porod[43]

4 Rotina Experimental

4.1 Preparação de Amostra

O experimento de estiramento por pinçamento óptico é uma importante técnica experimental que consiste em aprisionar uma única microesfera de poliestireno que está ligada a uma das extremidades da molécula de λ -DNA, enquanto a outra extremidade está adsorvida a lamínula do porta-amostra. O procedimento se baseia no protocolo em que o λ -DNA (*New England Biolabs*) interage com nucleotídeos simples não marcados: dATP, dTTP e dGTP (*Invitrogen*) e com nucleotídeos marcados com biotina: biotin 14-dCTP (*Invitrogen*). Ao final, temos o polímero marcado com biotina nas duas extremidades o que facilita para que as mesmas possam ser fortemente ligadas a substratos recobertos com outra proteína, a estreptavidina (*Sigma Aldrich*), uma proteína produzida pela bactéria *Streptomyces avidinii*, que apresenta alta afinidade com a molécula de biotina (também conhecida como vitamina H ou B7), vitamina que é empregada no metabolismo de proteínas e carboidratos. A estreptavidina possui 4 sítios de interação idênticos, nos quais as biotinas podem se ligar[44].

Por conseguinte, preparamos uma solução contendo microesferas de poliestireno com diâmetro $\sim 3 \mu\text{m}$ recobertas com estreptavidina (*Bangs Labs*) e então adicionamos o DNA-biotinilado em um banho térmico à 36°C , para que se estabeleça a interação entre as proteínas, tal que uma das extremidades do DNA se ligue a uma microesfera. Enquanto isso, preparamos o porta-amostra, esse que será posicionado sobre o estágio do microscópio. Nele fixamos um anel de borracha do tipo O-ring com um diâmetro de $\sim 0,7 \text{ cm}$ com auxílio de parafina em uma lamínula comercial (aproximadamente $150 \mu\text{m}$ de espessura) e então tratamos a área interna do O-ring com um recobrimento de biotina e posteriormente outro de estreptavidina. Em seguida, o porta amostra é então fixado ao microscópio e a solução contendo λ -DNA+microesferas é adicionada ao interior do O-ring, como mostra a Figura 4.1. Espera-se por volta de 60 minutos para que as ligação necessárias se estabeleçam entre a extremidade livre do DNA e a superfície da lamínula tratada. Posteriormente iniciamos o procedimento de procura por um bom conjunto DNA-microesferas conforme mostrado na Figura 4.2.

4.2 Procedimento Experimental

A Figura 4.2 representa esquematicamente as possíveis configurações para o DNA em meio a solução próxima às condições fisiológicas, contendo as microesferas de poliestireno e os conjuntos formados de DNA-microesferas. Dessa forma, partimos em busca de um bom conjunto DNA-microesferas para a realização dos estiramentos, que obrigatoriamente deve possuir o DNA-biotinilado com uma das extremidades aderida à microesfera revestida com estreptavidina enquanto

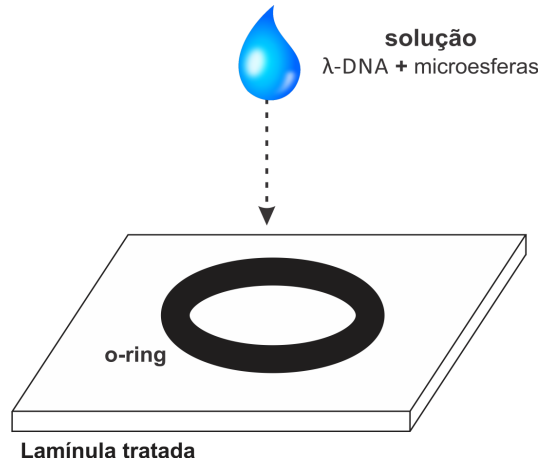


Figura 4.1: Esquema do porta-amostra e a solução de λ -DNA com microesferas.

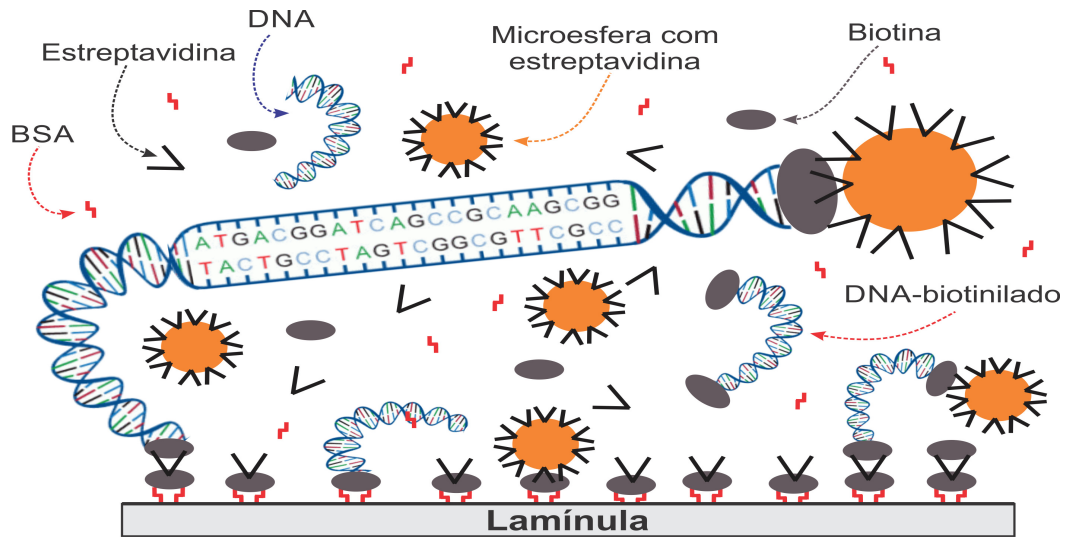


Figura 4.2: Configurações para o DNA em meio a solução de microesferas.

a outra extremidade deve estar adsorvida a lamínula previamente tratada com biotina e estreptavidina.

Quando encontramos uma boa configuração DNA-microesfera, realizamos aproximadamente 5 estiramentos (ou medidas) conforme esquema na Figura 4.3, as quais fornecem uma média dos parâmetros obtidos. Em cada estiramento, a molécula é estirada com velocidade definida ($v = 0,1 \mu\text{m/s}$) pelo deslocador piezo elétrico. Esta velocidade é baixa o suficiente para que o estiramento não perturbe o estado de equilíbrio (regime quase-estático), sendo ainda a altura h da microesfera mantida fixa em $\sim 4,4 \mu\text{m}$ enquanto o estágio do microscópio se desloca com velocidade constante.

Por fim, os resultados são obtidos via videomicroscopia e é possível extrair a força aplicada e ainda o deslocamento do estiramento x_{DNA} . Dessa forma, podemos construir um gráfico de força como função da extensão da molécula de λ -DNA, tal que os pontos do gráfico correspondem aos dados obtidos experimentalmente enquanto a curva traçada vai representar o ajuste realizado segundo o modelo WLC de Marko e Siggia (3.15) [22]. Por conseguinte, cada medida vai se referir

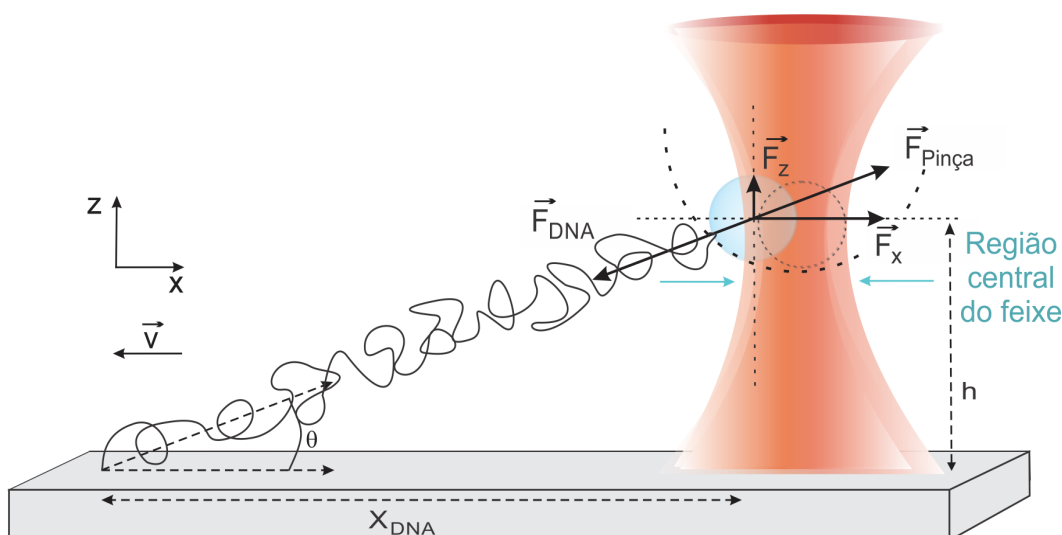


Figura 4.3: Esquema do experimento de estiramento da molécula de DNA num regime quase-estático.

a um experimento de estiramento, ou seja, uma curva de força por extensão por estiramento. As propriedades mecânicas serão então extraídas do ajuste dessa curva de força. Temos como padrão de referência para as propriedades mecânicas que serão extraídas do λ -DNA puro de conformação B , que o comprimento de persistência A deve estar entre $40 \sim 50$ nm e o comprimento de contorno L_o entre $14 \sim 21 \mu\text{m}$ [45, 46, 47].

As primeiras medidas são obtidas para um DNA puro, isto é, livre de compostos e/ou substâncias que podem alterar suas propriedades mecânicas. Em seguida iniciam-se o processo de troca de alíquotas, que são as concentrações definidas de ligante desejado diluídas em uma solução tampão. As trocas são realizadas retirando-se certa quantidade da solução presente no interior do O-ring e introduzindo outra quantidade equivalente de alíquota. Esse procedimento deve ser realizado algumas vezes, a fim de que a concentração final na troca seja o mais próximo da solução da alíquota original. O próximo passo é aguardar a interação do DNA e do composto durante um certo intervalo de tempo, tempo de reação (~ 30 minutos). Ao término do tempo de reação, inicia-se novamente as medidas, sendo realizadas novamente 5 medidas tal que a média é extraída. Outras alíquotas são trocadas posteriormente e o mesmo processo é realizado. Ao final, após uma série de alíquotas é possível construir gráficos para as propriedades mecânicas por concentrações.

Sulfoxide), C_2H_6OS , ou apenas DMSO, para obter uma acurácia na concentração da solução¹⁷.

Na Figura 5.1A, temos a estrutura química planar da molécula de Cisplatina. Em sistema aquoso os dois íons cloro (Cl) se dissociam e o composto incorpora duas moléculas de água, atingindo o seu estado bivalente (2^+) ativo representado na Figura 5.1B, que se liga a estrutura de DNA [56]. Essa ligação entre o DNA-Cisplatina ocorre no estado ativo da molécula, por uma interação do tipo covalente com a dupla hélice do DNA podendo ser do tipo: monoaducto, cruzada (do inglês, *crosslinks*) intracadeia e intercadeias entre DNA-proteína [56]. A formação de aductos induzem fortes perturbações estruturais na conformação da dupla hélice, especialmente curvas e desenrolamentos acentuados[57, 58], e às vezes até quebra da fita local [59, 60]. Essas perturbações na estrutura afetam significativamente as propriedades mecânicas molécula de DNA, tal que a interação DNA-Cisplatina pode ser monitorada medindo as variações das propriedades em função da quantidade de fármaco ligada à dupla hélice [61].

Experimentos com e sem a presença de DMSO em solução foram realizados. Aqui apresentamos os resultados obtidos com a presença de DMSO.

5.1.1 Interação DNA-Cisplatina

A concentração de Cisplatina (*Sigma-Aldrich*) utilizada no experimento varia desde $0,1 \mu M$ até $500 \mu M$. Um conjunto de alíquotas foi preparado com Cisplatina diluída diretamente em PBS a 1 mM de $NaCl$ e outro a 150 mM de $NaCl$. Já um outro conjunto de alíquotas, foi preparado com uma solução estoque de Cisplatina diluída em DMSO e posteriormente diluída em PBS a 1 mM de $NaCl$, outra a 10 mM de $NaCl$ e outro a 150 mM de $NaCl$.

Todos os experimentos foram realizados com mesma rotina experimental para caracterização do complexo Cisplatina–DNA. Após atingido o estado de equilíbrio químico, iniciamos o estudo das alterações das propriedades mecânicas do complexo. Esse procedimento foi realizado utilizando três concentrações de solventes diferentes: I) Cisplatina diluída em solução salina de PBS [62] a 150 mM ; II) Cisplatina diluída em solução salina de PBS a 10 mM ; III) Cisplatina diluída em solução salina de PBS a 1 mM .

Apresentamos na Figura 5.2, um comparativo entre nossos dados de DNA-Cisplatina em $[Na] = 150 \text{ mM}$ e um trabalho realizado pelo grupo anteriormente[50, 2], atestando a reprodutividade do experimento de forma qualitativa.

Agora, com mais detalhes, mostramos as curvas para um dos parâmetros mecânicos que conseguimos extrair dos ajustes realizados com o modelo WLC [22] sobre as curvas de força-extensão dos complexos DNA-Cisplatina. Na Figura 5.3, temos o comprimento de persistência (A) como

¹⁷Solução Cisplatina-DMSO: primeiramente diluímos $2,7 \text{ mg}$ de Cisplatina em $1,5 \text{ mL}$ de DMSO (ESTOQUE1), em seguida retiramos $333 \mu L$ do ESTOQUE1 e diluímos novamente em $778 \mu L$ de DMSO (ESTOQUE2), chegando ao final a uma solução de Cisplatina diluída em DMSO na concentração de 2 mM , que foi utilizada para criar as concentrações utilizadas nos experimentos.

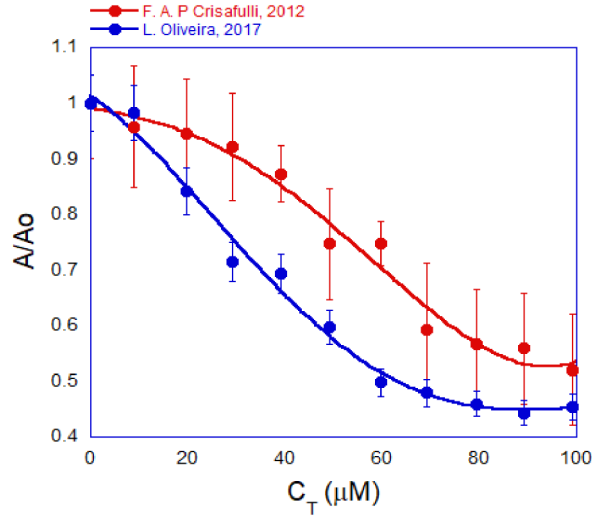


Figura 5.2: Comparativo dos nossos dados de comprimento de persistência para DNA-Cisplatina com um trabalho anterior do grupo[2], ambos normalizados por funções polinomiais, mostrando a reprodutividade qualitativa do experimento.

função da concentração do fármaco (C_T) em uma solução à concentração de $[Na] = 150$ mM. Os dados experimentais do comprimento de persistência (parâmetro mecânico) são representados pelo quadrados vermelhos e a curva em vermelho obtida pelo ajuste teórico do modelo estatístico de desordem de sítios (do inglês, *Quenched-disorder Statistical Model*) [61],

$$\frac{1}{A_E} = \frac{1 - r/r_{max}}{A_0} + \frac{r/r_{max}}{A_1}, \quad (5.1)$$

sendo A_E o comprimento de persistência efetivo do complexo DNA-ligante, que pode ser escrito em termos de A_0 (comprimento de persistência para DNA puro), A_1 (comprimento de persistência local induzido pela ligação do ligante a molécula de DNA). r é a fração ligada e r_{max} é o valor de saturação de r . O modelo de desordem de sítios permite extrair os parâmetros físico-químicos associados à interação DNA-fármaco [61, 63, 64]. Podemos observar que o comprimento de persistência diminui monotonicamente com o aumento da concentração do fármaco. Devemos escolher uma isoterma de ligação apropriada que seja capaz de extrair os parâmetros físico-químicos do sistema. Para nosso caso, na interação DNA-Cisplatina, a isoterma que mais se adequa é a de Hill[65] (**Apêndice C**), uma vez que a interação apresenta cooperatividade¹⁸[64],

$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{(KC_f)^n}{1 + (KC_f)^n}, \quad (5.2)$$

na qual C_f é a concentração de ligante livre (não ligada ao DNA), K é a constante de equilíbrio¹⁹, n é

¹⁸Cooperatividade: é o efeito no qual a molécula que se liga a estrutura de DNA pode aumentar ou diminuir a afinidade da interação para a próxima molécula.

¹⁹Constante de equilíbrio de uma reação relaciona as concentrações dos reagentes com as concentrações dos produtos no momento em que ocorre o equilíbrio na reação.

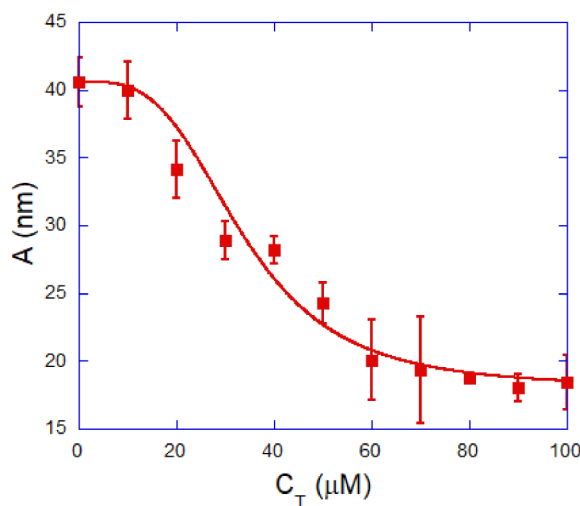


Figura 5.3: Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[\text{Na}] = 150$ mM.

o coeficiente de Hill, parâmetro capaz de estimar o grau de cooperatividade da interação da reação. Se $n > 1$, a interação é de cooperatividade positiva, ou seja, a cada molécula que se liga à estrutura de DNA aumenta a afinidade para que uma nova molécula também se ligue. Caso contrário, se $n < 1$, a interação é de cooperatividade negativa, isto é, a cada molécula que se liga a estrutura de DNA diminui a afinidade para uma nova molécula ligante. E por último, $n = 1$, a interação é de cooperatividade nula, sendo a afinidade independente do número de moléculas ligadas. A equação 5.2 pode ser combinada com a equação 5.1 a fim de ajustar os dados experimentais do comprimento de persistência A , tal que os parâmetros de ligação (K , r_{max} e n) são deixados como parâmetros ajustáveis pelo modelo de Hill e podem ser determinados a partir do processo de convergência durante o ajuste da curva experimental.

Na Figura 5.4, temos o comprimento de persistência (A) como função da concentração de fármaco (C_T), em uma solução à concentração de $[\text{Na}] = 10$ mM. Nossos dados experimentais são representados pelo quadrados vermelhos e a curva em vermelho foi obtida pelo ajuste teórico do modelo estatístico de desordem de sítios em conjunto com a isoterma de Hill. Podemos observar que, o comprimento de persistência diminui com o aumento da concentração de fármaco, sendo nesse caso apresentando menos evidentemente a forma sigmoide da curva (forte indicativo de

Tabela 5.1: Parâmetros físicos obtidos com base nas concentrações iônicas e suas respectivas barras de erros

$[\text{Na}]$ (mM)	K (M^{-1})	n	A_1 (nm)
1	$(1.9 \pm 0.5) \times 10^7$	1.0 ± 0.2	28.7 ± 2
10	$(5.3 \pm 0.8) \times 10^5$	1.8 ± 0.4	23.5 ± 1
150	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^4$	3.4 ± 0.4	20 ± 1.5

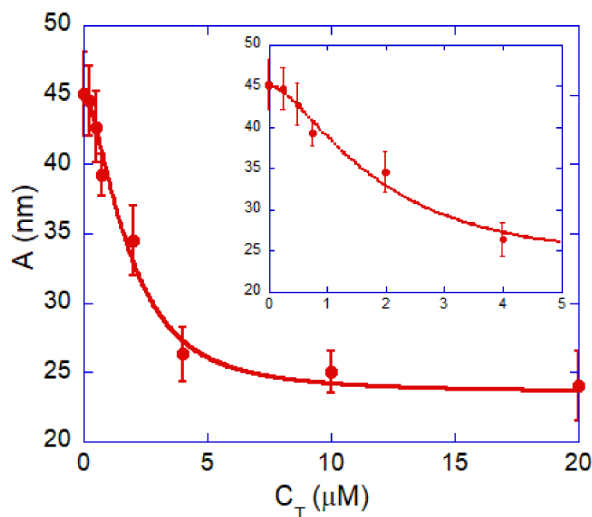


Figura 5.4: Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[\text{Na}] = 10$ mM.

presença de cooperatividade). Faz-se jus uma ampliação da região de menor concentração para melhor visualização.

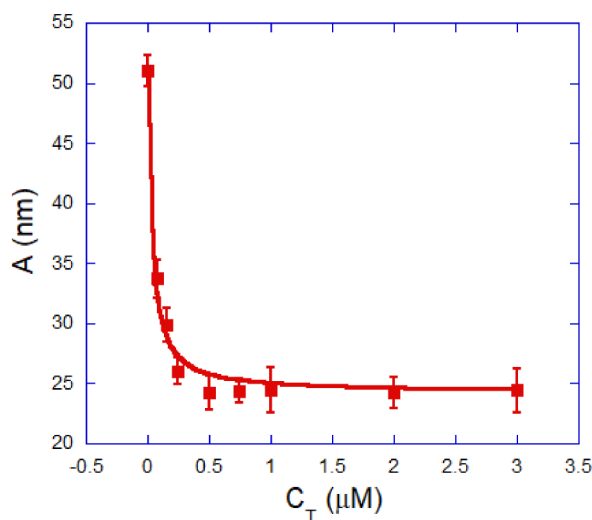


Figura 5.5: Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[\text{Na}] = 1$ mM.

Na sequência temos a Figura 5.5, que mostra o comprimento de persistência (A) como função da concentração de fármaco (C_T), em uma concentração de $[\text{Na}] = 1$ mM. Nossos dados experimentais são representados pelo quadrados vermelhos e a curva em vermelho obtida pelo ajuste teórico do modelo estatístico de desordem de sítios em conjunto com a isoterma de Hill. Nota-se aqui que o comprimento de persistência é abruptamente diminuído já para concentrações muito pequenas de fármaco, sendo assim não se observa a forma sigmoidal da curva de ajuste experimental, que funciona como um indicativo de presença de cooperatividade na interação.

Outra interpretação que pode ser sugerida para as Figuras 5.3, 5.4 e 5.5 é com base na força

iônica da solução, conforme mostrado na Tabela 5.1. Para baixas forças iônicas (baixa concentração de $[\text{Na}^+]$), a interação possui alta afinidade química (podendo ocorrer mais interações). Por outro lado, ao passo que a força iônica aumenta, isto é, a concentração de $[\text{Na}^+]$ na solução aumenta, temos mais íons $[\text{Na}^+]$ dispersos na solução o que resulta na blindagem do DNA (que possui carga negativa), dificultando e diminuindo a afinidade química de novas interações. Observa-se que a medida que se troca o PBS, por exemplo do PBS 150 mM para o PBS 10 mM, há um aumento no valor da força iônica. Note que para o PBS 1 mM já se observa um alto valor para força iônica da solução, isto é, alta concentração de $[\text{Na}^+]$ presente desde logo para pequenos valores de concentração de droga, o que sugere uma molécula de DNA já em estado blindado²⁰, isto é, temos grande quantidade de íons $[\text{Na}^+]$ dispersos na solução, o que resulta em uma baixa afinidade química para novas interações.

Os resultados obtidos experimentalmente para constante de equilíbrio (K) como função da concentração de contra-íon $[\text{Na}^+]$, são apresentados na Figura 5.6 e na Tabela 5.1. Pela análise desses resultados, podemos perceber a diminuição da constante de ligação (K) com aumento da força iônica. Outra observação que pode ser feita é o aumento na taxa de cooperatividade de Hill (n) com aumento da força iônica da solução.

Temos que a forma ativa da Cisplatina admite carga 2^+ , o que induz uma forte dependência da concentração de contra-íon $[\text{Na}^+]$ para constante de ligação de equilíbrio da reação, lembrando que a dupla hélice de DNA apresenta carga negativa devido aos grupos fosfato $[\text{PO}_4^{3-}]$. Alguns estudos a cerca da constante de ligação (K) já foram realizados com base nas interações de algumas proteínas com DNA[66], enquanto outros, abordaram os efeitos para ligação de fármacos com a molécula de DNA[67, 68, 69, 70, 71]. Seja então, o comportamento da constante de ligação de equilíbrio como função da concentração do contra-íon $[\text{Na}^+]$ na solução pode ser entendido com base no modelo Record-Lohman[72]:

$$\frac{\partial(\log K)}{\partial(\log[\text{Na}])} = -z\psi, \quad (5.3)$$

tal que z é a carga do ligante e ψ é a fração de contra-íon termodinamicamente associada por fosfato na ausência do ligante [72, 66]. Com relação ao B-DNA de cadeia dupla em soluções tampão contendo em suas concentrações apenas íons monovalentes, sabe-se que $\psi = 0,88$ [72, 66].

Na Figura 5.6 mostramos a constante de ligação de equilíbrio em função da concentração de contra-íon $[\text{Na}^+]$, sendo a linha tracejada um ajuste com o modelo de Record-Lohman (equação 5.3), em escala log-log. Obtemos o valor da carga ligante $z = (1,5 \pm 0,1)$, o que é relativamente próximo do valor esperado da carga de Cisplatina (2^+), demonstrando que o modelo se ajusta bem ao nosso caso, e que nosso modelo estatístico de desordem de sítios retorna parâmetros físico-

²⁰O estado blindado do DNA, pode ser entendido como a molécula de DNA que possui carga negativa cercada por cargas positivas do Na^+ provenientes da solução iônica. Essa concentração de cargas positivas, ou contra-íons, são responsáveis pelas facilidade (ou afinidade) química entre as interações.

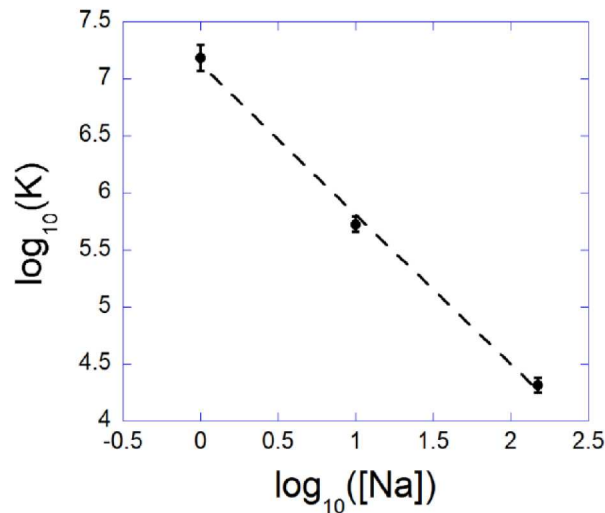


Figura 5.6: Constante de ligação K como função da concentração de sal, em escala log-log.

químicos da interação DNA-Cisplatina a partir dos dados experimentais de parâmetros mecânicos (comprimento de persistência) satisfatoriamente bem. Segundo a literatura [66], grande parte dos ensaios experimentais realizados com ligantes carregados e ácidos nucleicos, apresentaram $\partial(\log K) / \partial(\log [Na]) < -z\psi$ [66], isto é, estando de acordo com nosso trabalho. Acreditamos que esse fato deve-se a: (a) uma limitação intrínseca do modelo (que perde a precisão para altas forças iônicas), e (b) na prática, na solução, nunca obtém-se 100% das moléculas de ligante totalmente ionizadas, o que reduz a carga efetiva líquida.

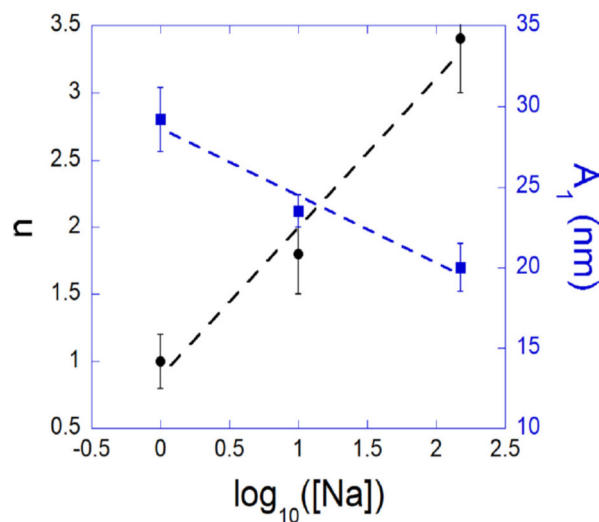


Figura 5.7: Comprimento de persistência na saturação A_1 (quadrados azuis) e expoente de Hill (n) (círculos pretos) como função da concentração de contra-íon.

Na Figura 5.7, apresentamos os dados do comprimento de persistência na saturação A_1 (quadrados azuis) e o expoente Hill (n) (círculos pretos) como função da concentração de contra-íons. Constata-se que A_1 diminui com o aumento da força iônica indicando que a Cisplatina possui maior

efeito na redução da flexibilidade do DNA para maiores forças iônicas, decorrência que se relaciona a compactação do DNA.

Sendo o expoente de Hill (n), o termo que expressa o grau de cooperatividade da reação, temos na Figura 5.7 que este parâmetro aumenta em função da força iônica, ou seja, à proporção que ocorre o aumento da concentração de contra-íons $[Na^+]$ na solução. Uma boa análise desse comportamento pode ser estabelecida como sendo a cooperatividade diretamente ligada às interações com DNA-ligante [73]. Uma vez que a Cisplatina é um composto catiônico bivalente (2^+), o efeito de repulsão eletrostática entre outras moléculas do mesmo fármaco desempenha um papel significativo quando em presença de baixas forças iônicas, o que resulta na diminuição da cooperatividade. Um resultado semelhante foi verificado utilizando outros ligantes catiônicos, os quais exibem um comportamento cooperativo em suas interações com a molécula de DNA [67, 70].

Com respeito a Cisplatina, o grau de cooperatividade observado está relacionada às mudanças estruturais induzidas na dupla hélice do DNA após a ligação do fármaco. O fármaco é capaz de induzir ligações do tipo cross-links,²¹ e loops [57, 11, 74], as quais que se ligam em diferentes segmentos da cadeia, resultando no efeito de compactação do DNA para altas concentrações do fármaco [50, 11]. Deve ser esperada uma cooperatividade positiva neste cenário, pois as reticulações (cross-links) e loops induzidos na dupla hélice aproximam diferentes segmentos da fita de DNA, aumentando assim a probabilidade de formar ainda mais cross-links e loops à medida que mais ligante (Cisplatina) se liga a essa estrutura, devido à proximidade segmento-segmento [2, 50]. Uma conclusão semelhante foi recentemente observada para ligação H-NS por Dame et al., no qual mostrou um comportamento cooperativo neste caso surge como uma propriedade intrínseca devido à proximidade da dupla fita de DNA, ou seja, da dupla-hélice [75].

Apresentamos agora as análises dos dados para o outro parâmetro mecânico, o comprimento de contorno (L), obtidos com o modelo WLC utilizando três diferentes concentrações de $[Na]$.

Nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 apresentamos os comprimentos de contorno L correspondentes (normalizados pelo valor de DNA puro, $L_0 \sim 16,5 \mu m$) para os mesmos complexos de DNA-Cisplatina mostrados nas Figuras 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente. Percebe-se que, quanto maior a força iônica utilizada (Figura 5.8), o comprimento do contorno tende a diminuir como função da concentração do fármaco, um resultado já obtido anteriormente pelo grupo e apresentado por Crisafuli [2]. Esse aspecto foi bastante discutido por Hou et al. [11], o qual afirma que essa diminuição está relacionada ao processo de compactação de DNA induzido pela formação de cross-link e loops na dupla hélice do DNA após a ligação do fármaco [11], o que influencia na diminuição do comprimento do contorno para forças baixas dentro do regime entrópico [2], [61]. Contudo, em situações nas quais as forças iônicas utilizadas são inferiores a essas, isto é, para concentrações menores de $[Na^+]$, não se observa o efeito de compactação na estrutura de DNA (Figuras 5.9 e 5.10). Nota-se um aumento efetivo no

²¹Cross-link ou ligação do tipo cruzada, é um tipo de ligação entre duas partes diferentes da estrutura do molécula de DNA que ocorre entre alguns ligantes e as bases nitrogenadas de uma molécula de DNA, possui caráter covalente.

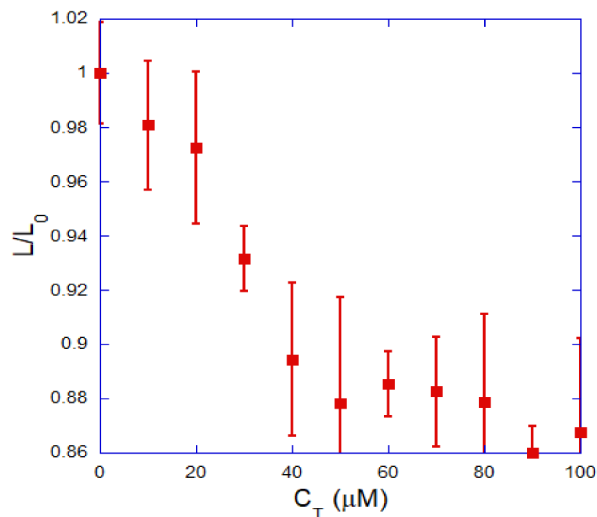


Figura 5.8: Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$.

comprimento do contorno da molécula de DNA à medida que a concentração do fármaco aumenta 5.9, 5.10. Admitimos que esse efeito está relacionado ao desenrolamento da dupla fita do DNA e/ou às rupturas da cadeia local (ou bolhas de desnaturação) induzidas pela ligação com DNA-Cisplatina [57], [58], [59],[60].

Pela análise destes resultados, temos que a ação do fármaco Cisplatina na estrutura de DNA não causa compactação para baixas forças iônicas, como resultado da baixa cooperatividade (n) presente na interação DNA-Cisplatina nessas condições. Por outro lado, a alta cooperatividade (n) entre a Cisplatina e a molécula de DNA que resulta no efeito de compactação, ocorre apenas para altas forças iônicas, ou seja, altos valores de $[\text{Na}^+]$. Temos que o fato do comprimento de persistência local A_1 diminuir para maiores valores da forças iônicas provavelmente está correlacionado com essa compactação, o que indica baixa rigidez flexural²² que sugere uma molécula mais flexível.

Agora, para uma completa análise do comprimento de contorno (L), se faz necessário um modelo capaz de conectar esse parâmetro mecânico a uma isoterma de ligação para extração dos parâmetros da ligação. O modelo utilizado para realizar essa conexão para o comprimento de persistência é generalizado e válido (em princípio) para qualquer tipo de interação (intercalação, ligação de fendas, ligação covalente, etc.) [61, 76]. No entanto, para a extração de parâmetros pelo comprimento do contorno, existe apenas um único modelo presente na literatura que pode ser usado para executar esse tipo de conexão com uma isoterma de ligação que é válido apenas para intercalantes²³ [61]. Ainda não há relatos na literatura sobre um modelo aplicado ao comprimento do

²²Rigidez flexural (K_f) está relacionada a energia de curvatura do polímero, isto é, energia necessária necessária para curvar o polímero. Esse efeito é expresso pela equação $A = \beta K_f$ sendo $\beta = 1/K_B T$, tal que para baixo valor da persistência (A) precisamos de um baixo valor de energia de curvatura (K_f) para mudar sua conformação o que sugere uma molécula menos rígida com mais dobras.

²³Intercalante é o termo usado para moléculas que se intercalam entre os pares de base do DNA causando possíveis modificações estruturais. Sendo uma das alterações: o aumento do comprimento de contorno (realizado para acomodar a molécula ligante) e geralmente acompanhado por um giro sobre o próprio eixo da molécula de DNA capaz de desfazer

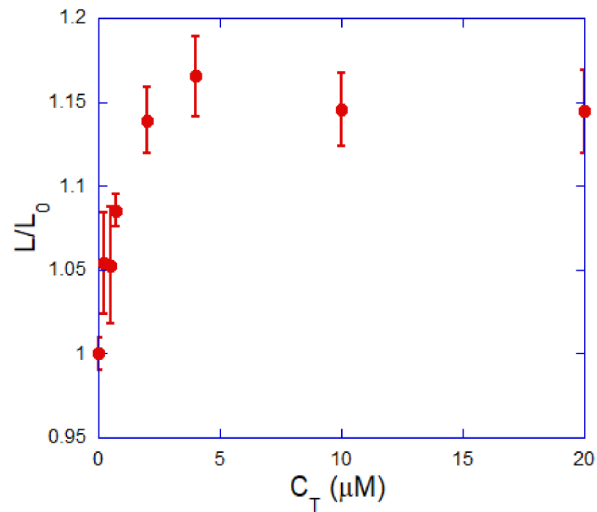


Figura 5.9: Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[\text{Na}] = 10 \text{ mM}$.

contorno que pode ser usado para extrair os parâmetros de ligação no presente caso. A formulação de um modelo deste tipo ainda está longe de ser fácil, uma vez que a Cisplatina pode induzir efeitos diferentes na estrutura de dupla hélice (cross-links, loops, quebra da cadeia, desenrolamento, etc) que podem afetar o comprimento do contorno de diferentes maneiras.

a hélice.

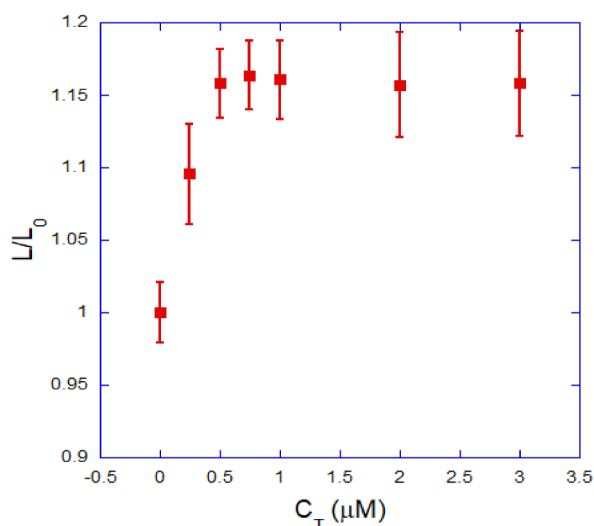


Figura 5.10: Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Cisplatina em solução de $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$.

5.2 Carboplatina $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$

Apesar da consolidação da Cisplatina como o fármaco mais comumente utilizada em tratamentos quimioterápicos, seu uso veio acompanhando de vários efeitos colaterais indesejados (por exemplo, nefrotoxicidade e ototoxicidade) e alguns casos de limitações da atividade tumoral. Essas limitações serviram de suporte para desenvolvimento de novos complexos derivados de Platina, como o caso da Carboplatina (*cis-diammine(cyclobutane-1,1-dicarboxylate-O,O')platinum(II)*) [77], uma platina de 2^a geração de forma planar $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$, que apresenta atividade antineoplásica semelhante a Cisplatina, possuindo ainda um mecanismo semelhante para formação de aductos com o DNA [78]. Existe também uma preferência das ligações ocorrerem com a guanina N7 e adenina N7. No entanto, para Carboplatina já há relatos de afinidade com a citosina e mudanças conformacionais entre A- e B- DNA [78]. Sua administração à pacientes é via intravenosa e indicado para aqueles que já tenham recebido medicamentos com Cisplatina, em dosagem de 400 mg/m^2 [79] de Carboplatina mensal se baseando nas doses de Cisplatina [53].

Nos últimos anos, a Carboplatina vem sendo utilizada em muitos tratamentos de câncer, tais como: ovário [80, 81, 82], pulmão [83] e alguns tipos específicos de cabeça e pescoço [84], ainda que se mostre menos eficiente quando comparada à Cisplatina em certos cânceres específicos [18, 85, 86, 87, 88]. No entanto, sempre despertou o interesse da sociedade científica em investigar o mecanismo molecular de ação da Carboplatina [17, 19, 89, 90], em especial sua interação com a molécula de DNA.

A Figura 5.11 A, apresenta a estrutura química da molécula de Carboplatina, que em sistema aquoso, sofre hidrólise atingindo o estado ativo com cátion bivalentes, mostrado na Figura 5.11 B. É possível notar que o segmento ativo da molécula de Carboplatina, Figura 5.11 B, é exatamente igual

a molécula ativa da Cisplatina, Figura 5.1 B, que se liga a estrutura do DNA.

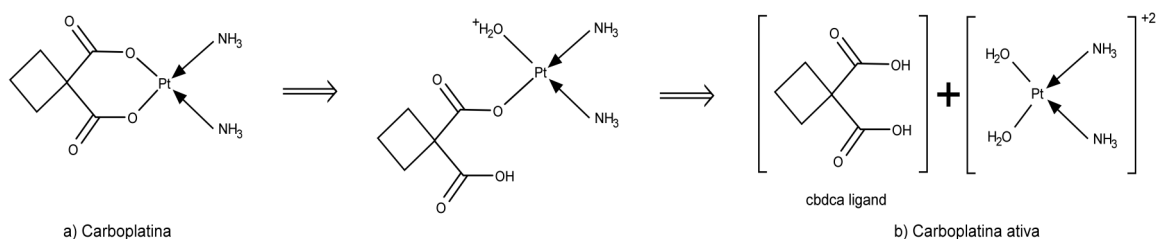


Figura 5.11: Apresentamos em (a) a fórmula estrutural plana e inerte de Carboplatina, enquanto em (b) temos sua forma ativa.

Alguns estudos já foram realizados demonstrando interesse no complexo DNA-Carboplatina[78, 91, 92, 93], mas nenhuma relatou efeitos sobre a força iônica na interação. Nós vamos apresentar como é de fundamental importância para um completo conhecimento desse tipo de interação a análise das propriedades mecânicas dos complexos DNA-Carboplatina como função da força iônica e/ou concentração de contra-íons presente na solução. Com base nos resultados obtidos, as propriedades físico-químicas da interação de DNA-Carboplatina podem ser determinadas para cada condição de contra-íons da solução, em especial a constante de associação de equilíbrio e o seu grau de cooperatividade[61, 94].

5.2.1 Interação DNA-Carboplatina

Nesse trabalho, a concentração padrão de Carboplatina (Sigma-Aldrich) utilizada no experimento para elaboração das alíquotas foi de 2 mM, o que permite uma faixa de concentração que varia desde 0,1 μM até 200 μM . Foram preparados dois conjuntos de alíquotas, sendo eles: um contendo Carboplatina diluída em PBS a 150 mM de NaCl e outro diluída em PBS a 1 mM de NaCl

24.

Todos os experimentos foram realizados com mesma rotina experimental para caracterização do complexo DNA-Carboplatina, ou seja, após atingido o estado de equilíbrio químico. Posteriormente iniciamos a verificação das alterações nas propriedades mecânicas dos complexos sobre efeito de diferentes solventes.

Apresentamos nas Figuras 5.12 e 5.13, respectivamente, o comprimento de persistência A do complexos de DNA-Carboplatina em função da concentração do fármaco na solução C_T , para as duas forças iônicas usadas. Também mostramos o ajuste dos dados de comprimento de persistência com o modelo teórico, que são mostrados como *linhas contínuas*.

Note-se que para força iônica na solução de $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, Figura 5.12, a persistência

²⁴Da mesma forma que a Cisplatina, foi necessário realizar uma diluição prévia em DMSO, devido a baixa solubilidade em solução salina. Solução Carboplatina-DMSO: primeiramente diluímos 3,34 mg de Carboplatina em 1,5 mL de DMSO (ESTOQUE1), em seguida retiramos 222 mL do ESTOQUE1 e diluímos novamente em 778 mL de DMSO (ESTOQUE2), chegando ao final a uma solução de Carboplatina diluída em DMSO na concentração de 2 mM, que foi utilizada para criar as concentrações utilizadas nos experimentos.

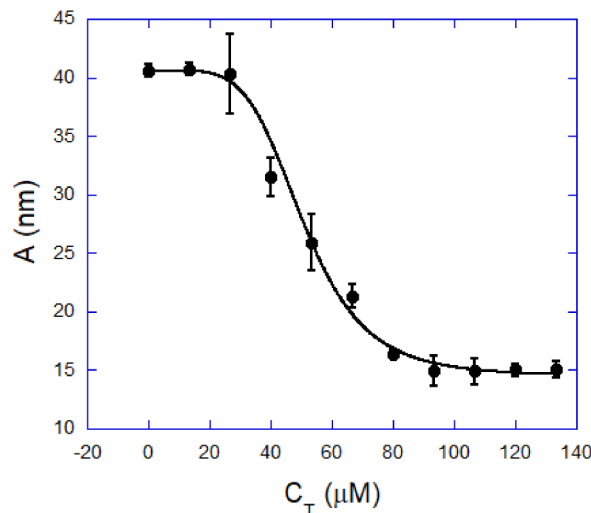


Figura 5.12: Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Carboplatina em solução de $[\text{Na}] = 150$ mM.

Tabela 5.2: Parâmetros físicos obtidos para interação DNA-Carboplatina com base nas concentrações iônicas e suas respectivas barras de erros

$[\text{Na}]$ (mM)	K (M^{-1})	n	A_1 (nm)
1	$(3.9 \pm 0.5) \times 10^5$	2.1 ± 0.3	16.3 ± 0.6
150	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^4$	5.1 ± 0.7	14.5 ± 0.5

diminui em função da concentração do fármaco, apresentando uma forma sigmoide para os dados obtidos, indicando a presença do efeito cooperativo na interação. Além disso, observe que o intervalo de concentração relevante no qual o comprimento de persistência apresenta variação está compreendido entre $0 < C_T < 140 \mu\text{M}$.

Ajustamos os dados experimentais com base no modelo teórico estatístico de desordem de sítios (do inglês, *Quenched-disorder Statistical Model*) dado pela na equação 5.1 [61]. Podemos observar que o comprimento de persistência diminui monotonicamente com o aumento da concentração do fármaco. Escolhemos uma isoterma de ligação adequada e que seja capaz de extrair os parâmetros físico-químicos do sistema. Para nosso caso específico, interação DNA-Carboplatina, a isoterma que mais se ajusta é a de Hill[65] dada pela equação 5.2, uma vez que a interação apresentam efeitos de cooperatividade[64]. Dessa forma, combinando as equações 5.1 e 5.2 podemos então ajustar os dados experimentais do comprimento de persistência A , tal que os parâmetros de ligação (K , r_{max} e n) são deixados como parâmetros ajustáveis pelo modelo de Hill e podem ser determinados a partir do processo de convergência durante o ajuste da curva experimental.

Na Figura 5.13, representamos o comprimento de persistência (A) como função da concentração do fármaco (C_T), em uma solução à concentração de $[\text{Na}] = 1$ mM. Nossos dados experimentais são representados pelo círculos pretos e a curva em preto foi obtida pelo ajuste teórico do modelo estatístico de desordem de sítios em conjunto com a isoterma de Hill. Podemos observar que, o

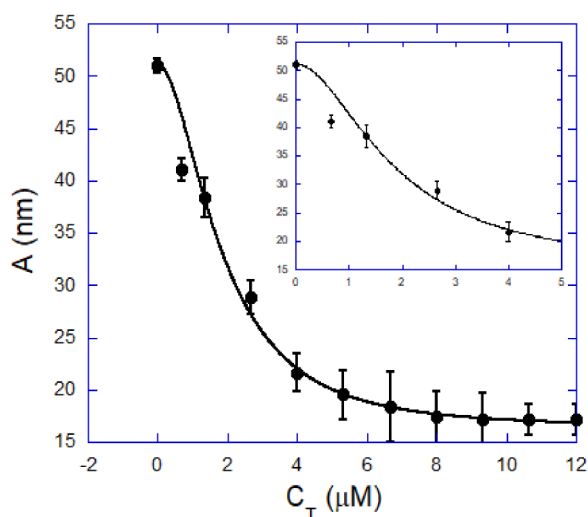


Figura 5.13: Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Carboplatina em solução de $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$

comprimento de persistência diminui com o aumento da concentração do fármaco, sendo nesse caso apresentando menos evidentemente a forma sigmoideal da curva. Faz-se jus uma ampliação da região de menor concentração para melhor visualização. Outra interpretação que pode ser sugerida para as Figuras 5.12 e 5.13 e com base na força iônica da solução, conforme também mostrado na Tabela 5.2. Para baixas forças iônicas (baixa concentração de $[\text{Na}^+]$), a interação possui alta afinidade química (podendo ocorrer mais interações). Por outro lado, ao passo que a força iônica aumenta, isto é, a concentração de $[\text{Na}^+]$ na solução aumenta, temos mais íons $[\text{Na}^+]$ dispersos na solução o que resulta na blindagem do DNA (que possui carga negativa), dificultando e diminuindo a afinidade química de novas interações. Observa-se que a medida que se altera a concentração de PBS, por exemplo do PBS 150 mM para o PBS 1 mM, há um aumento no valor da força iônica. Note que para o PBS 1 mM se observa um ligeiro aumento no valor para força iônica da solução o que sugere uma molécula de DNA já em estado blindado, isto é, temos grande quantidade de íons $[\text{Na}^+]$ dispersos na solução, o que resulta em uma baixa afinidade química para novas interações.

Apresentamos agora as análises dos dados para o outro parâmetro mecânico, o comprimento de contorno (L), obtido com o modelo WLC, utilizando duas diferentes concentrações de Carboplatina que foram previamente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO): I) Carboplatina diluída em solução salina de PBS a 150 mM; II) Carboplatina diluída em solução salina de PBS a 1 mM.

Nas Figuras 5.14 e 5.15 apresentamos os comprimentos de contorno L correspondentes (normalizados pelo valor de DNA puro, $L_0 \sim 16,5 \mu\text{m}$) para os mesmos complexos de DNA-Carboplatina mostrados nas Figuras 5.12 e 5.13, respectivamente.

Temos para a Figura 5.14, a análise do comprimento de contorno L (normalizado pelo valor do DNA puro $L_0 \sim 16.5 \mu\text{M}$) para $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$. Percebemos claramente uma variação do comprimento do contorno como função da concentração do fármaco usada. Nossa ideia é que a interação

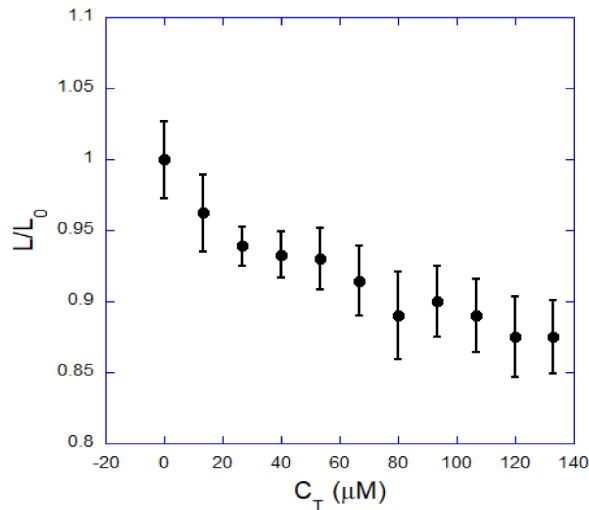


Figura 5.14: Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Carboplatina em solução de $[\text{Na}] = 150$ mM.

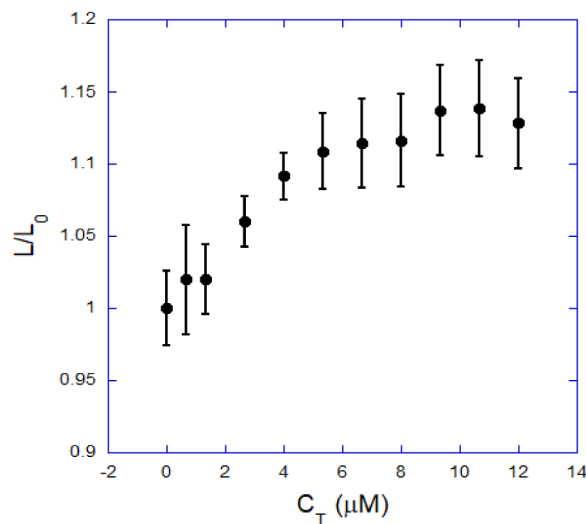


Figura 5.15: Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Carboplatina em solução de $[\text{Na}] = 1$ mM.

com a Carboplatina induz a compactação do DNA, similar ao observado para a Cisplatina[94].

Na Figura 5.15, temos o comprimento de contorno normalizado para $[\text{Na}] = 1$ mM, no qual observamos um comportamento qualitativo diferente na variação do comprimento de contorno no limite na faixa de concentrações analisadas dentro do intervalo $0 < C_T < 14 \mu\text{M}$. Nota-se que o comportamento exibido pela Figura 5.15 é diferentemente à Figura 5.14. Como discutido anteriormente no texto, e com base na discussão da referência sobre a Cisplatina[94], espera-se que a ação da Carboplatina interagindo com o DNA em baixa força iônica seja um tanto quanto similar e apresente capacidade de induzir o aumento no comprimento de contorno do DNA.

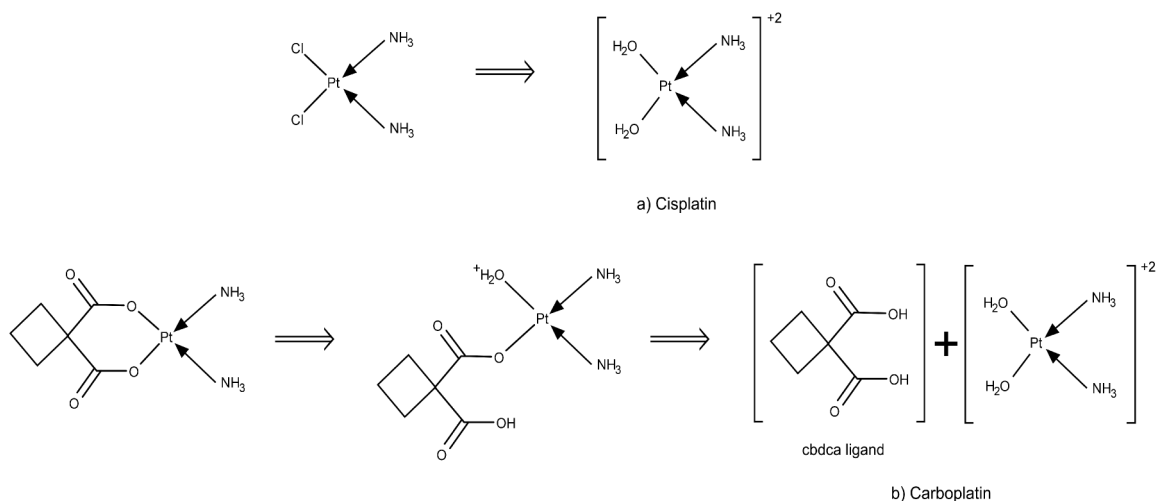


Figura 5.16: (a) Cisplatina. (b) Carboplatina.

5.2.2 Paralelo comparativo entre Carboplatina e Cisplatina

Na Figura 5.16 apresentamos um comparativo das formas de hidrólise dos dois fármacos: Cisplatina e Carboplatina.

Estabelecemos agora uma comparação direta entre os dois fármacos até aqui estudados. Na Figura 5.17, mostramos o comprimento de persistência A do complexo DNA-Carboplatina como em função da concentração do fármaco da amostra, para as duas forças iônicas usadas (círculos pretos). Nós também representamos os ajustes realizados com o modelo teórico, que é mostrados pelas linhas sólidas. Para fins de comparação, mostramos os dados equivalentes obtido para a Cisplatina da secção 5.1 (quadrados vermelhos). Note que para a maior força iônica, isto é, $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, o comportamento do comprimento de persistência diminui em função da concentração do fármaco de forma sigmoïdal, forte indicativo de efeitos cooperativos na interação de ambos compostos de Platina, um resultado previamente conhecido para Cisplatina [50, 94]. Observa-se também a faixa de concentração na qual a persistência varia, sendo $0 < C_T < 140 \mu\text{M}$ para a Carboplatina, enquanto $0 < C_T < 100 \mu\text{M}$ para Cisplatina, o que indica que a Cisplatina apresenta uma maior contante de associação de equilíbrio.

Pelo ajuste dos dados experimentais através do modelo teórico estatístico de desordem de sítios (do inglês, *Quenched-disorder Statistical Model*) [61] dado pela equação 5.1, obtemos os parâmetros da interação DNA-Carboplatina para $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ apresentados na 5.17A: $K = (1,6 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $n = (5,1 \pm 0,7)$, e o comprimento de persistência à saturação, $A_1 = (14,5 \pm 0,5) \text{ nm}$. De forma resumida, apresentamos na Tabela 5.3 para $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, uma comparação direta dos resultados obtidos para Cisplatina [94] e para Carboplatina. Também observamos os valores obtidos para o expoente de Hill ($n \sim 5.1$), que enfatiza nossa ideia mencionada anteriormente sobre a existência de uma cooperatividade positiva, isto é, a ligação de moléculas de Carboplatina na dupla-hélice facilita a ligação subsequente de outras moléculas do fármaco. Observamos que o com-

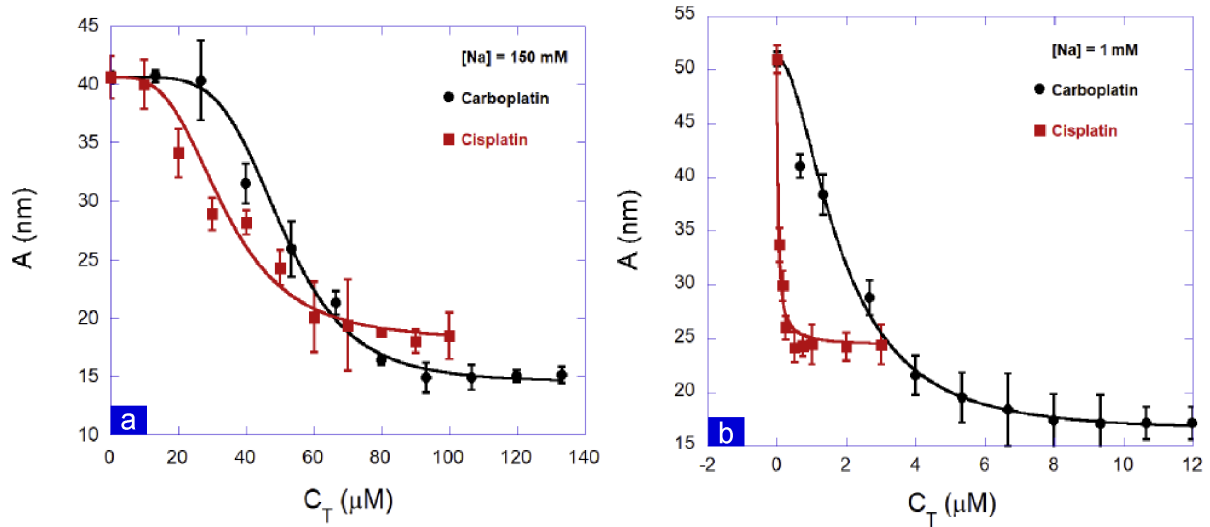


Figura 5.17: Paralelo comparativo do comprimento de persistência como função da concentração de Fármaco entre a Cisplatina e Carboplatina. a) PBS 150 mM, b) PBS 1 mM.

portamento do comprimento de persistência é bem semelhante para os dois fármacos, no entanto a diminuição sigmoidal é mais acentuada no caso da Carboplatina, refletindo o maior grau de cooperatividade, expoente de Hill $n_{\text{Carbo}} \sim 5.1$, em relação ao obtido para a Cisplatina, $n_{\text{Cisp}} \sim 3.4$. Além disso, observe que a Carboplatina induz uma diminuição ligeiramente mais forte no comprimento de persistência do DNA saturado. As constantes de associação de equilíbrio são dadas por $K_{\text{Cisp}} = (2,4 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para Cisplatina, enquanto para a Carboplatina $K_{\text{Carbo}} = (1,6 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Para os dados $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$ Figura 5.17B, a forma sigmoidal da curva de comprimento persistência apresenta-se muito menos evidente, o que significa uma diminuição no grau de cooperatividade para esta condição iônica. Nota-se, que a faixa de concentração relevante na qual a persistência varia é $(0 < C_T < 12 \mu\text{M})$. A diminuição para o valor da força iônica aponta um aumento relevante na constante de associação de equilíbrio da interação DNA-Carboplatina. Do ajuste, obtemos $K = (3,9 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $n = (2,1 \pm 0,3)$ para interação de DNA-Carboplatina, e ainda o comprimento de persistência no estado saturado, $A_1 = (16,3 \pm 0,6) \text{ nm}$. Observa-se que a constante ligação de equilíbrio aumentou mais de uma ordem de magnitude para menores valores da força iônica. Por outro lado, o expoente de Hill diminuiu consideravelmente, indicando que a reação de ligação é ainda cooperativa para baixas forças iônicas.

Na Tabela 5.4 mostramos uma comparação com os dados equivalentes de Cisplatina obtido

Tabela 5.3: Parâmetros de ligação obtidos pelo modelo teórico para $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$

Fármaco	$K \text{ (M}^{-1}\text{)}$	n
Cisplatina	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^4$	3.4 ± 0.4
Carboplatina	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^4$	5.1 ± 0.7

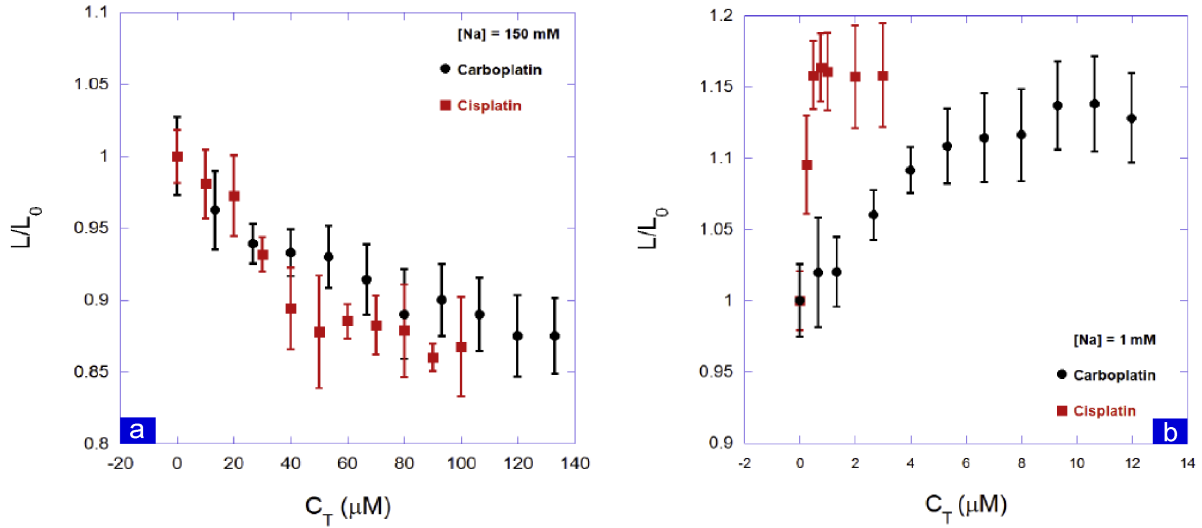


Figura 5.18: Paralelo comparativo do comprimento de contorno como função da concentração de Fármaco entre a Cisplatina e Carboplatina. a) PBS 150 mM, b) PBS 1 mM.

originalmente na referência 5.1 para força iônica de $[Na] = 1\text{ mM}$. Observe que todos as conclusões tiradas no primeiro caso também são válidas aqui quando comparamos os dois fármacos: Carboplatina apresenta maior cooperatividade, $n_{Carbo} \sim 2.1 > n_{Cisp} \sim 1$, e apresenta uma constante de associação de equilíbrio menor. No entanto, para essa força iônica temos $K_{Carbo} = (3,9 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $K_{Cisp} = (1,5 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, tal que a Carboplatina apresenta uma constante de associação de equilíbrio duas ordens de magnitude menor do que a expressada pela Cisplatina para baixa força iônica ($[Na] = 1 \text{ mM}$). Este resultado mostra explicitamente que Carboplatina é muito menos sensível a variações de força iônica em comparação com Cisplatina.

Agora pela Figura 5.18 A, apresentamos o comprimento de contorno correspondente dos dois tipos de complexos formados para $[Na] = 150 \text{ mM}$. Observe que o comportamento é semelhante: o comprimento do contorno diminui cerca de $\sim 12\%$ para Carboplatina e $\sim 13\%$ para Cisplatina na saturação. Essa diminuição está fortemente relacionada à compactação do DNA relatada na literatura para Cisplatina [11]. Isto é promovido principalmente pela ligação de diferentes segmentos de DNA causados pela formação de diaductos, o que pode resultar em ligações cruzadas e loops ao longo da dupla hélice, como discutido em trabalhos anteriores [2, 11, 94]. O fato de que os comportamentos são semelhantes não implicam que a quantidade de diaductos formados são semelhantes para os dois compostos nesta situação. Um único o diaducto pode promover mudanças substanciais no comprimento contorno aparente, dependendo da distância entre os dois pares de DNA específicos

Tabela 5.4: Parâmetros de ligação obtidos pelo modelo teórico para $[Na]=1 \text{ mM}$

Fármaco	$K \text{ (M}^{-1}\text{)}$	n
Cisplatina	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^7$	1.0 ± 0.2
Carboplatina	$(3.9 \pm 0.5) \times 10^5$	2.1 ± 0.3

que liga.

Na Figura 5.18 B, por outro lado, mostra o resultado equivalente obtido para $[Na] = 1 \text{ mM}$. Nesse caso, o comprimento do contorno apresenta um comportamento qualitativo diferente, aumentando cerca de $\sim 13,5\%$ para Carboplatina e $\sim 16\%$ para cisplatina na saturação. Como discutido na seção 5.1, esta mudança no comportamento do comprimento de contorno é provavelmente devido ao desenrolamento do DNA [58, 57] e/ou quebras na cadeia local [59, 60] induzidas pela ligação do fármaco, que tornam-se evidentes quando os fármacos não compactam a molécula de DNA como ocorre em altas forças iônicas [94]. Observe novamente que a Cisplatina apresenta um efeito muito mais forte em baixa força iônica, corroborando com as conclusões extraídas dos dados de comprimento de persistência.

5.3 Oxaliplatina $C_8H_{14}N_2O_4Pt$

Apesar do grande uso em tratamentos quimioterápicos, assim como Cisplatina, a Carboplatina também apresenta uma limitação a cerca da atividade tumoral e os limites impostos pelos efeitos colaterais. Com base nessas informações, houve uma nova busca por um substituto que apresentasse menores efeitos colaterais. A Oxaliplatina (*(1R,2R)-diamino-cyclohexaneoxa latoplatinum(II)*), considerada de 3ª geração, apresenta forma planar $C_8H_{14}N_2O_4Pt$, a qual assume forma ativa após hidrólise $C_8H_{16}N_2O_4Pt^{+2}$. É considerada como uma outra boa opção aos tratamentos quimioterápicos de câncer colorretal [95, 96], esôfago [97, 98], estômago [99, 100] e em muitas outras linhagens de células tumorais [101, 102, 103, 104]. A Oxaliplatina, teve seu uso clínico aprovado no final da década de 80 [89, 105] e apresenta uma atividade maior para algumas linhas de células tumorais e de tumores específicos antes resistentes a Carboplatina e Cisplatina [19]. Possui ainda uma nefrotoxicidade quase desprezível [20, 21, 103, 106].

Segundo a literatura, existe uma preferência da região de ligação tanto pela Cisplatina, como pela Carboplatina e Oxaliplatina de ocorrerem com a guanina N7, apesar que para a Carboplatina existem relatos sobre uma provável afinidade com a citosina, bem como alterações conformacionais entre A- e B- DNA sugeridas tanto para Carboplatina [78] quanto para Oxaliplatina [107]. Sabe-se também que os compostos ativos derivados de Platina tradicionalmente formam adutos com (mas não exclusivamente) as nucleobases da molécula de DNA, ocasionando as chamadas ligações cruzadas entre as nucleobases próximas [19, 108, 109, 110, 111, 112]. Essas ligações cruzadas atuam como bloqueadores da replicação e transcrição do DNA e, finalmente, da divisão celular [113, 114, 115].

A Figura 5.19 A, apresenta a estrutura química da molécula de Oxaliplatina, que em sistema aquoso sofre hidrólise, atingindo o estado ativo com cátion bivalentes, como mostrado na Figura 5.19 B.

Alguns estudos já foram realizados nos últimos anos demonstrando interesse no complexo

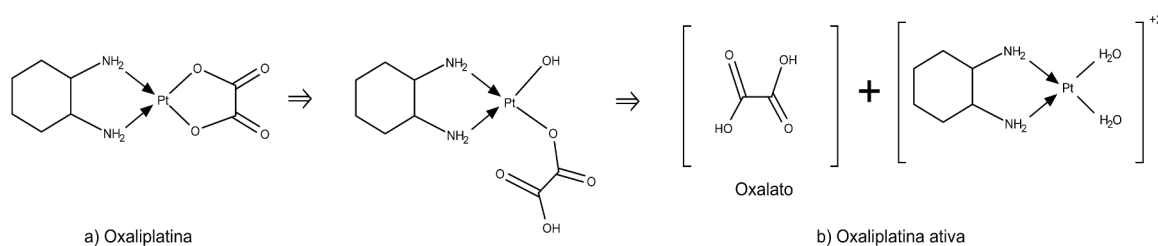


Figura 5.19: Apresentamos em (A) a fórmula estrutural plana e inerte de Oxaliplatina, enquanto em (B) temos sua forma ativa.

DNA-Oxaliplatina[112, 116, 117, 118, 119], mas nenhum relatou efeitos da força iônica na interação. Em vista disso, nós apontaremos como essa informação é essencial para uma completa e profunda formação de ideia a cerca desse tipo de interação e uma análise das propriedades mecânicas dos complexos formados entre DNA-Oxaliplatina como função da concentração de contra-íons em solução. Apoiado nos resultados obtidos, podemos determinar as propriedades físico-químicas da interação de DNA-Oxaliplatina para cada concentração de contra-íons da solução estudada, juntamente com a constante de associação de equilíbrio, o parâmetro de ligação físico-químico do sistema e o grau de cooperatividade [94, 120, 121].

5.3.1 Interação da molécula de DNA e Oxaliplatina

Nesse trabalho, a concentração padrão de Oxaliplatina (Sigma-Aldrich) utilizada no experimento para elaboração das alíquotas foi de 2 mM, o que permite uma faixa de concentração que varia desde 0,1 μM até 200 μM . Foram preparados dois conjuntos de alíquotas, sendo eles: um contendo Oxaliplatina diluída em PBS a 150 mM de NaCl e outro diluída em PBS a 1 mM de NaCl²⁵.

Todos os experimentos foram realizados com mesma rotina experimental para caracterização do complexo DNA-Oxaliplatina, ou seja, após atingido o estado de equilíbrio químico. Posteriormente iniciamos a verificação das alterações nas propriedades mecânicas do complexo sobre efeito de diferentes solventes.

Apresentamos pelas Figuras 5.20 e 5.21, respectivamente, o comprimento de persistência A do complexos de DNA-Oxaliplatina em função da concentração do fármaco na solução C_T , para as duas forças iônicas usadas. Também mostramos o ajuste dos dados de comprimento de persistência com o modelo teórico, que são mostrados como *linhas contínuas*.

Note que para força iônica na solução de $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, Figura 5.20, a persistência diminui em função da concentração do fármaco. Além disso, observe que o intervalo de concentração relevante no qual o comprimento de persistência apresenta variação está compreendido entre $0 < C_T <$

²⁵Da mesma forma que a Cisplatina e Carboplatina, foi necessário realizar uma diluição prévia em DMSO, devido a baixa solubilidade em solução salina. Solução Oxaliplatina-DMSO: primeiramente diluímos 3,34 mg de Carboplatina em 1,5 mL de DMSO (ESTOQUE1), em seguida retiramos 222 mL do ESTOQUE1 e diluímos novamente em 778 mL de DMSO (ESTOQUE2), chegando ao final a uma solução de Carboplatina diluída em DMSO na concentração de 2 mM, que foi utilizada para criar as concentrações utilizadas nos experimentos.

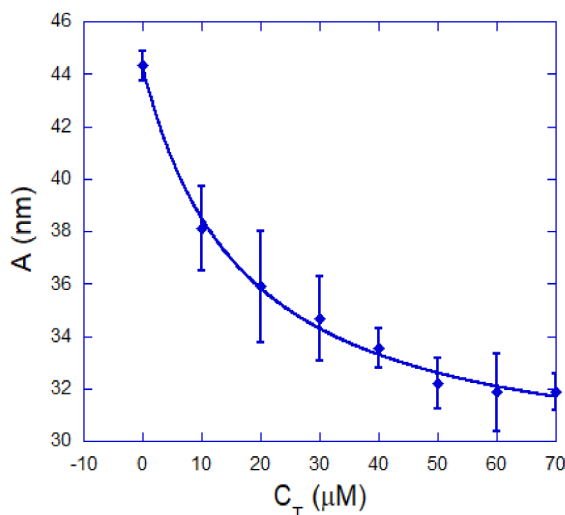


Figura 5.20: Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Oxaliplatina em solução de $[\text{Na}] = 150$ mM.

Tabela 5.5: Parâmetros físico-químicos obtidos para interação DNA-Oxaliplatina com base nas concentrações iônicas e suas respectivas barras de erros

$[\text{Na}]$ (mM)	K (M^{-1})	n	A_1 (nm)
1	$(1.1 \pm 0.3) \times 10^7$	1	39 ± 1
150	$(4.0 \pm 0.7) \times 10^4$	1	29 ± 1

70 μM .

Ajustando os dados experimentais com base no modelo teórico estatístico de desordem de sítios (do inglês, *Quenched-disorder Statistical Model*) dado pela na equação 5.1 [61], observa-se que o comprimento de persistência diminui monotonicamente com o aumento da concentração do fármaco. Posteriormente, analisando com base na isoterma de ligação de Hill[65], que permite extrair os parâmetros físico-químicos do sistema pela equação 5.2, nota-se claramente ausência dos efeitos de cooperatividade[64], logo $n = 1$. Sendo assim, pela combinando das equações 5.1 e 5.2 podemos então ajustar os dados experimentais do comprimento de persistência A , tal que os parâmetros de ligação (K, r_{max}) são deixados como parâmetros ajustáveis pelo modelo de Hill e são determinados pelo processo de convergência durante o ajuste da curva experimental.

Na Figura 5.21, representamos o comprimento de persistência (A) como função da concentração do fármaco (C_T), em uma solução à concentração de $[\text{Na}] = 1$ mM. Nossos dados experimentais são representados pelo losangos azuis e a curva em azul foi obtida pelo ajuste teórico do modelo estatístico de desordem de sítios em conjunto com a isoterma de Hill. Podemos observar que, o comprimento de persistência diminui com o aumento da concentração de fármaco, sem indicativos de presença da forma sigmoidal da curva, a qual expressa presença de efeitos de cooperatividade, logo, $n = 1$. Seguindo o procedimento da análise realizada no caso anterior, sugerimos novamente outra interpretação, com base na concentração iônica da solução conforme também mostrado na

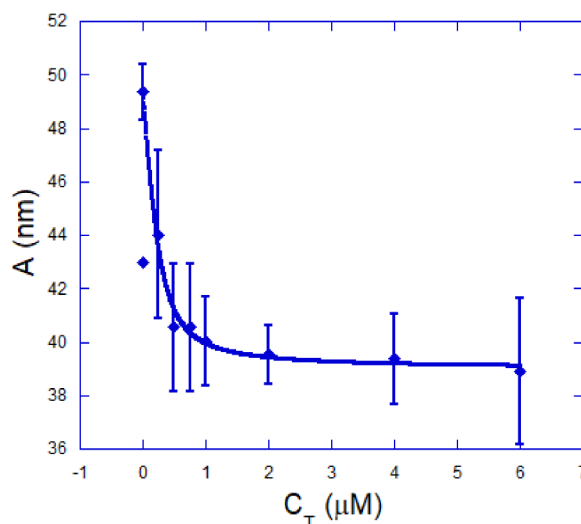


Figura 5.21: Comprimento de persistência (A) como função da concentração de DNA-Oxaliplatina em solução de $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$

Tabela 5.5. Para pequenos valores de concentração de fármaco, o que sugere uma molécula de DNA já em estado blindado, isto é, existe uma grande quantidade de íons $[\text{Na}^+]$ dispersos em solução, o que ocasiona em uma baixa afinidade química para novas interações.

Outra interpretação que pode ser sugerida para as Figuras 5.20 e 5.21 e com base na força iônica da solução, conforme também mostrado na Tabela 5.5. Para baixas forças iônicas (baixa concentração de $[\text{Na}^+]$) (PBS 1 mM), a interação apresenta alta afinidade química (podendo ocorrer mais interações). Por outro lado, ao passo que a força iônica aumenta, isto é, a concentração de $[\text{Na}^+]$ na solução aumenta, temos mais íons $[\text{Na}^+]$ dispersos o que resulta na blindagem do DNA (que possui carga negativa), dificultando e diminuindo a afinidade química de novas interações.

Apresentamos agora as análises dos dados para o outro parâmetro mecânico, o comprimento de contorno (L), obtidos com o modelo WLC, utilizando diferentes concentrações de Oxaliplatina que foram previamente diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO): I) Carboplatina diluída em solução salina de PBS a 150 mM; II) Oxaliplatina diluída em solução salina de PBS a 1 mM.

Nas Figuras 5.22 e 5.23 apresentamos os comprimentos de contorno L correspondentes (normalizados pelo valor de DNA puro, $L_0 \sim 16,5 \mu\text{m}$) para os mesmos complexos de DNA-Oxaliplatina mostrados nas Figuras 5.22 e 5.23, respectivamente.

Temos para a Figura 5.22 a análise do comprimento do contorno L (normalizado pelo valor do DNA puro $L_0 \sim 16.5 \mu\text{M}$) para $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$. Percebemos uma forte dependência do comprimento do contorno como função da concentração de fármaco usada. Nossa ideia é que a interação com a Oxaliplatina induz a compactação do DNA pela formação de cross-link e loops na dupla hélice, que resulta na diminuição do comprimento de contorno para forças dentro do regime entrópico.

Da mesma forma, na Figura 5.23, temos o comprimento de contorno normalizado para $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$. Similarmente à Figura 5.22, também observamos uma variação expressiva do comprimento

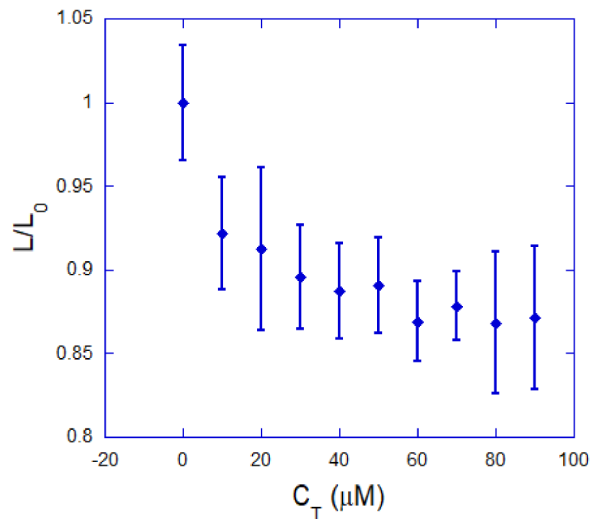


Figura 5.22: Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Oxaliplatina em solução de $[\text{Na}] = 150$ mM.

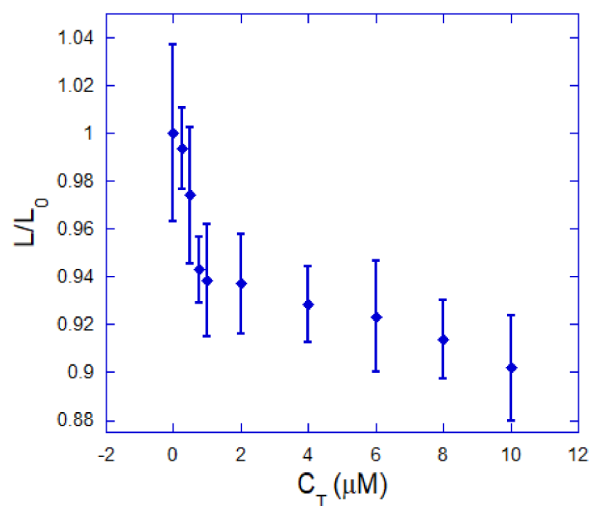


Figura 5.23: Comprimento de contorno (L) como função da concentração de DNA-Oxaliplatina em solução de $[\text{Na}] = 1$ mM.

de contorno dentro da faixa de concentrações analisadas entre o intervalo $0 < C_T < 12\mu\text{M}$. Como discutido anteriormente no texto, acredita-se que a ação da Oxaliplatina interagindo com a molécula de DNA em baixas condição iônica é capaz de induzir a compactação do DNA reduzindo seu comprimento do contorno.

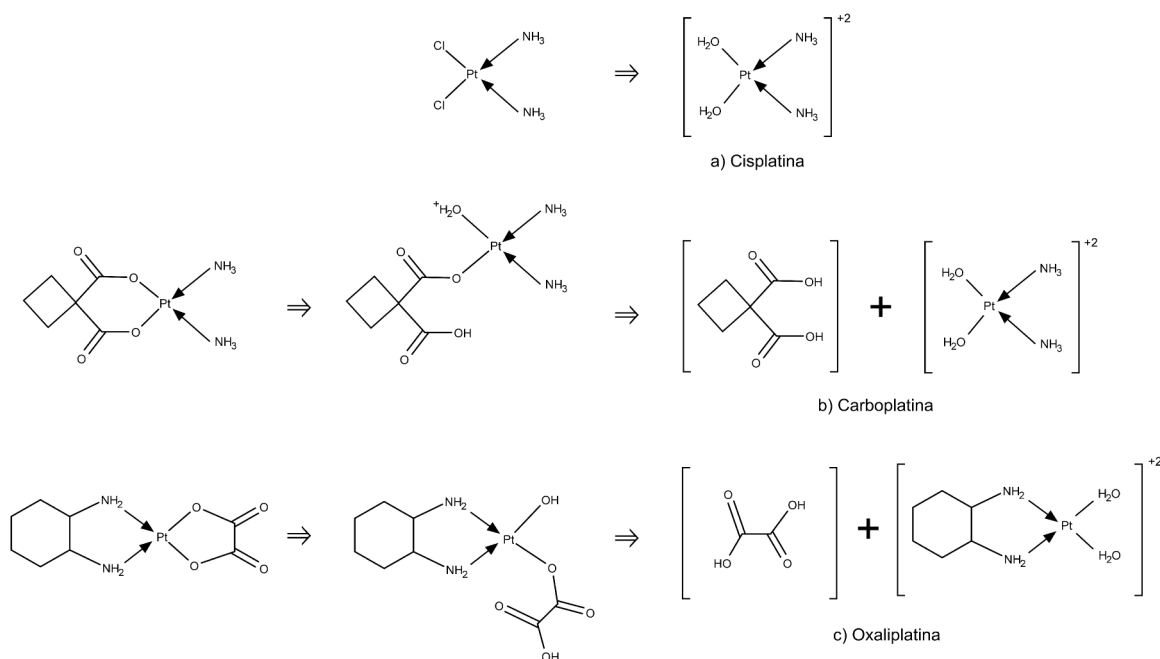


Figura 5.24: (a) Cisplatina. (b) Carboplatina. (c) Oxaliplatina.

5.4 Paralelo comparativo entre Oxaliplatina, Carboplatina e Cisplatina no Regime Entrópico

A Figura 5.24 apresenta um comparativo das formas de hidrólise dos três fármacos: Cisplatina, Carboplatina e Oxaliplatina.

Na Figura 5.25, mostramos o comprimento de persistência A do complexo DNA-Oxaliplatina como em função da concentração do fármaco da amostra, para as duas forças iônicas usadas (losangos azuis). Nós também representamos os ajustes realizados com o modelo teórico, que é mostrados pelas linhas sólidas. Para fins de comparação, mostramos os dados equivalentes obtido para a Cisplatina da seção 5.1 (quadrados vermelhos) e Carboplatina seção 5.2 (círculos pretos). Note que para a maior força iônica, isto é, $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, o comportamento do comprimento de persistência diminui em função da concentração do fármaco, por curva de forma sigmoideal para Cisplatina e Carboplatina, como forte indicativo de efeitos cooperativos na interação, enquanto para Oxaliplatina apresenta um decaimento não-monotônico. Observa-se também a faixa de concentração na qual a persistência varia, sendo $0 < C_T < 100 \mu\text{M}$ para Cisplatina, enquanto $0 < C_T < 140 \mu\text{M}$ para a Carboplatina e $0 < C_T < 70 \mu\text{M}$ para Oxaliplatina.

De forma resumida, temos do ajuste dos dados experimentais através do modelo teórico estatístico de desordem de sítios[61] dado pela equação 5.1, os parâmetros da interação DNA-Oxaliplatina para $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ apresentados na 5.25A: $K = (4,0 \pm 0,7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $n = 1$, enquanto para o comprimento de persistência à saturação, $A_1 = (29 \pm 1) \text{ nm}$. De forma resumida, apresentamos na Tabela 5.6 para $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, uma comparação direta com os resultados obtidos para Cisplatina seção 5.1 e para Carboplatina seção 5.2. Também observamos os valores

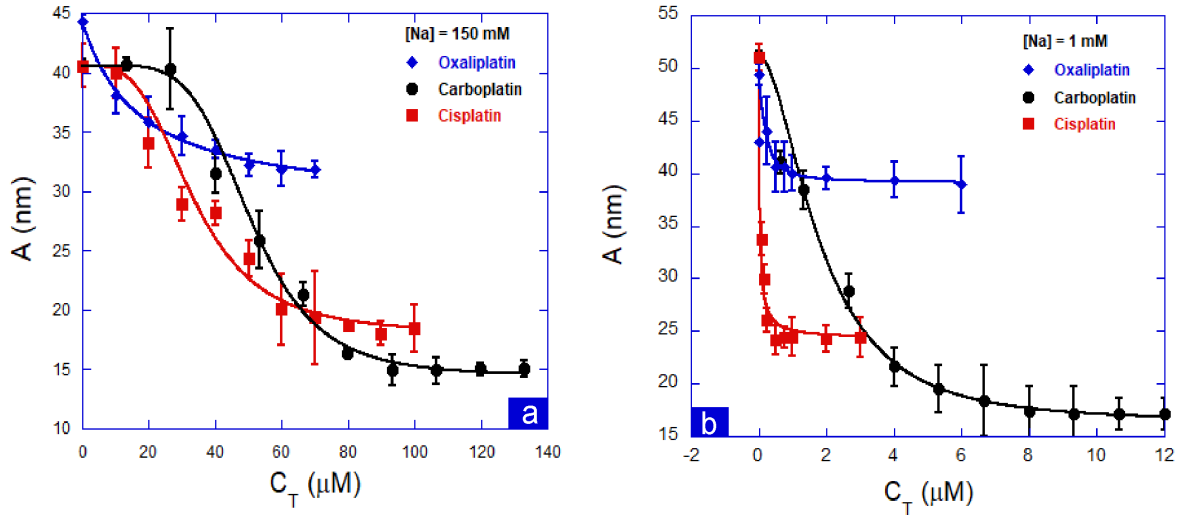


Figura 5.25: Paralelo comparativo do comprimento de persistência como função da concentração de Fármaco entre a Cisplatina, Carboplatina e Oxaliplatina. a) PBS 150 mM, b) PBS 1 mM.

obtidos para o expoente de Hill ($n \sim 1$), que enfatiza nossa ideia mencionada anteriormente sobre a não existência do efeito de cooperatividade para Oxaliplatina, isto é, a ligação de moléculas de Oxaliplatina na dupla-hélice não facilita nem dificulta a ligação subsequente de outras moléculas do fármaco. Observamos que o comportamento do comprimento de persistência é bem semelhante entre os fármacos Cisplatina e Carboplatina, sendo o expoente de Hill $n_{Cisp} \sim 3.4$ para Cisplatina enquanto para Carboplatina $n_{Carbo} \sim 5.1$. Além disso, observe que a Carboplatina induz uma ligeira diminuição no comprimento de persistência do DNA saturado. As constantes de associação de equilíbrio são dadas por $K_{Cisp} = (2,4 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para Cisplatina, enquanto para a Carboplatina $K_{Carbo} = (1,6 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $K_{Oxa} = (4,0 \pm 0,7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para Oxaliplatina.

Para os dados $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$ Figura 5.25B, a forma sigmoidal da curva de comprimento persistência se apresenta muito menos evidente para Carboplatina, o que significa uma diminuição no grau de cooperatividade para esta condição iônica, enquanto para Cisplatina e Oxaliplatina não se observa a forma sigmoidal da curva que caracteriza efeito de cooperatividade na interação. Nota-se, que a faixa de concentração relevante na qual a persistência varia é ($0 < C_T < 3 \mu\text{M}$) para Cisplatina, ($0 < C_T < 12 \mu\text{M}$) para Carboplatina e ($0 < C_T < 6 \mu\text{M}$) para Oxaliplatina.

Na Tabela 5.7 mostramos uma comparação com os dados equivalentes de Cisplatina obtido originalmente na seção 5.1 e Carboplatina seção 5.2 para força iônica de $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$. Observe que todas as conclusões tiradas no primeiro caso também são válidas aqui quando comparando os

Tabela 5.6: Parâmetros de ligação obtidos pelo modelo teórico para $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$

Fármaco	$K \text{ (M}^{-1}\text{)}$	n
Oxaliplatina	$(4.0 \pm 0.7) \times 10^4$	1
Cisplatina	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^4$	3.4 ± 0.4
Carboplatina	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^4$	5.1 ± 0.7

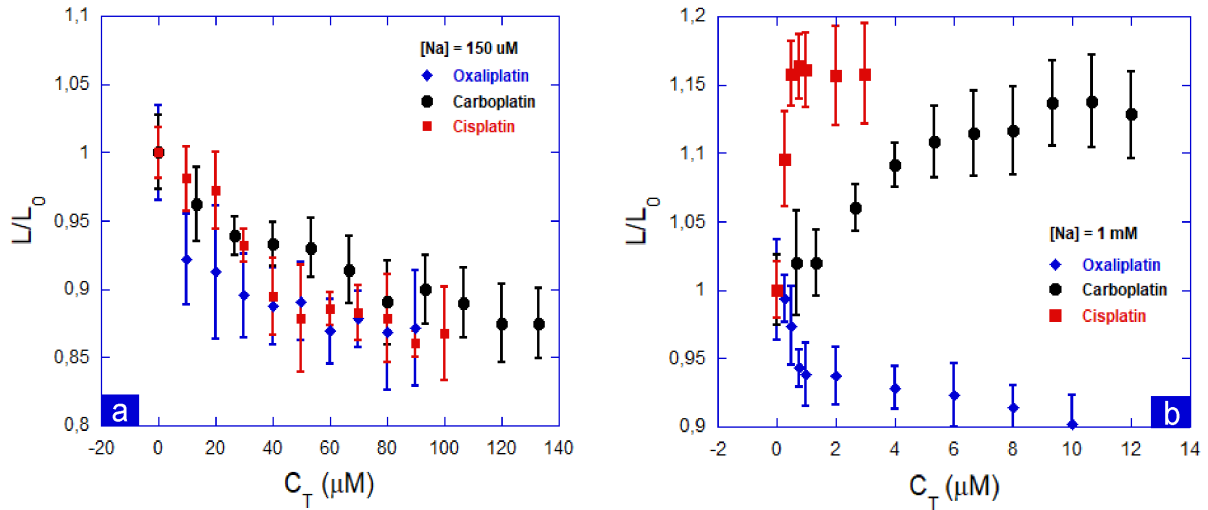


Figura 5.26: Paralelo comparativo do comprimento de contorno como função da concentração de Fármaco entre a Cisplatina, Carboplatina e Oxaliplatina. a) PBS 150 mM, b) PBS 1 mM.

fármacos: Carboplatina apresenta maior cooperatividade, $n_{Carbo} \sim 2.1 > n_{Cisp} \sim 1$, e apresenta um equilíbrio menor constante de associação, enquanto a Oxaliplatina não exibe cooperatividade, $n = 1$. No entanto, para essa força iônica temos $K_{Cisp} = (1,5 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $K_{Carbo} = (3,9 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $K_{Oxa} = (1,1 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, tal que a Carboplatina apresenta uma constante de associação de equilíbrio duas ordens de magnitude menor do que a expressada tanto pela Cisplatina quanto pela Oxaliplatina para baixa força iônica ($[Na] = 1 \text{ mM}$). Este resultado mostra explicitamente que a Carboplatina é muito menos sensível a variações de força iônica quando comparada com as outras dois fármacos. No entanto, a Cisplatina e Oxaliplatina se mostram com mesma ordem de grandeza e similar sensibilidade as variações de força iônica.

Em resumo, a Oxaliplatina apresenta uma constante de associação de equilíbrio de mesma ordem de magnitude que a Cisplatina para ambas as forças iônicas estudadas, sendo muito sensíveis às mudanças de forças iônicas. Em contrapartida, a Carboplatina apresenta uma constante de associação de equilíbrio na mesma ordem de magnitude dos dois fármacos relacionados apenas na maior força iônica ($[Na] = 150 \text{ mM}$), mas apresenta duas ordens de magnitude menor quando comparada para baixa força iônica ($[Na] = 1 \text{ mM}$). Este resultado mostra como a Oxaliplatina é menos sensível a variações de força iônica em comparação a Cisplatina, no entanto, se mostra mais sensível quando comparada a Carboplatina.

Na Figura 5.26A apresentamos o comprimento de contorno correspondente aos três tipos

Tabela 5.7: Parâmetros de ligação obtidos pelo modelo teórico para $[Na]=1 \text{ mM}$

Fármaco	$K \text{ (M}^{-1}\text{)}$	n
Oxaliplatina	$(1.1 \pm 0.3) \times 10^7$	1
Cisplatina	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^7$	1.0 ± 0.2
Carboplatina	$(3.9 \pm 0.5) \times 10^5$	2.1 ± 0.3

de complexos formados para $[Na] = 150 \text{ mM}$. Observe que o comportamento é bem semelhante: o comprimento do contorno diminui cerca de $\sim 12\%$ para Oxaliplatina e Carboplatina enquanto para Cisplatina $\sim 13\%$ na saturação. Essa diminuição está fortemente relacionada à compactação do DNA relatada na literatura [2, 122, 50, 94, 121, 11], devido principalmente pelo surgimento de ligações em diferentes segmentos de DNA originados pela formação de diaductos, o que pode resultar em ligações cruzadas e loops ao longo da dupla hélice. O fato de que os comportamentos são semelhantes não implicam que a quantidade de diaductos formados são semelhantes para os dois compostos nesta situação. Um único o diaducto pode promover mudanças substanciais no comprimento contorno aparente, dependendo da distância entre os dois pares de DNA específicos que liga.

Na Figura 5.26B, por outro lado, mostra o resultado obtido para $[Na] = 1 \text{ mM}$. Nesse caso, o comprimento do contorno aumenta cerca de $\sim 16\%$ para Cisplatina e $\sim 13,5\%$ para Carboplatina, enquanto para Oxaliplatina o comprimento de contorno diminui cerca de $\sim 10\%$ na saturação. Como discutido na seção 5.1, esta mudança no comportamento do comprimento de contorno é provavelmente devido ao desenrolamento do DNA [58, 57] e/ou quebras na cadeia local [59, 60] induzidas pela ligação do fármaco, que tornam-se evidentes quando os fármacos não compactam a molécula de DNA [94, 121]. Também nota-se novamente que a Cisplatina apresenta um efeito muito mais forte em baixa força iônica, corroborando com as conclusões extraídas dos dados de comprimento de persistência. Por outro lado, para Oxaliplatina, observamos que o comprimento de contorno diminui para baixas forças iônicas como resultado de uma compactação da molécula de DNA com o fármaco. Provavelmente, a presença de um anel aromático na estrutura da Oxaliplatina está relacionada a esse efeito.

5.5 Paralelo comparativo entre Oxaliplatina, Carboplatina e Cisplatina no Regime Entálpico

Nesse momento, temos o interesse em obter informações sobre a cinética de compactação do DNA sob ação dos fármacos derivados de Platina, quando submetidos ao regime entálpico, isto é, experimentos que utilizam forças na escala de dezenas de pN. Todos os experimentos foram realizados seguindo a mesma rotina experimental e para baixa força iônica, ou seja, solução tampão de $[Na] = 1 \text{ mM}$; e fez-se o uso de uma concentração de saturação de fármaco à 20 mM , com intuito de maximizar o efeito dos fármacos na estrutura do DNA.

Na Figura 5.27, mostramos três curvas típicas de força-extensão obtidas para Cisplatina em diferentes tempos de incubação dentro do regime entálpico. A primeira curva para um tempo de incubação de $0,5 \text{ h}$ (círculos pretos), a segunda curva para um tempo de incubação intermediário de $\sim 5 \text{ h}$ (quadrados vermelhos) e por fim, a última curva após um tempo de incubação relativamente longo $\sim 15 \text{ h}$ (losangos azuis). Dois comportamentos distintos podem ser observados. Para

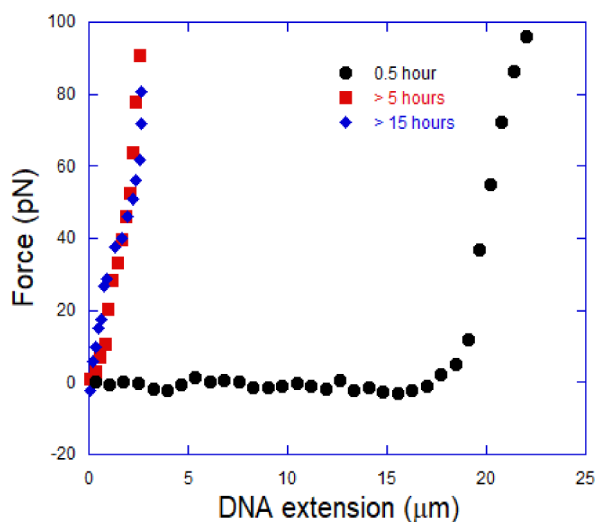


Figura 5.27: Curva de força por extensão de DNA-Cisplatina em PBS $[Na] = 1$ mM depois de 0.5 horas (Círculos pretos), 5 horas (quadrados vermelhos) e 15 horas (losangos azuis) de incubação.

um tempo de 0,5 h de incubação a curva força-extensão não apresenta o já bem definido platô de desnaturação que ocorre para o DNA puro próximo ~ 65 pN, no entanto, o comprimento do contorno ainda se apresenta próximo ao valor do DNA puro. Esse resultado é um forte indicio de que não há abertura da dupla hélice que é associada à ruptura das ligações de hidrogênio entre os pares de base da molécula de DNA, sugerindo que a formação de diaductos intercadeias já ocorreu. Especificamente, esses diadutos necessitam de uma energia muito maior para se romper, uma vez que eles são formados através de ligações covalentes entre o fármaco e os pares de bases do DNA. Desse modo, o rompimento da dupla hélice é impedido devido a formação de diaductos ao longo da dupla hélice do DNA. Sendo assim, o platô de desnaturação que comumente surge a 65 pN dissipa-se das curvas de força-extensão. Por outro lado, o efeito de compactação do DNA requer um maior tempo de interação para ocorrer (> 5 h). Esse efeito está diretamente relacionado a formação dos diaducto entre os segmentos da molécula de DNA relativamente distantes, gerando o que chamamos de microloops e ligações do tipo crosslinks, sendo a formação desse tipo de estrutura muito mais lenta quando comparada a formação de diaductos entre os pares adjacentes (próximos), muito mais rápida.

Na Figura 5.28 mostramos as curvas equivalentes de força-extensão obtido para os complexos DNA-Oxaliplatina. Observe que o comportamento é muito semelhante ao encontrado para Cisplatina, indicando que há fortes indícios de mesma dinâmica de reação, tal que a formação de diaducto entre pares de bases adjacentes é relativamente rápida, enquanto para formação de microloops e crosslinks em segmentos distantes possui um uma cinética mais lenta para compactação do DNA.

Finalmente, a Figura 5.29 mostra as curvas de força-extensão equivalentes para Carboplatina. Aqui o comportamento qualitativo é completamente diferente. Para um baixo tempo de

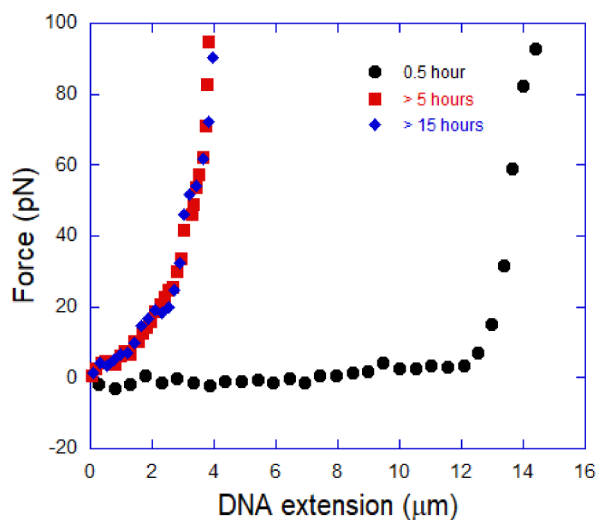


Figura 5.28: Curva de força por extensão de DNA-Oxaliplatina em PBS $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$ depois de 0.5 horas (Círculos pretos), 5 horas (quadrados vermelhos) e 15 horas (losangos azuis) de incubação.

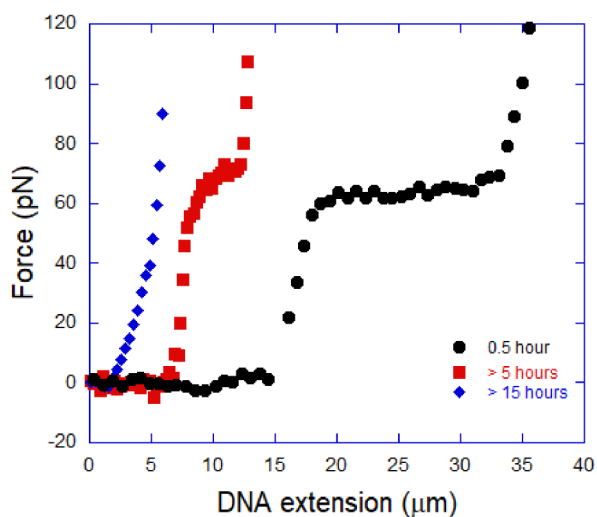


Figura 5.29: Curva de força por extensão de DNA-Carboplatina em PBS $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$ depois de 0.5 horas (Círculos pretos), 5 horas (quadrados vermelhos) e 15 horas (losangos azuis) de incubação.

incubação de $\sim 0,5$ h, a força por extensão curva exibe o platô de desnaturação característico próximo a ~ 65 pN. Isso mostra fortemente que os diaductos intracadeias ainda não se formaram. Dessa forma, com um baixo tempo de incubação de 0,5 h, há formação principalmente de monoaddutos. Por outro lado, para um tempo de incubação muito longo (> 15 h), o platô de desnaturação é completamente suprimido, similar ao que foi observado para Cisplatina e Oxaliplatina, sendo também forte indicativo sobre a existência de uma cinética da interação DNA-Carboplatina muito mais lenta quando comparada aos outros dois medicamentos estudados. Este resultado de cinética muito lenta está associado ao processo de hidrólise da Carboplatina, como relatado em primeiro momento por Knox[123]. Esses resultados corroboram nossa conclusão traçada na seção anterior, onde mostramos que a Oxaliplatina e Cisplatina são mais reativas, enquanto a Carboplatina é muito menos reativa quando comparados para tempos de incubação da ordem de 0,5 h em baixas concentrações iônicas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho, apresenta um estudo direcionado a fármacos comumente usados em tratamentos de doenças humanas (quimioterapias e/ou terapias gênicas), onde tomamos como área de interesse fármacos derivados de um mesmo elemento químico, a Platina. Nele, utilizamos uma importante técnica para caracterizar os complexos formados na interação desses fármacos com a molécula de DNA, a espectroscopia de força sobre molécula única realizado com Pinça Óptica. Essa técnica, permite a micromanipulação de partículas únicas, o que possibilita obter os parâmetros mecânicos da interação para apenas um único complexo DNA-fármaco e modelá-lo com uso do modelo teórico WLC. Por conseguinte, ainda admite um estudo da físico-química da interação pelo modelo de desordem de sítios acoplado ao Modelo de Hill.

Em primeiro momento, trabalhamos com a Cisplatina, um fármaco derivado da Platina, muito utilizado em tratamento de câncer. Mostramos como a formação do complexo DNA-Cisplatina possui forte dependência da força iônica (concentração de $[\text{Na}^+]$). Utilizamos nesse estudo três diferentes concentrações iônicas (buffers salinos): $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, $[\text{Na}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$, para determinar os parâmetros de ligação que caracterizam a interação DNA-Cisplatina.

Observou-se também que a constante de equilíbrio (K), para Cisplatina, diminui com o aumento da concentração de contra-íon (Na^+) da solução, onde utilizamos essa diminuição para estimar o valor da carga líquida efetiva da Cisplatina em solução. Já a cooperatividade expressa pelo coeficiente de Hill (n), que é o grau de afinidade das ligações com a molécula de DNA, apresentou um crescimento a medida que a força iônica aumenta (concentração de Na^+), resultado observado devido as diferentes alterações conformacionais induzidas quando se estabelece a ligação do fármaco com a dupla hélice do DNA, realizado sob diferentes condições iônicas.

Em um segundo momento, abordamos a Carboplatina, um fármaco de 2^a geração também derivado da Platina, que surgiu com ideia de diminuir os efeitos colaterais no paciente, mas mantendo a mesma eficácia na atividade tumoral. Apresentamos como o complexo DNA-Carboplatina possui forte dependência da força iônica, utilizamos nesse caso duas concentrações iônicas: $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ e $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$, para determinar os parâmetros de ligação na interação.

Por fim, verificamos a Oxaliplatina, outro fármaco, também derivado da Platina, mas agora de 3^a geração. A Oxaliplatina veio com mesmo intuito que a Carboplatina, diminuir os efeitos colaterais mas mantendo similar eficácia na atividade tumoral. Nosso trabalho mostrou como o complexo DNA-Oxaliplatina possui dependência da força iônica, usamos nesse caso duas concentrações iônicas $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ e $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$, para determinar os parâmetros de ligação na interação.

De forma geral, nossos resultados apresentam um estudo do equilíbrio e da cinética da reação na formação dos complexos a nível de molécula única. Determinamos as propriedades mecânicas

desses complexos. Esboçamos as curvas de força por extensão, tanto no regime entrópico de baixas forças quanto no entálpico de altas forças. Usando os dados obtidos para o comprimento de persistência, os parâmetros de ligação de equilíbrio da interação foram obtidos, tal que a constante de ligação de equilíbrio (K) aumenta para forças iônicas menores, com preferência quase exclusiva a não-cooperatividade entre as ligações em baixas forças iônicas. Além das análises individuais, buscamos estabelecer um comparativo entre os fármacos usados, uma vez que são oriundos do mesmo elemento químico. Posto isso, descobrimos que a Oxaliplatina apresenta uma reatividade muito semelhante à Cisplatina independente da força iônica utilizada em regime de baixas forças (entrópico), se mostrando superior à reatividade da Carboplatina, curiosamente essa que após hidrólise possui a mesma forma ativa que a Cisplatina. Em análise para o regime de altas forças (entálpico), conseguimos obter informações a cerca da cinética de formação dos diaductos ao longo da cadeia em dupla hélice do DNA, induzida pelas interações com os fármacos. Tal análise corrobora com nossas conclusões do regime entrópico, o qual apresenta a Oxaliplatina com uma cinética de ligação similar à Cisplatina e superior à cinética apresentada pela Carboplatina.

Finalmente, os resultados e conclusões obtidos aqui, fornecem importantes informações sobre as interações estabelecidas entre a molécula de DNA e a classe dos compostos derivados de Platina. Lembrando que essa classe de composto é a mais comumente utilizada em tratamentos quimioterápicos, e novas informações sobre a forma de interação com a molécula de DNA é essencial para posteriores melhorias na eficiência e qualidade de vida dos pacientes submetidos a esses tipos de tratamentos, da mesma forma, auxiliar no desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos mais eficazes e menos agressivos com o organismo humano.

Dois desses trabalhos já foram publicados e outro está submetido. Mais detalhes podem ser encontrados na Seção 7, 8.

APÊNDICE

Apêndice A - Outra abordagem sobre a Teoria de Pinça Óptica

Conforme abordado anteriormente na Seção 2.1, Maxwell já havia demonstrado que a luz era capaz de transferir momento a um objeto quando incidisse sobre ele, exercendo uma força sobre esse objeto. À vista desse fato, temos a origem do pinçamento óptico, quando um feixe de luz fortemente focalizado é capaz de transferir momento pra uma micropartícula, exercendo assim uma força que depende da potência da luz incidente e da velocidade de propagação no meio de incidência. Considerando apenas um único raio do feixe de luz, podemos relembrar a definição da força de *pressão de radiação*, pelas equações 2.5

$$F \propto \frac{P_{raio}}{v}, \text{ tal que } v = \frac{c}{n_m}$$

sendo P_r é a potência do raio e n_m é o índice de refração do meio de incidência.

Quanticamente, entendemos que a origem do fenômeno de pinçamento óptico decorre do fato que a luz transporta momento linear em seus fótons e dessa forma é capaz de exercer força sobre objetos, transferindo momento a eles. Essa abordagem já foi discutida anteriormente na Seção 2.1. Vejamos agora a ideia clássica, na qual fazemos uso do tensor de *stress* de Maxwell.

Sabe-se que a interação entre a luz e matéria pode apresentar comportamentos distintos dependentes da fonte de excitação (polarização, intensidade, etc) e das características intrínsecas da matéria. De forma geral, a força depende do campo aplicado e das características do material e pode ser descrita por um campo eletromagnético tal que segundo as equações de Maxwell, temos para o campo eletromagnético exerce uma força que pode ser dada por

$$F_{mec}(r, t) = q [E(r, t) + v(r, t) \times B(r, t)] = \int_V [\rho(r, t)E(r, t) + j(r, t) \times B(r, t)] dV. \quad (6.1)$$

Sendo a carga q em movimento com velocidade $v(r, t)$. A primeira parte da expressão 6.1 descreve uma carga q se movendo com uma velocidade v na presença de um campo eletromagnético. A força que essa carga experimenta é chamada de força de Lorentz, enquanto a segunda parte da expressão faz menção a densidade de carga e corrente, isto é, a expressão descreve a força de Lorentz para uma distribuição de carga ρ e densidade de corrente j num dado volume arbitrário V , tal que o momento linear é conservado, logo

$$\frac{d}{dt} [P_{campo}(r, t) + P_{mec}(r, t)] = \int_V \nabla \cdot T dV, \quad (6.2)$$

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

$$T = \frac{1}{4\pi} \left[\epsilon\epsilon_0 - \mu\mu_0 HH - \frac{1}{2} (\epsilon\epsilon_0 E^2 - \mu\mu_0 H^2) \delta \right], \quad (6.3)$$

temos que δ é uma função delta de Kronecker. Dessa forma, fazendo a média do período de oscilação temos o momento igual zero e aplicando a lei de integração de Gauss, a força da média assume

$$\langle F \rangle = \int_V \nabla \cdot T dV = \int_{\delta V} \langle T(r, t) \rangle \cdot n(r) da, \quad (6.4)$$

tal que δV é a superfície de V , $n(r)$ é o elemento unitário perpendicular à superfície, e da é um elemento de superfície. Fazendo uso do tensor de stress de Maxwell nesta equação e aplicando em partículas rígidas, temos que a pressão de radiação, P , é então obtida através da integração do tensor de stress de Maxwell para uma superfície plana infinita A , perpendicular à direção do vetor Poynting z :

$$Pn_z = \frac{1}{A} \int_A \langle T(r, t) \rangle \cdot n_z da \quad (6.5)$$

Agora assumimos uma onda plana incidente ($I_0 = \frac{1}{2} c \epsilon_0 E_0^2$), que interage com uma partícula de coeficiente de reflexão complexo R , o campo elétrico $E(r, t)$ fora da partícula pode ser descrito por uma superposição de duas ondas, tal que

$$E(r, t) = E_0 Re \left[\left(e^{ikz} + R e^{-ikz} \right) e^{i\omega t} \right] n_x. \quad (6.6)$$

Fazendo uso das equações de Maxwell para o campo magnético

$$H(r, t) = \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} E_0 Re \left[\left(e^{ikz} - R e^{-ikz} \right) e^{i\omega t} \right] n_y \quad (6.7)$$

temos que o tensor de stress de Maxwell se reduz para

$$\langle T(r, t) \rangle \cdot n_z = -\frac{1}{2} \langle \epsilon_0 E^2 + \mu_0 H^2 \rangle n_z = \frac{\epsilon_0}{2} E^2 [1 + |R|^2] n_z, \quad (6.8)$$

maiores detalhes dessa dedução podem ser encontradas na Referência [32].

Por fim, temos a Pressão de Radiação sobre a partícula pode ser definida como

$$P = \frac{I_0}{c} [1 + |R|^2]. \quad (6.9)$$

Agora para a Força de Gradiente, consideramos a resposta dielétrica de um feixe de luz

incidente sob uma partícula, devido à polarização dos átomos ou íons que a constitui, essas condições permitem o surgimento do momento de dipolo induzido devido a intensidade do campo elétrico E

$$p = \alpha E, \quad (6.10)$$

tal que $\alpha = \alpha' + i\alpha''$ é a polarização complexa relativa a partícula no meio ao qual ela está inserida. Temos que a interação do dipolo induzido com o campo elétrico da luz, cria um potencial eletrostático que pode ser definido por

$$U = -p \cdot E. \quad (6.11)$$

Dessa forma, para um campo de luz com intensidade de variação espacial, existe uma força de gradiente que é dada por

$$F_{grad} = -\nabla U = -p \cdot \nabla E = -\alpha(E \cdot \nabla)E, \quad (6.12)$$

seja então, para uma pequena partícula de raio r_p , temos

$$F_{grad} = -\nabla U = -p \cdot \nabla E = -\alpha(E \cdot \nabla)E. \quad (6.13)$$

Deste modo, temos que a força do gradiente resultante é linearmente dependente da variação espacial da intensidade do campo de luz e também da diferença dielétrica da partícula aprisionada em relação ao meio, que pode ser descrita pela relação Clausius-Mossotti. Temos então, para partículas com um índice de refração superior ao meio, a força do gradiente aponta na direção da região de maior intensidade, isto é, da região focal para um feixe de difração limitado em pinças ópticas. Por outro lado, as partículas que possuem um índice de refração mais baixo que o meio, podem ser aprisionadas no mínimo na intensidade do campo de luz. O valor da força de gradiente de restauração em um aprisionamento óptica de raio r , pode ser caracterizada por uma mola Hookeana de constante de rigidez k , tal que a força é linearmente proporcional para pequenos deslocamentos ($d < r/2$).

Esse esquema já foi apresentado anteriormente na Figura 2.2, que descrevem como se comporta uma microesfera sob ação da pressão de radiação e pelas Figuras 2.3 para a força de gradiente.

Apêndice B - Calibração da pinça óptica

Tal como abordado na seção anterior (2.1), é de extrema importância o conhecimento sobre a intensidade da força aplicada pela pinça óptica. A constante de força k é quem define o quão forte é o regime de forças aplicadas pela pinça óptica. Assim sendo, é necessário realizar antes de tudo uma calibração para garantir uma boa análise dos dados obtidos.

Para realizar a calibração da pinça óptica utilizamos o método de Stokes, tal que devido a movimentação do sistema com uma velocidade $\vec{v}$ surge uma região de ação de fluxo laminar e então uma força de arraste agindo sobre a microesfera. Devemos medir a nova posição de equilíbrio da microesfera quando as intensidade das forças forem iguais.

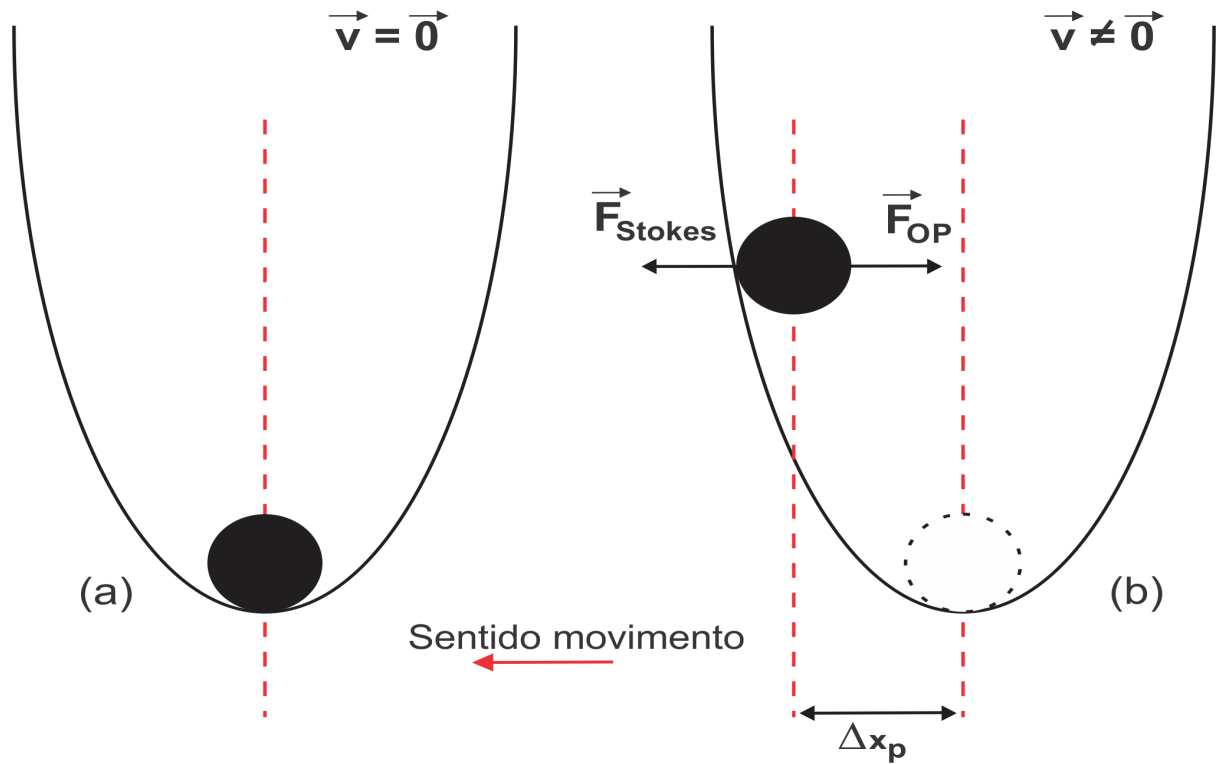


Figura 6.1: (a) Microesfera aprisionada na posição de equilíbrio imersa no poço de potencial criado pela pinça óptica. (b) Situação em que a microesfera é colocada em movimento, logo sofre ação do fluido e tende a alcançar uma nova posição de equilíbrio dentro do poço de potencial. Deste modo, na nova posição de equilíbrio, a força de Stokes, $\vec{F}_{Stokes}$ é igual em módulo, à força óptica, $\vec{F}_{OP}$ aplicada.

Pela Figura (6.1) observa-se que a microesfera está em uma região que caracterizamos como um poço com potencial aproximadamente harmônico, que pode ser descrito por $\frac{1}{2}kx^2$. Logo temos para (6.1) (a), que mostra a microesfera em uma situação de repouso no fundo do poço de potencial, ou seja, em estado de equilíbrio. Do mesmo modo, para Figura (6.1) (b), temos a situação em que a lamínula realiza um movimento com velocidade constante $\vec{v} \neq 0$, assim movimentando o fluido. O movimento do fluido origina uma força de atrito, Força de Stokes, que direciona a nova posição de equilíbrio dentro do poço de potencial para a microesfera. Na nova posição de equilíbrio a força de

Stokes é igual, em módulo, à força óptica aplicada pela pinça óptica.

Temos para o módulo da força de Stokes

$$\vec{F}_{Stokes} = -\gamma\vec{v} \quad (6.14)$$

sendo $\vec{v}$ é a velocidade do fluxo e γ é o coeficiente de atrito viscoso sobre a microesfera em solução aquosa, que pode ser expresso por

$$\gamma = 6\pi\eta_a a \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 \right]^{-1}, \quad (6.15)$$

sendo a o raio da microesfera ($a = 3\mu\text{m}$), h a altura do centro de massa da microesfera em relação à lamínula e η_a a viscosidade da solução na qual as microesferas estão imersas dada como função da temperatura conforme [24],

$$\eta_a = 10^{-3} \left[0,26 + 1,51 \exp \left(\frac{-t_c}{29} \right) \right], \quad (6.16)$$

sendo t_c a temperatura dada em graus Celsius e η_a em unidades SI.

Em pouco tempo, a microesfera atinge uma nova posição de equilíbrio como mostra Figura (6.1)(b), em módulo, $F_{OP} = F_{Stock}$ assim sendo

$$k\Delta x_p = \gamma v. \quad (6.17)$$

Logo,

$$K = \frac{\gamma v}{\Delta x_p}. \quad (6.18)$$

Assim sendo, conhecendo a temperatura e utilizando a equação (6.16), obtém-se a viscosidade. O raio é determinado pelo fabricante, a altura h é obtida movimentando o foco do microscópio e ajustando até a altura h desejada. Finalmente, o valor de Δx_p , será uma média dos valores obtido por repetições do procedimento de análise descrito abaixo, sob diferentes velocidades e fazendo uso de microesferas aleatórias.

(i) A captura das imagens do experimento serão realizadas com auxílio do software *Stream Pix*, sendo repetidas para diferentes microesferas sob diferentes velocidades.

(ii) Inicialmente, usa-se uma solução de tampão aquosa PBS (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) com microesferas.

(iii) Logo depois, inicia o vídeo com uma microesfera aprisionada dentro do poço de potencial da pinça óptica, com a intenção de encontrar a posição do centro de massa da microesfera, como mostra Figura 6.1(a).

(iv) Em seguida, após ~ 5 segundos, inicia o movimento do deslocador piezo elétrico que

desloca a lamínula com velocidade fixa controlada pelo computador a fim de que a microesfera atinja uma nova posição de equilíbrio, como mostra Figura 6.1(b).

(v) Finalmente, utilizando o software *ImageJ*, conseguimos delimitar os valores para o centroide da microesfera como função temporal, e assim determinar os valores de deslocamento Δx_p . Lembramos que esse procedimento é repetido para valores distintos de velocidade e distintas microesferas.

Desta maneira, determina-se Δx e v , que aplicados na equação 6.18 fornecem a constante para força da pinça óptica.

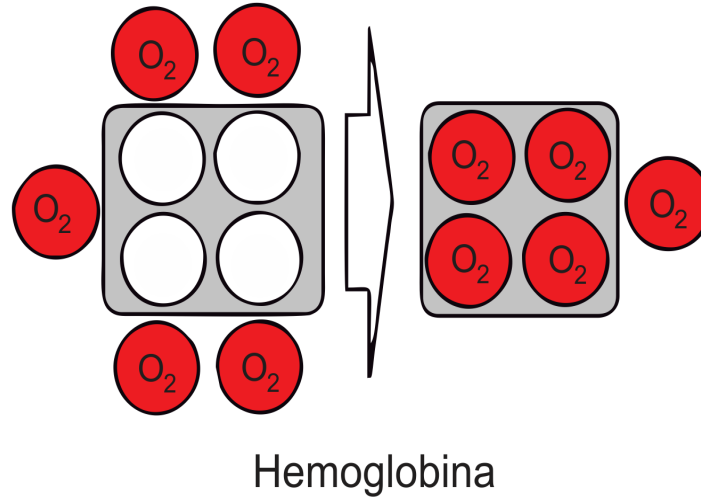


Figura 6.2: Ligações simultâneas de moléculas de Oxigênio à Hemoglobina.

Apêndice C - Modelo de Hill

Archibald Vivian Hill, no século XIX, propôs um modelo no qual poderia explicar as curva de associação para o oxigênio transportado pelas hemoglobinas. Essas são unidades presente nas células vermelhas do sangue, isto é, as hemácias (ou eritrócitos), com função de transportar o oxigênio (principalmente) e o gás carbônico (CO_2) (em menor quantidade) aos tecidos.

Sabe-se que a hemoglobina, é composta de quatro subunidades proteicas, tais que, cada uma delas é capaz de se ligar a uma molécula de oxigênio usando um átomo de ferro. Hill propôs um modelo de associação no qual expressava a quantidade de proteínas ligadas as moléculas de oxigênio como função da quantidade de oxigênio existente. Seus dados apresentaram uma curva do tipo sigmoidal, diferente da encontrada pelo modelo de Scatchard[124], segundo o qual considera a existência de um único modo de ligação e esse seria independente do número de moléculas de oxigênio já ligadas a hemoglobina.

A atividade da hemoglobina pode ser descrita pela reação química



sendo o $H_B(O_2)_n$ o produto da reação, n a número de Hill que também representa o número máximo de moléculas de oxigênio (no caso, quatro) que podem se ligar a molécula de hemoglobina. Temos ainda, a constante química aparente de associação K_A

$$K_A = \frac{[H_B(O_2)_n]}{[H_B][O_2]^n}. \quad (6.20)$$

Segundo o proposto por Hill, o processo de ligações deve ser encarado como uma série de ligações simultânea das moléculas de oxigênio à molécula de hemoglobina, ou seja, deve-se considerar o sistema com apenas dois estados: $r = 0$ e $r = r_{max}$ (saturado), como e mostrado na

Figura 6.2. Seja ainda, K_A representando a interação de n moléculas de oxigênio com uma única molécula de hemoglobina e a constante intrínseca (individual) K_i representando a interação de uma única molécula de oxigênio com um único sitio de ligação, temos então que as quatro constantes intrínsecas devem iguais numa primeira aproximação, logo, $K_1 = K_2 = K_3 = K_4 = K_i$ e, portanto, a constante aparente de associação é dada por

$$K_A = K_i^n. \quad (6.21)$$

Reescrevendo a constante aparente de associação, K_A , com base nas ideias de Hill aplicado complexo DNA-fármaco, em termos de concentrações, temos

$$K_A = \frac{C_b}{(C_{bp} - C_b)C_f^n}, \quad (6.22)$$

tal que C_b é a concentração de sítios ligados, C_{bp} a concentração de pares de base do polímero, C_f a concentração de ligante livre em solução e $C_{bp} - C_b$ o número de sítios livres da molécula de DNA onde o ligante pode se ligar. Seja ainda, $r = \frac{C_b}{C_{bp}}$ e $K_A = K_i^n$, a isoterma de ligação de Hill pode ser escrita em termos de sítios ligados

$$r = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}. \quad (6.23)$$

Para ligantes que ocupam mais um par de bases na estrutura do polímero, é possível acrescentar o parâmetro r_{max} para saturação máxima de r , logo

$$r = \frac{r_{max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (6.24)$$

Com base na equação 6.24, admitindo valores fixos de K_i e r_{max} , quanto maior for o coeficiente n de Hill, vai ocorrer no sistema a saturação em uma concentração de ligante livre em solução cada vez menor. Dessa forma, quanto maior for o coeficiente n de Hill, maior a afinidade química entre os ligantes e a molécula de DNA. Esse efeito na afinidade química é denominado cooperatividade. A ligação de uma molécula a estrutura do DNA aumenta a probabilidade de uma segunda molécula ligar e assim sucessivamente, até ocupar todos os sítios de ligações possíveis da cadeia polimérica. Este efeito depende diretamente de dois parâmetros físico-químicos específicos, K_A e n :

a) Se $n > 1$, K_A aumenta com o coeficiente n de Hill, isto é, a primeira molécula que se liga ao DNA, aumenta a probabilidade ou a afinidade química de ligação da seguinte, o chamado cooperatividade positiva.

b) Se $n < 1$, K_A diminui com coeficiente n de Hill, isto é, a primeira molécula que se liga ao DNA, reduz a probabilidade ou dificulta a afinidade química de ligação da seguinte, o chamado cooperatividade negativa.

c) Se $n = 1$, a primeira molécula que se liga ao DNA, não interfere com a ligação da molécula seguinte, isto é, a ligação é do tipo não cooperativo e retoma o modelo de Scatchard mencionado anteriormente..

7 Artigos Publicados

Neste capítulo apresentamos os artigos publicados durante o período do doutorado do autor desta tese, sob orientação do professor Márcio Santos Rocha: (fevereiro de 2015 a fevereiro de 2019).

- 1 - **Título:** “Force spectroscopy unravels the role of ionic strength on DNA-cisplatin interaction: Modulating the binding parameters”

Revista: *PHYSICAL REVIEW E*;

Autores: L. Oliveira; M. S. Rocha.

Disponível online desde: 11 de setembro de 2017;

Doi: <https://0.1103/PhysRevE.96.032408>

- 2 - **Título:** “Carboplatin as an alternative to Cisplatin in chemotherapies: new insights at single molecule level.”

Revista: *BIOPHYSICAL CHEMISTRY*;

Autores: L. Oliveira; J. M. Caquito Jr, M. S. Rocha.

Disponível online desde: 21 de julho de 2018;

Doi: <https://0.1103/PhysRevE.96.032408>

- 3- **Título:** “Optical Trapping and Manipulation of Superparamagnetic Beads Using Annular-Shaped Beams”

Revista: *Methods and Protocols: Optical Tweezers*;

Autores: L. Oliveira, W. H. Campos, and M. S. Rocha.

Disponível online desde: 20 de novembro de 2018;

Doi: <https://10.3390/mps1040044>

8 Artigos Submetidos

- 1- **Título:** “Oxaliplatin and its precursor drugs applied to chemotherapies: studies at single molecule level”

Revista: *Integrative Biology*;

Autores: L. Oliveira; J. M. Caquito Jr, M. S. Rocha.

Submetido em: 14 de setembro de 2018.

- 1- **Título:** “On the effects of Caffeine on the DNA structure and conformation: a force spectroscopy study”

Revista: *International Journal of Biological Macromolecules*;

Autores: T. A. Moura; L. Oliveira; M. S. Rocha.

Submetido em: 28 de janeiro de 2019.

Force spectroscopy unravels the role of ionic strength on DNA-cisplatin interaction: Modulating the binding parameters

L. Oliveira and M. S. Rocha*

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

(Received 21 May 2017; revised manuscript received 24 July 2017; published 11 September 2017)

In the present work we have gone a step forward in the understanding of the DNA-cisplatin interaction, investigating the role of the ionic strength on the complexes formation. To achieve this task, we use optical tweezers to perform force spectroscopy on the DNA-cisplatin complexes, determining their mechanical parameters as a function of the drug concentration in the sample for three different buffers. From such measurements, we determine the binding parameters and study their behavior as a function of the ionic strength. The equilibrium binding constant decreases with the counterion concentration ($[Na]$) and can be used to estimate the effective net charge of cisplatin in solution. The cooperativity degree of the binding reaction, on the other hand, increases with the ionic strength, as a result of the different conformational changes induced by the drug on the double-helix when binding under different buffer conditions. Such results can be used to modulate the drug binding to DNA, by appropriately setting the ionic strength of the surrounding buffer. The conclusions drawn provide significant new insights on the complex cooperative interactions between the DNA molecule and the class of platinum-based compounds, much used in chemotherapies.

DOI: [10.1103/PhysRevE.96.032408](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.96.032408)

I. INTRODUCTION

Cisplatin [*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)] is one of the most important chemotherapeutic drugs, being used in the treatment of testicular, ovarian, breast, bladder, cervical, lung, head, and neck cancers, as well as in neuroblastomas and in some brain tumors [1]. Along the past years, researchers have investigated the molecular mechanism of action of cisplatin, and in particular its interaction with the DNA molecule, which is the main drug target inside cells [2–14]. Figure 1 shows the chemical structure of the cisplatin molecule. In aqueous solutions, the two chloride ions dissociate and the compound incorporates two water molecules, reaching its bivalent ($2+$) active state, which binds to DNA [3].

The active state of cisplatin binds covalently to the DNA double-helix forming different types of adducts, which include intrastrand and interstrand crosslinks, functional monoadducts, and DNA-protein crosslinks [3]. Such adducts induce strong structural perturbations on the conformation of the double-helix, especially sharp bends and unwinding [4,15], and sometimes local strand breaks [16,17]. These structural perturbations affect significantly the mechanical properties of the DNA molecule, such that the DNA-cisplatin interaction can be monitored by measuring the changes of such properties as the drug binds to the double-helix [18].

Despite the number of studies concerning the DNA-cisplatin complexes, none has focused on the effects of the ionic strength on the binding parameters. We will show here that such aspect is fundamental for a complete and deeper understanding of the present interaction, studying the DNA-cisplatin binding at single molecule level for different ionic strengths. First, we measure the mechanical properties of the DNA-cisplatin complexes as a function of the ionic strength of the surrounding buffer, using optical tweezers to perform single molecule force spectroscopy. Then, the physical chem-

istry of the DNA-cisplatin interaction was determined [18] at each buffer condition from such measurements. Finally, the behavior of the physicochemical (binding) parameters as a function of the buffer ionic strength was analyzed and discussed.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Sample preparation

The samples here consist of λ -DNA molecules (New England Biolabs) end-labeled with biotin in a phosphate-buffered saline (PBS) solution. One end of the DNA molecules is attached to a microscope coverslip surface, which is coated with streptavidin, while the other end is attached to a streptavidin-coated polystyrene bead with a diameter of $3\ \mu\text{m}$ (Bangs Labs). The measurements were performed under three different ionic strengths, using PBS solutions with different compositions that are detailed in Table I.

B. Experimental procedure

The optical tweezers setup used in this work consists of a 1064-nm solid-state laser (Altechna) operating in the TEM₀₀ mode, mounted on a Nikon Ti-U inverted microscope with a $100\times$ NA 1.4 objective. The tweezers is previously calibrated before the experiments, by using the Stokes force calibration. The apparatus is then used to trap the polystyrene bead attached to a DNA molecule. By moving the microscope stage using a piezoelectric actuator (Newport Corp.), we stretch the DNA while monitoring the changes of the bead position in the tweezers' potential well, using videomicroscopy. To guarantee that the chemical equilibrium of the DNA-cisplatin complexes formed will not be much disturbed by the mechanical manipulation imposed, we limit the maximum stretching forces to ~ 2 pN, working only within the entropic regime. The Marko-Siggia wormlike chain (WLC) [19] formula for the entropic force was used to fit the experimental data and to extract the two basic mechanical parameters of the

*marcios.rocha@ufv.br



Research Article

Carboplatin as an alternative to Cisplatin in chemotherapies: New insights at single molecule level

L. Oliveira, J.M. Caquito Jr, M.S. Rocha*

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



ARTICLE INFO

Keywords:

Carboplatin

Cisplatin

Single molecule force spectroscopy

DNA cancer chemotherapy

ABSTRACT

Here we report a new study performed at single molecule level on the interaction of the antineoplastic drug Carboplatin and the DNA molecule - the main target of the drug inside cells in cancer chemotherapies. By using optical tweezers, we measure how the mechanical properties of the DNA-Carboplatin complexes changes as a function of the drug concentration in the sample, for two different ionic strengths ($[Na] = 150$ mM and $[Na] = 1$ mM). From these measurements, the binding mechanism and the physicochemical (binding) parameters of the interaction were inferred and directly compared to those obtained for the precursor drug Cisplatin under equivalent conditions. As the main conclusion, we show that Carboplatin binds preferentially forming covalent monoadducts in contrast to Cisplatin, which is hydrolyzed easier and presents a higher efficiency in forming covalent diadducts along the double-helix. In addition, we explicitly show that Carboplatin is much less sensitive to ionic strength changes when compared to Cisplatin. These findings provide new insights on the interactions of platinum-based compounds with the DNA molecule, being important to improve the current treatments and in the development of new antineoplastic agents.

1. Introduction

Since the end of the 1970s, Platinum-derived drugs have been used in chemotherapeutic treatments against cancers of testicle, ovary, esophagus, lung, head, neck, and other organs. The first generation of these drugs started with Cisplatin (*cis-diammine-dichloroplatinum (II)*), which is still the compound most commonly used in chemotherapeutic treatments. Nevertheless, its use has been accompanied by a number of undesirable side effects (e.g., nephrotoxicity and ototoxicity), and by the development of drug resistance. Based on these limitations, new Platinum complexes have been developed, such as Carboplatin (*cis-diammine (cyclobutane-1,1-dicarboxylate-O, O') platinum (II)*) [1], which is a second generation platinum-based compound that exhibits an antineoplastic activity similar to Cisplatin, also presenting a similar mechanism for adduct formation upon binding to the double-helix [2]. Carboplatin also exhibits a preference for binding to guanine N7 and adenine N7, however, there are reports of a considerable affinity for cytosine, as well as conformational changes between A- and B-DNA [2].

Carboplatin has been used specifically in many cancer treatments, such as ovary [3–5], lung [6], and some specific types of head tumors [7], despite being less efficient than Cisplatin in certain specific cases [8–12]. There is an increasing interest of the scientific community in

investigating the molecular mechanism of Carboplatin action [13–16], in particularly in the study of its interaction with the DNA molecule, in order to guide the development of more efficient compounds. Fig. 1, shows the chemical structure of the Carboplatin molecule, which is a divalent cationic drug when fully hydrolyzed in solution, becoming identical to the active (hydrolyzed) form of Cisplatin, also shown in the figure for comparison purposes.

Some studies have already investigate the DNA-Carboplatin interaction [17–23], but none have investigated the complexes formation at single molecule level, nor have studied the role of the ionic strength of the surrounding buffer solution on the formation of such complexes. Here we address these important points by using single molecule force spectroscopy to measure the mechanical properties of the DNA-Carboplatin complexes as a function of the drug concentration for different ionic strengths. Based on the results obtained, the physicochemical (binding) parameters of the DNA-Carboplatin interaction were determined [24, 25] for different ionic strengths, giving new insights and useful quantitative information about such system. Finally, the results obtained were compared to those found for the precursor compound Cisplatin, giving new insights on the usage of Carboplatin as a substitute of Cisplatin in cancer chemotherapies.

* Corresponding author.

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

Benchmark

Optical Trapping and Manipulation of Superparamagnetic Beads Using Annular-Shaped Beams

Leandro Oliveira , Warley H. Campos  and Marcio S. Rocha * 

Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, Brazil; leandro.o.oliveira@ufv.br (L.O.); warley.campos@ufv.br (W.H.C.)

* Correspondence: marcios.rocha@ufv.br; Tel.: +55-31-3899-3399

Received: 9 October 2018; Accepted: 14 November 2018; Published: 20 November 2018



Abstract: We propose an optical tweezers setup based on an annular-shaped laser beam that is efficient to trap 2.8 μm -diameter superparamagnetic particles. The optical trapping of such particles was fully characterized, and a direct absolute comparison with a geometrical optics model was performed. With this comparison, we were able to show that light absorption by the superparamagnetic particles is negligible for our annular beam tweezers, differing from the case of conventional Gaussian beam tweezers, in which laser absorption by the beads makes stable trapping difficult. In addition, the trap stiffness of the annular beam tweezers increases with the laser power and with the bead distance from the coverslip surface. While this first result is expected and similar to that achieved for conventional Gaussian tweezers, which use ordinary dielectric beads, the second result is quite surprising and different from the ordinary case, suggesting that spherical aberration is much less important in our annular beam geometry. The results obtained here provide new insights into the development of hybrid optomagnetic tweezers, which can apply simultaneously optical and magnetic forces on the same particles.

Keywords: optical tweezers; optical trapping; superparamagnetic particles; trap stiffness; annular beam

1. Introduction

The optical and magnetic manipulation of microparticles has become in the past few years indispensable tools in biophysics and soft matter research [1–4]. In fact, fields such as single-molecule biophysics [5,6], cell biology [7,8] and colloidal science [9] have experienced considerable advances with the advent of the tweezers techniques, namely the optical and magnetic tweezers. These techniques allow one to apply forces and torques on the particles of interest, which are usually attached to the systems that one intends to manipulate, stretch and/or rotate.

Each of these techniques has its own specific advantages. Optical tweezers, for instance, allow direct local force application with high spatial and temporal resolutions [3,10]. Magnetic tweezers, on the other hand, can be conveniently used as a force clamp and to apply torque on the systems of interest [10–12]. An apparatus that allows one to explore the best features of the two tweezers techniques would therefore be of great interest.

Here, we propose and characterize an optical tweezers setup based on an annular-shaped laser beam that is efficient to trap 2.8 μm -diameter superparamagnetic particles, thus allowing the development of a hybrid instrument—optomagnetic tweezers—which allows one to apply simultaneously optical and magnetic forces on the same particles. The idea is to trap the superparamagnetic particles optically, which can be naturally manipulated with permanent or electromagnets. These particles usually are more difficult to trap stably by single Gaussian beam

Cite this: DOI: 10.1039/xxxxxxxxxx

Oxaliplatin and its precursor drugs applied to chemotherapies: studies at single molecule level

L. Oliveira,^{*a} J. M. Caquito Jr,^a and M. S. Rocha^aReceived Date
Accepted Date

DOI: 10.1039/xxxxxxxxxx

www.rsc.org/journalname

We present a new study performed at single molecule level on the interaction of the antineoplastic drug Oxaliplatin with the DNA molecule - the main target of the drug inside cancer cells. Using optical tweezers, we measured how the mechanical properties of DNA-Oxaliplatin complexes vary as a function of drug concentration in the sample, for two different ionic strengths ($[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ and $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$). From these data, we determine the binding mechanism and the physicochemical (binding) parameters of the interaction, which are critically compared to those obtained for the precursor drugs Cisplatin and Carboplatin under similar conditions. In addition, kinetic information on covalent diadduct formation and on DNA compaction by Oxaliplatin were also obtained and critically compared to the similar results of the precursor drugs. These findings provide new insights on the interactions of platinum-based compounds with the DNA molecule, being important to improve current chemotherapeutic treatments and to the development of novel antineoplastic agents.

1 INTRODUCTION

Platinum-based compounds have been investigated since the end of the 60s¹, when their cytotoxicity against bacterial cells were noted. The first generation of drugs, still commonly used in chemotherapeutic treatments, started with Cisplatin (*cis*-diammine-dichloroplatinum(II), $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$) in the late 70s². Nevertheless, its structure has been known since 1845 under the name of Peyrone's chloride³, a planar compound that admits the active form $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})^{2+}$ after hydrolysis, as shown in Fig. 1a. It is currently used in the treatment of head, cervical, ovarian, neck, lung and testes cancers^{1,4,5}. However, its use entails several side effects (e.g., nephrotoxicity and ototoxicity), leading to practical limitations in its applicability *in vivo*. Thus, the essence of antitumor activity of Cisplatin collides with the limitation imposed by the side effects caused by the drug. This fact supported the motivation to develop new platinum-based compounds that present lower side effects.

Subsequently Carboplatin (*cis*-diammine-1,1-cyclobutanedicarboxylatoplatinum(II), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$) appeared, a planar compound which assumes an active form equal to that of Cisplatin after hydrolysis^{2,6,7} and is considered to be a second generation platinum drug. The structure of Carboplatin and its active form are represented in Figure 1b. It has been used for the treatment of ovarian^{8–10}, lung¹¹ and some specific types of head and neck tumors¹², presenting an antineoplastic activity similar

to that of Cisplatin, but with less nephrotoxicity. Carboplatin exhibits a binding mechanism to DNA very similar to Cisplatin¹³, although with a much slower kinetics^{7,14}.

In the sequence came Oxaliplatin ((1*R*,2*R*)-diamino-cyclohexaneoxalatoplatinum(II), $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$), considered a 3rd generation platinum-based drug. It also has a planar shape, and the following active form after hydrolysis: $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}^{+2}$, as shown in Fig. 1c. The drug has become in the past years another option for chemotherapeutic treatments of colorectal^{15,16}, esophagus^{17,18}, stomach^{19,20} and many other tumor cell lines^{21–24}. Oxaliplatin had its clinical use approved in the late 80s and shows a higher activity against some specific tumors previously resistant to Carboplatin and Cisplatin²⁵, while presenting almost negligible nephrotoxicity^{23,26–28}.

The binding of the active platinum-based compounds to DNA occurs in the form of covalent adducts with (but not exclusively) the bases of the DNA molecule. There is a preference for Cisplatin, as well as for Carboplatin and Oxaliplatin^{13,29}, for binding to guanine N7 position along the double-helix. Nevertheless, for Carboplatin there are also reports of a considerable affinity for cytosine. Each drug molecule can form one (monoadduct) or two (diadduct) covalent bonds. Diadduct formation induces the so-called crosslinks between different base-pairs²⁵. These crosslinks act by blocking DNA replication and transcription, and ultimately cell division^{30–32}. Conformational changes between A- and B-DNA were also suggested both for Carboplatin¹³ and Oxaliplatin²⁹ upon interaction.

During the last years, Oxaliplatin has stimulated the interest

^a Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brazil; E-mail: l3andro.oliveira@gmail.com

On the effects of Caffeine on the DNA structure and conformation: a force spectroscopy study.

T. A. Moura

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

L. Oliveira

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

M. S. Rocha

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

Abstract

Here we use single molecule force spectroscopy performed with optical tweezers in order to investigate the interaction between Caffeine and the DNA molecule for various different concentrations of the alkaloid and under two distinct ionic strengths of the surrounding buffer. We were able to determine the mechanical changes induced on the double-helix structure due to Caffeine binding, the binding mode and the binding parameters of the interaction. The results obtained show that Caffeine binds to DNA by outside the double-helix with a higher affinity at lower ionic strengths. On the other hand, a considerable cooperativity was found only for sufficient high ionic strengths, suggesting that Caffeine may binding forming dimers and/or trimers along the double-helix under this condition. Finally, it was also shown that Caffeine stabilizes the DNA double-helix upon binding, preventing force-induced DNA melting.

Keywords: Caffeine, DNA, single molecule force spectroscopy, optical tweezers

Email address: `marcios.rocha@ufv.br` (M. S. Rocha)

Preprint submitted to IJBM

January 28, 2019

9 REFERÊNCIAS

Bibliografia

- [1] Steven A. Wasserman Peter V. Minorsky Jane B. Reece Lisa A. Urry, Michael L. Cain. *Campbell Biology*, volume 11. Person, 2016.
- [2] FAP Crisafuli, EC Cesconetto, EB Ramos, and MS Rocha. Dna-cisplatin binding mechanism peculiarities studied with single molecule stretching experiments. *Applied Physics Letters*, 100(8):083701, 2012.
- [3] Arthur Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, 24(4):156, 1970.
- [4] The Nobel Prize. Acessado em 5 de Outubro, 2018. <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes-in-physics/>.
- [5] JM Ashkin, Arthur & Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795):1517–1520, 1987.
- [6] Arthur Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical journal*, 61(2):569, 1992.
- [7] Francis HC Watson, James D & Crick et al. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953.
- [8] Francis HC Watson, James D & Crick. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *JAMA*, 269(15):1967–1969, 1953.
- [9] David G Grier. A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424(6950):810–816, 2003.
- [10] Felix Ritort. Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(32):R531, 2006.
- [11] Xi-Miao Hou, Xing-Hua Zhang, Kong-Ji Wei, Chao Ji, Shuo-Xing Dou, Wei-Chi Wang, Ming Li, and Peng-Ye Wang. Cisplatin induces loop structures and condensation of single dna molecules. *Nucleic acids research*, 37(5):1400–1410, 2009.
- [12] Bernhard Lippert. From cisplatin to artificial nucleasesâthe role of metal ion-nucleic acid interactions in biology. *Biometals*, 5(4):195–208, 1992.
- [13] K Hatch, Claudia Danilowicz, V Coljee, and Mara Prentiss. Measurement of the salt-dependent stabilization of partially open dna by escherichia coli ssb protein. *Nucleic acids research*, 36(1):294–299, 2008.
- [14] Barnett Rosenberg, Loretta Vancamp, JAMES E TROSKO, and VIRGINIA H MANSOUR. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222(5191):385, 1969.
- [15] Peter J O'Dwyer, James P Stevenson, and Steven W Johnson. Clinical status of cisplatin, carboplatin, and other platinum-based antitumor drugs. *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, pages 29–69, 1999.
- [16] Angelika Küng, Andrea Zenker, Markus Galanski, and Bernhard K Keppler. Capillary electrophoretic study of carboplatin and analogues with nucleoside monophosphates, di-and trinucleotides. *Journal of inorganic biochemistry*, 83(2-3):181–186, 2001.
- [17] AH Calvert, DR Newell, LA Gumbrell, S O'Reilly, M Burnell, FE Boxall, ZH Siddik, IR Judson, ME Gore, and E Wiltshaw. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *Journal of Clinical Oncology*, 7(11):1748–1756, 1989.
- [18] N Lokich, J & Anderson. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Annals of oncology*, 9(1):13–21, 1998.
- [19] Angelika Küng, Dirk B Strickmann, Markus Galanski, and Bernhard K Keppler. Comparison of the binding behavior of oxaliplatin, cisplatin and analogues to 5'-gmp in the presence of sulfur-containing molecules by means of capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. *Journal of inorganic biochemistry*, 86(4):691–698, 2001.
- [20] TA Connors, M Jones, WCJ Ross, P D. Braddock, AR Khokhar, and ML Tobe. New platinum complexes with anti-tumour activity. *Chemico-biological interactions*, 5(6):415–424, 1972.
- [21] Joseph H Burchenal, Kathleen Kalaher, Kimberly Dew, Linda Lokys, and Glen Gale. Studies of cross-resistance, synergistic combinations and blocking of activity of platinum derivatives. *Biochimie*, 60(9):961–965, 1978.

- [22] Eric D Marko, John F Siggia. Stretching dna. *Macromolecules*, 28(26):8759–8770, 1995.
- [23] M. S. Rocha. *Pinças ópticas: experimento e teoria*. PhD thesis, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2004.
- [24] M. S. Rocha. *Pinças Ópticas: Experimento, Teoria e Aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*. PhD thesis, Tese de Doutorado, UFMG, 2008.
- [25] M. S. Rocha. Optical tweezers for undergraduates: theoretical analysis and experiments. *American Journal of Physics*, 77(8):704–712, 2009.
- [26] Reece P. & Gu M. Dholakia K. Optical micromanipulation. *Chem. Soc. Rev.*, 37:43–55, 2007.
- [27] Christine H Kappel, Kalli & Lind. Trapping polystyrene beads with optical tweezers. *Physics*, 173, 2014.
- [28] Jonas Enger, Mattias Goksör, Kerstin Ramser, Petter Hagberg, and Dag Hanstorp. Optical tweezers applied to a microfluidic system. *Lab on a Chip*, 4(3):196–200, 2004.
- [29] Warley Hudson Campos, Jakson M Fonseca, Vagner E de Carvalho, Joaquim BS Mendes, Marcio S Rocha, and Winder A Moura-Melo. Topological insulator particles as optically induced oscillators: Toward dynamical force measurements and optical rheology. *ACS Photonics*, 5(3):741–745, 2018.
- [30] HM Neto, PA Maia & Nussenzveig. Theory of optical tweezers. *EPL (Europhysics Letters)*, 50(5):702, 2000.
- [31] A Mazolli, PA Maia Neto, and HM Nussenzveig. Theory of trapping forces in optical tweezers. In *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, volume 459, pages 3021–3041. The Royal Society, 2003.
- [32] A. Mazolli. *Teoria das pinças ópticas: uma aplicação da teoria de espalhamento Mie*. PhD thesis, Tese de Doutorado, UFRJ, 2003.
- [33] RS Dutra, NB Viana, PA Maia Neto, and HM Nussenzveig. Absolute calibration of optical tweezers: the mds+ theory. 9922:99222N, 2016.
- [34] Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, and Angelika Amon. *Biologia celular e molecular*. Artmed Editora, 2014.
- [35] Henrique B. Ferreura e Luciane M. P. Zaha A., Schrank A. *Biologia Molecular Básica*, volume 3. 2003.
- [36] Miller J. H. D. T. Lewontin R.C. & Gelbart W. M. Griffiths, A. J. F. *Introdução a genética*, volume 7. 2002.
- [37] Anthony Bates, Andrew D & Maxwell. *DNA topology*. Oxford University Press, USA, 2005.
- [38] Aaron Klug. Rosalind franklin and the discovery of the structure of dna. *Nature*, 219(5156):808, 1968.
- [39] Alan R Peyrard, Michel & Bishop. Statistical mechanics of a nonlinear model for dna denaturation. *Physical review letters*, 62(23):2755, 1989.
- [40] Paulo Sergio Pilz Augusto, Elso Drigo Filho, and José Roberto Ruggiero. Statistical model to dna melting. *Eclética Química*, 26:77–85, 2001.
- [41] Iwao Teraoka. *Polymer Solutions - An Introduction to Physical Properties*. Wiley Interscienc, NY, 2002.
- [42] R. F. BAZONI. *Efeitos de Forças Externas nas Propriedades Mecânica de Complexos DNA-Ligantes*. PhD thesis, Tese de Doutorado, UFV, 2016.
- [43] G Kratky, O & Porod. Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 68(12):1106–1122, 1949.
- [44] Paulo Roberto Brasil de Oliveira Marques. Construção de genossensor amperométrico para diagnóstico da hepatite c baseado em monocamadas auto montadas e detecção não marcada. 2009.
- [45] M. S. Rocha. *Interações DNA-ligantes: uma introdução, notas de aula*. 2014.
- [46] R. Landick J. Gelles M. D. Wang, H. Yin and S. M. Block. Stretching dna with optical tweezers. 1997.
- [47] V. Croquette T. Strick, J.-F. Allemand and D. Bensimo. Twisting and stretching single dna molecules. 2000.
- [48] www.cancer.org. *American Cancer Society*, 2017.

- [49] Patricia M Takahara, Christin A Frederick, and Stephen J Lippard. Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex dna. *Journal of the American Chemical Society*, 118(49):12309–12321, 1996.
- [50] FAP Crisafuli, EC Cesconetto, EB Ramos, and MS Rocha. Dna-cisplatin interaction studied with single molecule stretching experiments. *Integrative Biology*, 4(5):568–574, 2012.
- [51] Xiaoting Shu, Xushen Xiong, Jinghui Song, Chuan He, and Chengqi Yi. Base-resolution analysis of cisplatin–dna adducts at the genome scale. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(46):14246–14249, 2016.
- [52] Seyed Kazem Bagherpour Doun, Sohrab Halal Khor, Dardi Qujeq, Hasan Ebrahimi Shahmabadi, Seyed Ebrahim Alavi, Fatemeh Movahedi, and Azim Akbarzadeh. Effect of sodium chloride on efficiency of cisplatin dissolved in dimethyl sulfoxide: An in vitro study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(2):242–245, 2014.
- [53] Johnson SW, O'Dwyer PJ, Stevenson JP. Clinical status of cisplatin, carboplatin, and other platinum-based antitumor drugs. *Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, 29(2):31–69, 1999.
- [54] Stephanie J Fischer, Linda M Benson, Abdul Fauq, Stephen Naylor, and Anthony J Windebank. Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 29(3):444–452, 2008.
- [55] Sigma aldrich.com. Acessado em 9 de Julho, 2018. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p4394pis.pdf.
- [56] Seth M Cohen and Stephen J Lippard. Cisplatin: from dna damage to cancer chemotherapy. 2001.
- [57] Hana Stehlikova, Kristyna & Kostrhunova, Jana Kasparkova, and Viktor Brabec. Dna bending and unwinding due to the major 1, 2-gg intrastrand cross-link formed by antitumor cis-diamminedichloroplatinum (ii) are flanking-base independent. *Nucleic acids research*, 30(13):2894–2898, 2002.
- [58] Stephen J Jamieson, Elizabeth R & Lippard. Structure, recognition, and processing of cisplatin- dna adducts. *Chemical reviews*, 99(9):2467–2498, 1999.
- [59] MG Nowosielska, Anetta & Marinus. Cisplatin induces dna double-strand break formation in escherichia coli dam mutants. *DNA repair*, 4(7):773–781, 2005.
- [60] Alan Sorenson, Christine M & Eastman. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum (ii)-induced cytotoxicity: role of g2 arrest and dna double-strand breaks. *Cancer research*, 48(16):4484–4488, 1988.
- [61] MS Rocha. Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate dna interactions with drugs and proteins in single molecule experiments. *Integrative Biology*, 7(9):967–986, 2015.
- [62] GV Shivashankar, M Feingold, O Krichevsky, and A Libchaber. Reca polymerization on double-stranded dna by using single-molecule manipulation: the role of atp hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14):7916–7921, 1999.
- [63] Jonathan B Chaires, Nanibhushan Dattagupta, and Donald M Crothers. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on the interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 21(17):3933–3940, 1982.
- [64] Peter H McGhee, James D & von Hippel. Theoretical aspects of dna-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *Journal of molecular biology*, 86(2):469–489, 1974.
- [65] Archibald Vivian Hill. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *j. physiol.*, 40:4–7, 1910.
- [66] Timothy M Mascotti, David P & Lohman. Thermodynamic extent of counterion release upon binding oligolysines to single-stranded nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(8):3142–3146, 1990.
- [67] EF Silva, RF Bazoni, EB Ramos, and MS Rocha. Dna-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities. *Biopolymers*, 107(3), 2017.
- [68] Francisca Barcelo, Jordi Martorell, Francisco Gavilanes, and Jose M Gonzalez-Ros. Equilibrium binding of daunomycin and adriamycin to calf thymus dna: temperature and ionic strength dependence of thermodynamic parameters. *Biochemical pharmacology*, 37(11):2133–2138, 1988.
- [69] Francisca Barceló, Damiana Capó, and José Portugal. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to dna. *Nucleic acids research*, 30(20):4567–4573, 2002.

- [70] WFP Bernal, EF Silva, and MS Rocha. Unraveling the physical chemistry and the mixed binding modes of complex dna ligands by single molecule stretching experiments. *RSC Advances*, 6(107):105631–105637, 2016.
- [71] LA Reis and MS Rocha. Dna interaction with dapi fluorescent dye: Force spectroscopy decouples two different binding modes. *Biopolymers*, 107(5), 2017.
- [72] M Thomas Record, Timothy M Lohman, and Pieter De Haseth. Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *Journal of molecular biology*, 107(2):145–158, 1976.
- [73] Arie Y Ben-Naim. *Cooperativity and regulation in biochemical processes*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [74] Nam-Kyung Lee, Jin-Sung Park, Albert Johner, Sergei Obukhov, Ju-Yong Hyon, Kyoung J Lee, and Seok-Cheol Hong. Investigation of the elasticity of a cisplatin-dna adduct via single-molecule measurements and bimodal modeling. *Physical Review E*, 79(4):041921, 2009.
- [75] Remus T Dame, Maarten C Noom, and Gijs JL Wuite. Bacterial chromatin organization by h-ns protein unravelled using dual dna manipulation. *Nature*, 444(7117):387–390, 2006.
- [76] L Siman, ISS Carrasco, JKL da Silva, MC de Oliveira, MS Rocha, and ON Mesquita. Quantitative assessment of the interplay between dna elasticity and cooperative binding of ligands. *Physical review letters*, 109(24):248103, 2012.
- [77] Lukáš Dvořák, Igor Popa, Pavel Štarha, and Zdeněk Trávníček. In vitro cytotoxic-active platinum (ii) complexes derived from carboplatin and involving purine derivatives. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010(22):3441–3448, 2010.
- [78] Deepak K Jangir and Ranjana Mehrotra. Raman spectroscopic evaluation of dna adducts of a platinum containing anticancer drug. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130:386–389, 2014.
- [79] Robert F Ozols, Brent C Behrens, Yechiam Ostchega, and Robert C Young. High dose cisplatin and high dose carboplatin in refractory ovarian cancer. *Cancer treatment reviews*, 12:59–65, 1985.
- [80] Kenneth Swenerton, John Jeffrey, Gavin Stuart, Michel Roy, Gary Krepart, John Carmichael, Pierre Drouin, Robert Stanimir, Gregory O’Connell, and Grant MacLean. Cisplatin-cyclophosphamide versus carboplatin-cyclophosphamide in advanced ovarian cancer: a randomized phase iii study of the national cancer institute of canada clinical trials group. *Journal of clinical oncology*, 10(5):718–726, 1992.
- [81] David S Alberts, Stephanie Green, Edward V Hannigan, Robert O’Toole, Donna Stock-Novack, Patricia Anderson, Earl A Surwit, Vinay K Malvya, William A Nahhas, and Christopher J Jolles. Improved therapeutic index of carboplatin plus cyclophosphamide versus cisplatin plus cyclophosphamide: final report by the southwest oncology group of a phase iii randomized trial in stages iii and iv ovarian cancer. *Journal of clinical oncology*, 10(5):706–717, 1992.
- [82] ME Gore, I Fryatt, E Wiltshaw, and T Dawson. Treatment of relapsed carcinoma of the ovary with cisplatin or carboplatin following initial treatment with these compounds. *Gynecologic oncology*, 36(2):207–211, 1990.
- [83] Corey J Langer, John C Leighton, Robert L Comis, Peter J O’Dwyer, Cecilia A McAleer, Colleen A Bonjo, Paul F Engstrom, Samuel Litwin, and Robert F Ozols. Paclitaxel and carboplatin in combination in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a phase ii toxicity, response, and survival analysis. *Journal of clinical oncology*, 13(8):1860–1870, 1995.
- [84] Muhyi Al-Sarraf, Barbara Metch, Julie Kish, John Ensley, John J Rinehart, David E Schuller, and Jr CA Coltman. Platinum analogs in recurrent and advanced head and neck cancer: a southwest oncology group and wayne state university study. *Cancer treatment reports*, 71(7-8):723–726, 1987.
- [85] Dean F Bajorin, Michael F Sarosdy, David G Pfister, Madhu Mazumdar, Robert J Motzer, Howard I Scher, Nancy L Geller, William R Fair, Harry Herr, and Pramod Sogani. Randomized trial of etoposide and cisplatin versus etoposide and carboplatin in patients with good-risk germ cell tumors: a multiinstitutional study. *Journal of Clinical Oncology*, 11(4):598–606, 1993.
- [86] C Bokemeyer, O Köhrmann, J Tischler, L Weissbach, U R  th, A Haupt, Patrick Sch  ffski, A Harstrick, and H-J Schmoll. A randomized trial of cisplatin, etoposide and bleomycin (peb) versus carboplatin, etoposide and bleomycin (ceb) for patients with   good-risk  metastatic non-seminomatous germ cell tumors. *Annals of oncology*, 7(10):1015–1021, 1996.
- [87] A Horwich, D Th Sleijfer, SD Foss  , SB Kaye, RT Oliver, MH Cullen, GM Mead, R De Wit, PH de Mulder, DP Dearnaley, et al. Randomized trial of bleomycin, etoposide, and cisplatin compared with bleomycin, etoposide, and carboplatin in good-prognosis metastatic nonseminomatous germ cell cancer: a multiinstitutional medical research council/european organization for research and treatment of cancer trial. *Journal of clinical oncology*, 15(5):1844–1852, 1997.
- [88] David J Stewart. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical reviews in oncology/hematology*, 63(1):12–31, 2007.

- [89] Olivier Rixe, Waldo Ortuzar, Manuel Alvarez, Ricardo Parker, Eddie Reed, Ken Paull, and Tito Fojo. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the national cancer institute's anticancer drug screen panel. *Biochemical pharmacology*, 52(12):1855–1865, 1996.
- [90] Ronald S Go and Alex A Adjei. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *Journal of Clinical Oncology*, 17(1):409–409, 1999.
- [91] Anne Marie J Flichtinger-Schepman, Helma CM van Dijk-Knijnenburg, Saskia D van der Velde-Visser, Frits Berends, and Robert A Baan. Cisplatin-and carboplatin-dna adducts: is pt-ag the cytotoxic lesion? *Carcinogenesis*, 16(10):2447–2453, 1995.
- [92] PMAB Terheggen, AC Begg, JY Emond, R Dubbelman, BGJ Froot, and L Den Engelse. Formation of interaction products of carboplatin with dna in vitro and in cancer patients. *British journal of cancer*, 63(2):195, 1991.
- [93] Atsushi Hongo, Shuji Seki, Kosuke Akiyama, and Takafumi Kudo. A comparison of in vitro platinum-dna adduct formation between carboplatin and cisplatin. *The International journal of biochemistry*, 26(8):1009–1016, 1994.
- [94] L Oliveira and MS Rocha. Force spectroscopy unravels the role of ionic strength on dna-cisplatin interaction: Modulating the binding parameters. *Physical Review E*, 96(3):032408, 2017.
- [95] Axel Grothey and Richard M Goldberg. A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(10):2159–2170, 2004.
- [96] Ahmedin Jemal, Ram C Tiwari, Taylor Murray, Asma Ghafoor, A Samels, Elizabeth Ward, Eric J Feuer, and Michael J Thun. Cancer statistics, 2004. *CA-ATLANTA-*, 54(1):8–29, 2004.
- [97] Nikhil I Khushalani, Cynthia Gail Leichman, Gary Proulx, Hector Nava, Lisa Bodnar, Donald Klippenstein, Alan Litwin, Judy Smith, Enriqueta Nava, Lakshmi Pendyala, et al. Oxaliplatin in combination with protracted-infusion fluorouracil and radiation: report of a clinical trial for patients with esophageal cancer. *Journal of clinical oncology*, 20(12):2844–2850, 2002.
- [98] Aminah Jatoi, BR Murphy, NR Foster, DA Nikcevic, SR Alberts, JA Knost, TR Fitch, and KM Rowland Jr. Oxaliplatin and capecitabine in patients with metastatic adenocarcinoma of the esophagus, gastroesophageal junction and gastric cardia: a phase ii study from the north central cancer treatment group. *Annals of oncology*, 17(1):29–34, 2005.
- [99] Eric Raymond, Richard Lawrence, Elzbieta Izbička, Sandrine Faivre, and DD Von Hoff. Activity of oxaliplatin against human tumor colony-forming units. *Clinical Cancer Research*, 4(4):1021–1029, 1998.
- [100] D Cunningham, S Rao, N Starling, T Iveson, M Nicolson, F Coxon, G Middleton, F Daniel, J Oates, and AR Norman. Randomised multicentre phase iii study comparing capecitabine with fluorouracil and oxaliplatin with cisplatin in patients with advanced oesophagogastric (og) cancer: The real 2 trial. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18_suppl):LBA4017–LBA4017, 2006.
- [101] T Tashiro, Y Kawada, Y Sakurai, and Y Kidani. Antitumor activity of a new platinum complex, oxalato (trans-1, 2-diaminocyclohexane) platinum (ii): new experimental data. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 43(4):251–260, 1989.
- [102] Eric Raymond, Sandrine Faivre, Jan M Woynarowski, and Stephen G Chaney. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. In *Seminars in oncology*, volume 25, pages 4–12, 1998.
- [103] L Pendyala and PJ Creaven. In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer research*, 53(24):5970–5976, 1993.
- [104] A Riccardi, C Ferlini, D Meco, R Mastrangelo, G Scambia, and R Riccardi. Antitumour activity of oxaliplatin in neuroblastoma cell lines. *European Journal of Cancer*, 35(1):86–90, 1999.
- [105] G Mathe, Y Kidani, K Triana, S Brienza, P Ribaud, E Goldschmidt, E Ecstein, R Despax, M Musset, and JL Misset. A phase i trial of trans-1-diaminocyclohexane oxalato-platinum (l-ohp). *Biomedicine & pharmacotherapy= Biomedecine & pharmacotherapie*, 40(10):372–376, 1986.
- [106] Elin Jerremalm, Pernilla Videhult, Gunvor Alvelius, William J Griffiths, Tomas Bergman, Staffan Eksborg, and Hans Ehrsson. Alkaline hydrolysis of oxaliplatin isolation and identification of the oxalato monodentate intermediate. *Journal of pharmaceutical sciences*, 91(10):2116–2121, 2002.
- [107] Bernhard Spingler, Douglas A Whittington, and Stephen J Lippard. 2.4 Å crystal structure of an oxaliplatin 1, 2-d (gpg) intrastrand cross-link in a dna dodecamer duplex. *Inorganic Chemistry*, 40(22):5596–5602, 2001.
- [108] Jimmy D Page, Intisar Husain, Aziz Sancar, and Stephen G Chaney. Effect of the diaminocyclohexane carrier ligand on platinum adduct formation, repair, and lethality. *Biochemistry*, 29(4):1016–1024, 1990.

- [109] Margaretha M Jennerwein, Alan Eastman, and Abdul Khokhar. Characterization of adducts produced in dna by isomeric 1, 2-diaminocyclohexaneplatinum (ii) complexes. *Chemico-biological interactions*, 70(1-2):39–49, 1989.
- [110] Jan M Woynarowski, William G Chapman, Cheryl Napier, Maryanne CS Herzig, and Paul Juniewicz. Sequence-and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular dna. *Molecular pharmacology*, 54(5):770–777, 1998.
- [111] Alan Eastman. The formation, isolation and characterization of dna adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacology & therapeutics*, 34(2):155–166, 1987.
- [112] Stephen G Chaney, Sharon L Campbell, Ekaterina Bassett, and Yibing Wu. Recognition and processing of cisplatin-and oxaliplatin-dna adducts. *Critical reviews in oncology/hematology*, 53(1):3–11, 2005.
- [113] Alan Eastman. Separation and characterization of products resulting from the reaction of cis-diamminedichloroplatinum (ii) with deoxyribonucleosides. *Biochemistry*, 21(26):6732–6736, 1982.
- [114] Anne Marie J Fichtinger-Schepman, Johannis L Van der Veer, Jeroen HJ Den Hartog, Paul HM Lohman, and Jan Reedijk. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (ii) with dna: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, 24(3):707–713, 1985.
- [115] Anne Marie J Fichtinger-Schepman, Paul HM Lohman, and Jan Reedijk. Detection and quantification of adducts formed upon interaction of diamminedichloroplatinum (ii) with dna, by anion-exchange chromatography after enzymatic degradation. *Nucleic acids research*, 10(17):5345–5356, 1982.
- [116] Sang Soo Hah, Rhoda A Sumbad, Ralph W de Vere White, Kenneth W Turteltaub, and Paul T Henderson. Characterization of oxaliplatin- dna adduct formation in dna and differentiation of cancer cell drug sensitivity at microdose concentrations. *Chemical research in toxicology*, 20(12):1745–1751, 2007.
- [117] Aref Zayed, George DD Jones, Helen J Reid, Tamer Shoeib, Sarah E Taylor, Anne L Thomas, Joanna P Wood, and Barry L Sharp. Speciation of oxaliplatin adducts with dna nucleotides. *Metallomics*, 3(10):991–1000, 2011.
- [118] AC Pieck, A Drescher, KG Wiesmann, J Messerschmidt, G Weber, D Strumberg, RA Hilger, ME Scheulen, and U Jaehde. Oxaliplatin-dna adduct formation in white blood cells of cancer patients. *British journal of cancer*, 98(12):1959, 2008.
- [119] Rachel C Le Pla, Kenneth J Ritchie, Colin J Henderson, C Roland Wolf, Chris F Harrington, and Peter B Farmer. Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry method for detecting oxaliplatin–dna intrastrand cross-links in biological samples. *Chemical research in toxicology*, 20(8):1177–1182, 2007.
- [120] MS Rocha. Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate dna interactions with drugs and proteins in single molecule experiments. *Integrative Biology*, 7(9):967–986, 2015.
- [121] L Oliveira, JM Caquito Jr, and MS Rocha. Carboplatin as an alternative to cisplatin in chemotherapies: New insights at single molecule level. *Biophysical chemistry*, pages 8–14, 2018.
- [122] Hong-Yan Zhang, Yu-Ru Liu, Chao Ji, Wei Li, Shuo-Xing Dou, Ping Xie, Wei-Chi Wang, Ling-Yun Zhang, and Peng-Ye Wang. Oxaliplatin and its enantiomer induce different condensation dynamics of single dna molecules. *PloS one*, 8(8):e71556, 2013.
- [123] Richard J Knox, Frank Friedlos, David A Lydall, and John J Roberts. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum (ii) and cis-diammine-(1, 1-cyclobutanedicarboxylato) platinum (ii) differ only in the kinetics of their interaction with dna. *Cancer research*, 46(4 Part 2):1972–1979, 1986.
- [124] George Scatchard. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51(4):660–672, 1949.