

WILSON FERNEY PINZON BERNAL

ESTUDO DA INTERAÇÃO DNA-BERENIL POR
PINÇAMENTO ÓPTICO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

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

T

P661e Pinzon Bernal, Wilson Ferney, 1990-
2017 Estudo da interação DNA-berenil : por pinçamento óptico /
Wilson Ferney Pinzon Bernal. – Viçosa, MG, 2017.
x, 66f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.61-66.

1. Óptica física. 2. Óptica geométrica. 3. Instrumentos
ópticos. 4. DNA. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Física. Programa de Pós-graduação em Física
Aplicada. II. Título.

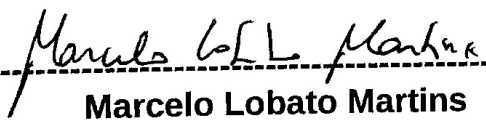
CDD 22 ed. 535.2

WILSON FERNEY PINZON BERNAL

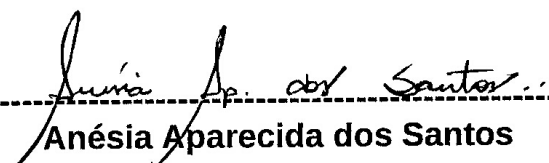
ESTUDO DA INTERAÇÃO DNA-BERENIL POR PINÇAMENTO ÓPTICO

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2017.



Marcelo Lobato Martins



Anésia Aparecida dos Santos



**Márcio Santos Rocha
(Orientador)**

À minha avó Ana Silvia Garzón que está no céu, aos meus pais Israel Pinzon Garzón e Fabiola Bernal Sanchez, aos meus irmãos, Marcela e Jose, ao meu avô Israel Pinzón Palacios e a todos aqueles que fizeram parte deste grande sucesso.

”Não é verdade que as pessoas param de perseguir os sonhos porque estão a ficar velhas, elas estão a ficar velhas porque pararam de perseguir os sonhos”

Gabriel García Márquez

Agradecimentos

Em primeira instância, agradeço a Deus por ter tornado possível a realização desta grande etapa na minha vida.

Agradeço aos meus pais, Fabiola Bernal Sanchez e Israel Pinzón Garzón, meus irmãos Jose e Marcela, meu avô Israel Pinzón e outros familiares que sempre deram apoio, incentivo, confiança e muito amor nestes últimos dois anos.

À quarta edição do programa de alianças para a educação e a formação (PAEC), incluindo a Organização dos Estados Americanos (OEA), ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), ao Ministério das Relações Exteriores do Brasil e da Organização Panamericana da Saúde (OPAS-EMS) por ter tornado possível a realização de uma pós-graduação no exterior.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física e Relações Internacionais da Universidade Federal de Viçosa.

Agradeço aos meus amigos ao longo da vida que vivem na Colômbia, por cada frase de saudação e encorajamento.

Aos meus amigos no Departamento de Física e membros do grupo de Física Biológica que estavam sempre dispostos a ajudar quando fosse necessário.

Aos meus colegas estrangeiros e colombianos, que caminharam comigo durante estes dois anos.

Agradeço profundamente o trabalho de meu Orientador, o professor Marcio Santos Rocha por seu apoio e liderança neste trabalho, de igual forma a meu amigo Eduardo Ferreira da Silva por tomar um pouco do seu tempo para me ajudar e colaborar no desenvolvimento deste projeto.

Um agradecimento muito especial para Lina Maria Alvarez Zapata, por estar presente nesta grande aventura. Sua alegria, apoio infinito e incondicional fizeram desta viagem uma das melhores experiências da minha vida.

À CAPES pela bolsa concedida, à Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio e credibilidade.

E, finalmente, ao Brasil, por ter permitido fazer parte da minha vida. Sua cultura, pessoas, paisagens e costumes fizeram desta luta, uma das experiências mais importantes da minha existência, com certeza será refletido na minha mente durante toda a vida.

Sumário

Lista de Figuras	vii
Resumo	ix
Abstract	x
1 Introdução	1
2 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)	3
2.1 Importância e contexto Histórico	3
2.2 A análise estrutural do DNA	4
2.2.1 Estrutura Primária	5
2.2.2 Estrutura Secundária	5
2.2.3 Estrutura Terciária	9
2.2.4 Estrutura Quaternária	10
2.3 Desenrolamento e superenrolamento do DNA	10
2.4 Caracterização Biofísica do DNA como polímero em solução	12
2.4.1 Polímero em solução Aquosa	12
2.4.2 Regime entrópico e entálpico	13
3 INTERAÇÃO DNA-LIGANTE	15
3.1 Tipos de interação DNA-Ligantes	15
3.1.1 Intercalação	15
3.1.2 Ligação de Fenda	17
3.2 Equilíbrio Químico nas interações DNA-Ligantes	18
3.2.1 Modelo de Hill	18
3.2.2 Modelo sequencial de ligação	21

4	BERENIL: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	23
4.1	Aceturato Diminazene ou Berenil	23
4.1.1	Caracterização Físico-Química	24
4.1.2	Berenil como Tripanocida	24
4.1.3	Evidência experimental da formação do complexo DNA-Berenil	25
4.2	Preparação de Amostras	26
4.2.1	Construção do porta amostra	27
4.2.2	Preparação da solução de DNA	28
5	PINÇAMENTO ÓPTICO E METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	29
5.1	Funcionamento Físico da Pinça Óptica	29
5.1.1	Montagem Experimental	32
5.1.2	Calibração da Pinça Óptica	33
5.1.3	Procedimento Experimental	35
6	DISCUSSÃO DE RESULTADOS	40
6.1	Análise de resultados do comprimento de persistência	40
6.1.1	Determinação dos parâmetros Físico-químicos da interação	42
6.2	Análise de resultados do comprimento de contorno	46
6.3	Análise dos experimentos de Força Máxima Aplicada	48
7	Conclusões	51
8	Apêndice A: Artigo aceito para publicação	53
9	Bibliografia	61

Lista de Figuras

2.1	Estrutura do nucleotideo.	5
2.2	Bases nitrogenadas presentes no DNA.	6
2.3	Especificidade do pareamento das bases no DNA.	7
2.4	Estrutura secundária do DNA	7
2.5	Representação da dupla hélice do DNA.	8
2.6	Tipos de DNA	9
2.7	Estrutura terciária e quaternária do DNA.	10
2.8	Curva de Fusão do DNA.	11
2.9	Aumento da entropia do sistema	13
3.1	Tipos de interação	16
3.2	Aumento do comprimento de contorno devido á intercalação	17
3.3	Modelo de Hill	20
3.4	modelo sequencial de ligação	22
4.1	Surfen C	24
4.2	Aceturato Diminazene ou Berenil	24
4.3	Complexo DNA-Berenil no tripanosoma	25
4.4	Preparação de Amostra	27
5.1	Pinzamento óptico	31
5.2	Pinzamento óptico	32
5.3	Montagem experimental	33
5.4	Poço de potencial	34
5.5	Processo de alongamento do DNA.	36
5.6	Curva de força de um DNA Padrão.	37
6.1	Comprimento de Persistência em função da concentração total de ligante	41
6.2	Ajuste do comprimento de Persistência para forças iônicas altas.	44
6.3	Ajuste do comprimento de persistência para forças iônicas baixas	45

6.4	Comprimento de contorno em função da concentração total de ligante	46
6.5	Variação do comprimento de persistência máximo em função da força máxima aplicada	49
6.6	Variação do comprimento de contorno em função da força máxima aplicada	50
6.7	Experimento de força alta: Invertendo a potencia	50

Resumo

BERNAL, Wilson Ferney Pinzon, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Estudo da interação DNA-Berenil mediante pinçamento óptico.** Orientador: Márcio Santos Rocha.

A fim de estudar a interação do complexo DNA-Berenil, foram realizados experimentos de pinçamento óptico. O estiramento de uma única molécula no regime entrópico possibilitou a caracterização mecânica do complexo mediante duas propriedades: comprimento do contorno e comprimento de persistência. Esta última permitiu determinar os parâmetros físico-químicos e os mecanismos de ligação envolvidos na interação, utilizando uma metodologia de análise baseado em um modelo estatístico. Demonstrou-se que os modos de ligação podem ser modulados alterando a força iônica em solução. Para concentrações iônicas altas ($[Na] = 150 \text{ mM}$) o modo de ligação entre o DNA e o Berenil é uma ligação não covalente com a fenda menor, sendo este o modo de ligação dominante na interação. Por outro lado, para concentrações iônicas baixas ($[Na] = 10 \text{ mM}$), o ligante também intercala parcialmente na dupla hélice. A metodologia aqui desenvolvida pode ser aplicada a outros tipos de ligantes que experimentam vários modos de ligação com o DNA, sendo portanto uma contribuição geral para este campo de pesquisa.

Abstract

BERNAL, Wilson Ferney Pinzon, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Study of the Interaction DNA-Berenil by optical tweezers.** Adviser: Márcio Santos Rocha.

Aiming to study the Berenil-DNA complex interaction it were developed optical clamp experiments. A stretch of a molecule in the entropic regime allowed the mechanical characterization of the complex through its, contour and persistence lengths. The last quantify, allowed to determinate the physical-chemical parameters and the binding mechanisms involved in the interaction, using the analyzes methodology based on a statistical model. It was showed that the binding modes can be modulated by changing the ionic strength in solution. At high ionic concentrations ($[Na] = 150 \text{ mM}$), the binding between the DNA and the Berenil is the non-covalent and with the minor cleft, since this form of interaction is the dominant one. In turn, at low ionic concentrations ($[Na] = 10 \text{ mM}$), the ligand is also partially intercalated in the double helix. The developed methodology can be applied to other types of ligands, which try several ways of binding to the DNA, being, therefore, a general contribution to this research area.

Capítulo 1

Introdução

Nos últimos anos o estudo de complexos DNA-ligantes tornou-se um assunto de pesquisa relevante para diversas áreas do conhecimento, incluindo bioquímica, biofísica, farmacologia, engenharia genética, entre outros [36].

Estudos biofísicos e bioquímicos adequadamente desenhados possibilitam esclarecer a natureza da união entre DNA e ligante, seus modos de ligação e sua afinidade de interação [8, 14, 69]. Esta informação é vital para a compreensão dos processos intracelulares, porque não só oferece um vislumbre da bioatividade do ligante para atingir o equilíbrio químico, mas também serve como ferramenta na engrenagem para o desenho de ligantes modificados com atividades biológicas e propriedades de ligação de maior eficiência e efetividade [32, 70].

Um dos fármacos conhecidos no campo da veterinária é o aceturate diminazeno (Berenil), usado no tratamento da tripanossomíase bovina e *Babesia canis*. Este tipo de diamidina aromática possui atividade quimioterapêutica que tem a capacidade de inibir a topoisomerase II e impedir a polimerização do DNA no cinetoplasto da mitocôndria celular [25, 26]. O cinetoplasto é uma masa de DNA circular dentro das mitocôndrias que contem muitas cópias do genoma mitocondrial que só se encontra nos protozoários da classe dos cinetoplastídeos, como por exemplo os tripanossomas [72, 73]. Embora o mecanismo de interação ao nível intracelular é ainda desconhecida para a comunidade científica, alguns estudos mostram que o berenil liga-se a vários G quadruplex com afinidade maior as bases A-T, isto é, ao surco menor do DNA [32, 66, 74].

Devido a forte interação entre DNA e Berenil, neste trabalho estudaremos seu mecanismo de interação através de uma técnica revolucionária que permite a realização de alongamentos entrópicos de molécula única de DNA ou complexo DNA-Berenil, por meio de um feixe fortemente focalizado pela objetiva de um microscópio, técnica conhecida como pinça óptica [8, 36, 71].

Além disso, mediante um ajuste estatístico das curvas de força por extensão do polímero, é possível extrair as propriedades mecânicas envolvidas no alongamento, tais como, comprimento de persistência e comprimento de contorno. Finalmente utilizando uma metodologia de análise de da-

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

desenvolvida pelo nosso grupo, é possível determinar os parâmetros físico-químicos envolvidos na interação.

Estes parâmetros permitem estudar e reconhecer os modos de ligação entre o DNA e Berenil durante o equilíbrio químico, contribuindo desta forma na análise e elucidação do mecanismo de interação do complexo DNA-Berenil, apoiando alguns resultados obtidos por outras técnicas experimentais [8, 24–26, 32, 66, 70].

Capítulo 2

ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

Esse capítulo refere-se ao quadro teórico do nosso objeto de estudo: O ácido desoxirribonucleico ou mais conhecido como DNA. Para uma melhor compreensão, vamos descrever alguns dos temas mais relevantes em seu estudo como o desenvolvimento histórico, a análise estrutural a nível bioquímico e caracterização biofísica como polímero em solução.

2.1 Importância e contexto Histórico

Dois eventos de grande importância tiveram lugar recentemente no campo científico. Um deles, considerado uma das maiores descobertas da física moderna, é o fenômeno da difração de raios X pelos cristais, experimentalmente desenvolvido por Knipping, Friedrich, Von Laue, Henry e William Bragg. A difração de raios x é considerada até hoje uma poderosa ferramenta de análise estrutural.

O outro evento realizado é sem dúvida o quinquagésimo aniversário do Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina atribuído a Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins por seu trabalho sobre a estrutura molecular do DNA em 1953, uma descoberta que não só ofereceu um vislumbre da compreensão do fenômeno natural mais extraordinário e complexo: a vida, mas também permitiu o desenvolvimento de outras ciências, cujo foco está relacionado com a prevenção e tratamento de doenças.

Há duas experiências particularmente importantes que evidenciam que o DNA é, sem dúvida, o componente cromossômico titular da informação genética das células vivas. Uma delas é a descoberta de Friedrich Miescher, cujo tema de investigação centrou-se no estudo do núcleo da célula. Ele descobriu uma substância ácida no núcleo de células, mais tarde conhecida como ácido desoxi-

ribonucleico (DNA). Apesar de ter sido suspeita a relação entre o ácido nucleico e herança celular, apenas em 1944, os doutores Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty descobriram que o DNA extraído a partir de uma estirpe virulenta levava a mensagem geneticamente hereditária da virulência. A outra experiência foi realizada em 1952, por Alfred Hershey e Martha Chase. Eles concluíram, a partir de uma análise radioativa, que o DNA da partícula de vírus entra na célula hospedeira fornecendo informação genética para a replicação no futuro [3].

No final de 1940, Erwin Chargaff e seus colegas descobriram que as bases nitrogenadas constituintes de nucleotídeos variam proporcionalmente e estão inter-relacionadas, chegando à conclusão de que a composição de bases do DNA varia de uma espécie para outra e é independente das alterações fisiológicas e modificações ambientais dos organismos vivos. O ácido desoxirribonucleico extraído de diferentes tecidos das mesmas espécies têm a mesma composição de bases e, em todos os DNAs, o número total de purinas é igual ao número total de pirimidinas. Estes resultados permitiram estabelecer a estequiometria do DNA, vislumbrando o processo de codificação e a herança de informação genética [3].

Em meados de 1950, Rosalind Franklin e Maurice Wilkings descobriram que cristais de DNA geravam um padrão de difração característico de raios x mostrando a estrutura helicoidal com dupla periodicidade ao longo do eixo principal correspondente a 3,4 e 34 Å respectivamente. Estas características juntamente com as regras de Chargaff ajudaram no entendimento estrutural do DNA tridimensional [3, 5].

Finalmente, em 1953, Watson e Crick postularam um modelo tridimensional para a estrutura do DNA, que considerou todos os resultados até à data. Tal modelo consiste em duas fitas que se enrolam sob um único eixo formando uma dupla hélice que gira em sentido anti-horário. Este avanço científico tornou-se um dos mais significativos e importantes do século XX, porque permitiu não só uma revolução no campo da engenharia genética, mas também se tornou uma ferramenta muito poderosa no vislumbramento de vários processos bioquímicos a nível molecular [3, 4].

2.2 A análise estrutural do DNA

Apesar da complexidade química do DNA, sua análise permitiu um vislumbre de seu dinamismo metabólico, na medida em que as moléculas de DNA podem ser reparadas, degradadas, alteradas, torcidas e relaxadas especificamente. O estudo da sua estrutura pode ser realizada em vários níveis, conhecidos como estruturas primária, secundária, terciária e quaternária, associadas a níveis de empacotamento cada vez mais elevados [5].

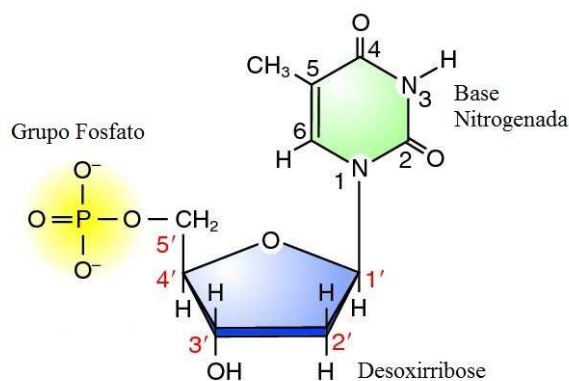


Figura 2.1: **Estrutura do nucleotídeo.** O nucleotídeo é composto por um grupo fosfato, base nitrogenada e desoxirribose (pentose). Adaptada da referência [15].

2.2.1 Estrutura Primária

O DNA é um polímero composto por nucleotídeos, que consistem em três componentes: uma base de purina ou pirimidina ligada através de uma ligação N – glucosídica, a um açúcar cíclico de cinco carbonos e um fosfato esterificado ao carbono na posição 5' do açúcar, conforme esquematizado na Fig. 2.1 [5]. Há outras formas ativas como os di ou trifosfatos cujas ligações de união com o nucleotídeo são do tipo pirofosfato.

No ácido desoxirribonucleico só existem quatro tipos de nucleotídeos, cada um caracterizado por uma respectiva base: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) e Timina (T), segundo a Fig. 2.2. No caso do açúcar-fosfato, o DNA contém uma desoxirribose [5].

As cadeias polinucleotídicas são polímeros de longo comprimento sem ramificações, cuja união entre dois nucleotídeos é determinada pelo fosfato-5' de um deles e o grupo hidroxila na posição 3' do açúcar próximo. Este tipo de ligação é bastante sensível à ruptura hidrolítica, produto de métodos químicos ou enzimáticos. Estudos recentes mostram que os principais graus de liberdade do polinucleotídeo são reduzidas a duas ligações O-P: a união fosfodiéster e a ligação glucosídica entre a base e o açúcar, que lhe permite adaptar certas conformações e assim atingir uma rigidez considerável [2].

2.2.2 Estrutura Secundária

As bases nitrogenadas desempenham um papel importante nesta estrutura. Uma das características mais relevantes é a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos aminas e carbonila

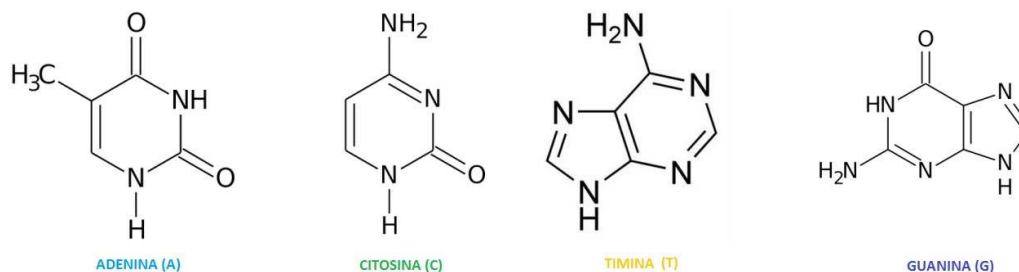


Figura 2.2: **Bases nitrogenadas presentes no DNA.** Cada nucleotídeo está caracterizado por uma base respectiva: Adenina, Citosina, Timina e Guanina. Extraída do livro “*Biología 1*”, disponível no site <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358006/contLinea/bibliografia.html>.

do DNA. Por exemplo, um composto como a timina pode gerar duas ligação de hidrogênio com um composto como a adenina e bases como a citosina e guanina, podem formar até três ligações de hidrogênio, como se ilustra na Fig. 2.3 [2].

Embora as pirimidinas (T e C) sejam menores em relação às purinas (G e A), os pares de bases A-T e G-C têm a mesma forma e tamanho aproximado. Estas duas características tornam possível a formação de duas cadeias fortemente estabilizadas por emparelhamento entre as bases dos polinucleótidos, como se observa na Fig. 2.4 [2].

Quando estas duas fitas são auto alinhadas, a nova estrutura assume a forma de uma dupla hélice, tal como confirmado pelos resultados experimentais por difração de raio-X de cristais de DNA. A Fig. 2.5 mostra a conformação da dupla hélice, cuja estrutura tem características de particular relevância [2, 5]:

1. O diâmetro da hélice é de cerca de 20 Å, gira no sentido horário, com dimensionalidade igual em toda a estrutura e tem um único eixo de hélice comum. A hélice tem duas fendas, uma com profundidade maior que a outra.
2. Os planos de superfície formadas pelos nucleótidos das cadeias unidas por ligações de Hidrogênio são perpendiculares ao eixo central da hélice, em que as bases estão localizados dentro da hélice e as colunas açúcar-fosfato no exterior. O espaçamento entre dois planos superficiais consecutivos é de 3,4 nm. Além disso, para cada passo da rosca da hélice são dez pares de bases, cujo deslocamento angular para cada par de bases é de 36°.
3. O empilhamento das bases dentro da hélice e a força de repulsão entre a carga negativa do lado de fora da hélice devido aos grupos fosfóricos, geram uma estabilidade eletrostática ao longo da estrutura helicoidal.

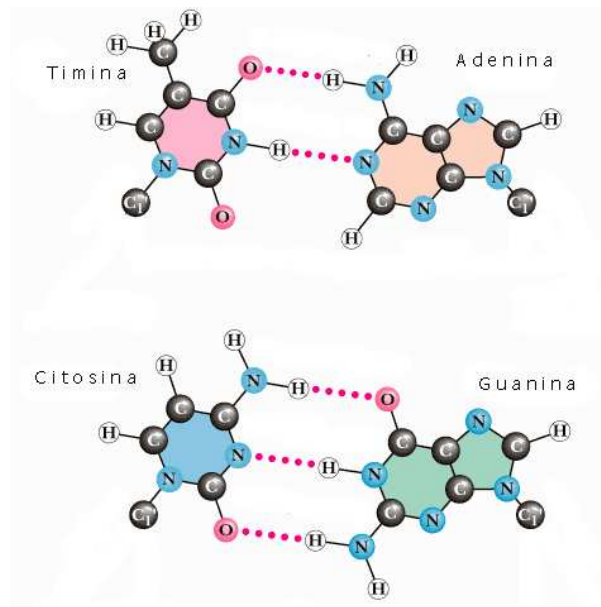


Figura 2.3: **Especificidade do pareamento das bases no DNA.** Ligações de hidrogênio formadas pelas bases do DNA no interior da cadeia. Extraída do livro “Um estudo sobre a manipulação do genoma humano”, UFSC disponível no site [http : //enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/gnetica/DNA.html](http://enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/gnetica/DNA.html).

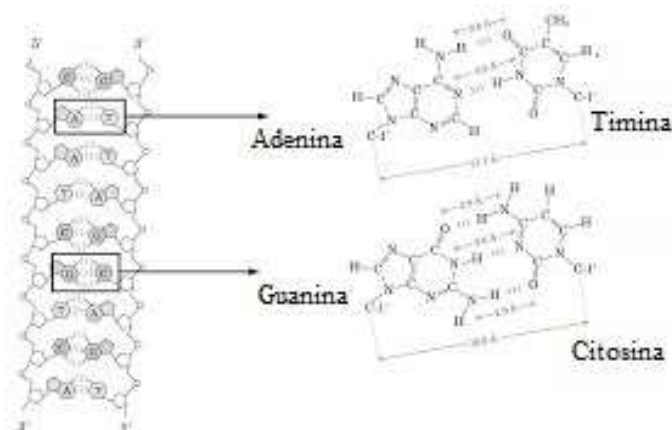


Figura 2.4: **Estrutura secundária do DNA.** Formação da cadeia do DNA, estabilização e emparelhamento das bases dos polinucleotídeos. Extraída do trabalho “Estrutura e função de ácidos nucleicos”, USP disponível no site [http : //www2.iq.usp.br/docente/flaviam/Aulas/QBQ0313/](http://www2.iq.usp.br/docente/flaviam/Aulas/QBQ0313/).

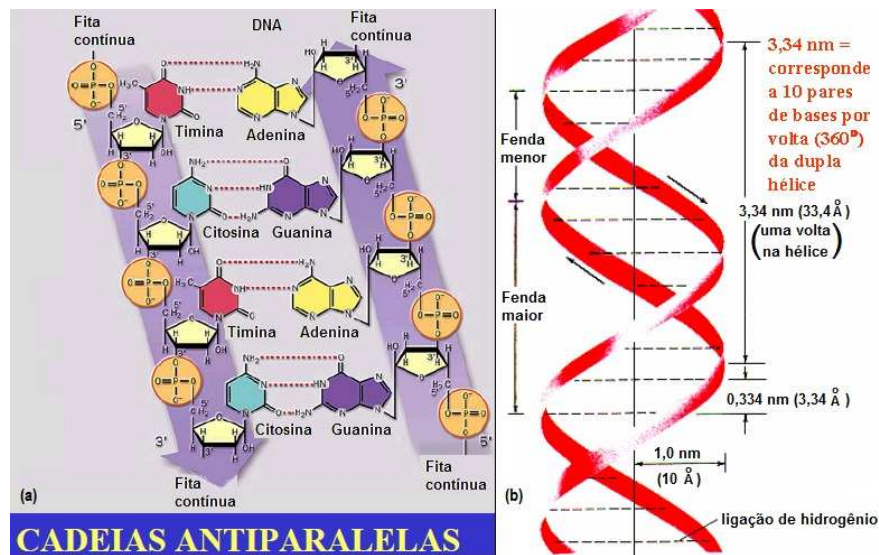


Figura 2.5: **Representação da dupla hélice do DNA.** Em (a) Estrutura bioquímica da DNA. Em (b) Estrutura helicoidal e tamanhos específicos. Visualizado em <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAYTsAF/estrutura-replicacao-dna>.

4. As duas fitas são antiparalelas, isto é, quando as cadeias são representadas desde o extremo 5' ao extremo 3', a direção é ascendente em uma fita e descendente na outra.
5. Os pares de bases responsáveis pela estrutura tradicional de DNA devem ser do tipo A-T e G-C, devido ao seu equivalente em tamanho, forma e afinidade na formação de ligações de Hidrogênio.
6. A ligação entre os átomos de carbono glicosídicos pode ser feita através de qualquer um dos quatro pares de bases AT, TA, CG e CG devido ao duplo eixo de rotação que passa através do plano da superfície de cada par de bases, relacionando as ligações glicosídicas NC e a mesma conformação entre o açúcar e o fosfato das cadeias antiparalelas em cada rotação.
7. A sequência de pares de bases ao longo da cadeia pode ser variada, devido a isometria dos quatro pares de bases, mantendo o diâmetro uniforme em todo o polímero.

Com base nestes pilares existem três tipos de DNA, os quais podem ser visualizados na figura 2.6 [11]:

1. **DNA-B:** É o mais abundante, foi descoberto inicialmente por Watson e Crick, satisfaz o

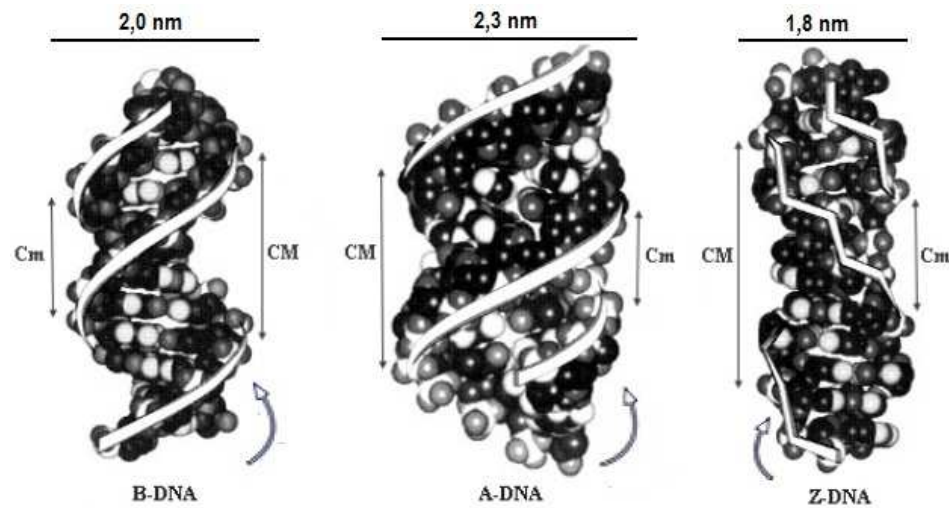


Figura 2.6: **Tipos de DNA.** Diferenças estruturais entre os tipos de DNA encontrados em diversas condições fisiológicas. Adaptada da referência [11].

modelo da dupla hélice acima descrito. Além disso tem uma umidade relativa de 92% em solução e encontra-se em soluções com baixa força iônica.

2. **DNA-A:** Tem 75% de umidade, 11 pares de bases por rotação completa e 23 Å de diâmetro aproximado. Em solução, precisa de sódio, de potássio ou de césio como contra-ions, além disso, sua estrutura é muito semelhante a dos híbridos DNA-RNA e as regiões de auto-emparelhamento de RNA-RNA.
3. **DNA-Z:** É um tipo de dupla hélice no sentido contrário (levógiro), é caracterizada pela configuração em ziguezague, 12 pares de base por rotação completa e 18 Å de diâmetro. A sua estrutura é observada em segmentos de DNA com a sequência alternada de bases de purinas e pirimidinas (GCGCGC) devido à conformação alternada dos resíduos de açúcar-fosfato.

2.2.3 Estrutura Terciária

Este tipo de DNA super-enrolado é constituído por uma fibra de 20 Å de diâmetro torcida sobre si mesma, formando uma espécie de super- hélice. Esta estrutura é o resultado da ação de enzimas chamadas topoisomerases II. Este tipo de estrutura cria uma certa estabilidade molecular [13].

No caso de organismos procariotas, o DNA é dobrado como uma super- hélice associada com uma baixa quantidade de proteínas cuja estrutura na maioria dos casos é tipo circular. Enquanto

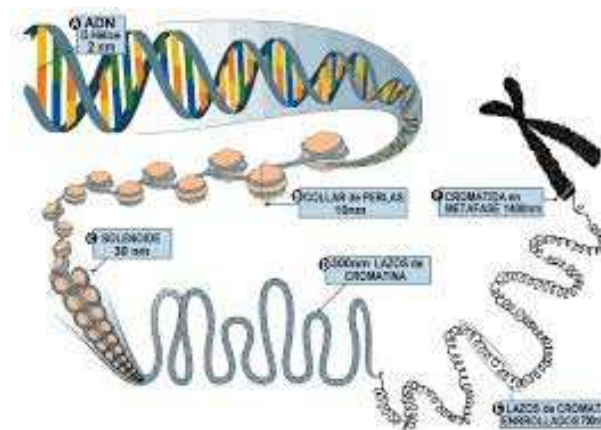


Figura 2.7: **Estrutura terciária e quaternária do DNA.** Organização estrutural do DNA de acordo com os níveis de empacotamento molecular. Adaptada do site [http : //www.maristasgranada.net/webcole/documentos/Ciencias.html](http://www.maristasgranada.net/webcole/documentos/Ciencias.html).

nos organismos eucariotas a embalagem é muito mais complexa e compacta. Embora o tamanho do DNA em geral seja grande, ele encontra-se alojado no interior do núcleo utilizando proteínas como histonas ou protaminas em casos particulares. Esta estrutura de ligação entre proteínas e DNA é chamada cromatina. Os níveis de organização da cromatina podem ser de vários tipos: nucleossomo, colar de pérolas, fibra de cromatina, loops radiais ou cromossomo [9, 11, 13].

2.2.4 Estrutura Quaternária

É a organização de mais alto nível do DNA. Neste caso a cromatina no núcleo tem uma espessura de 300 Å e é formado por um processo de embalagem sucessiva e ordenada. Primeiro, o conjunto de nucleossomas dá origem aos solenóides e em seguida estes se enrolam formando a cromatina do núcleo interfásico da célula eucariota.

2.3 Desenrolamento e superenrolamento do DNA

Durante a recombinação de genes, replicação e transcrição do DNA, a dupla hélice passa por um desenrolamento, produto da ruptura das ligações de hidrogênio que ligam as bases nitrogenadas. Um exemplo disto é a desnaturação do DNA (in vitro), como resultado do aumento da temperatura acima de um determinado ponto. Este processo pode ser medido espectroscopicamente, uma

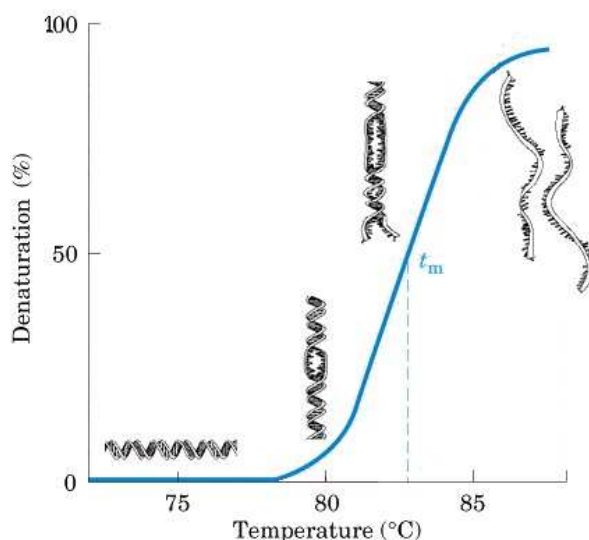


Figura 2.8: **Curva de Fusão do DNA.** Gráfico de desnaturação do DNA por aumento de temperatura. Adaptada do curso “*Biomoléculas*” UPV visualizado em <http://www.ehu.es/biomoleculas/an/an42.html>.

vez que a molécula desenrolada apresenta-se 37% acima do ponto de máximo de absorção de luz ultravioleta [14]. Assim, a partir das variações de absorção da luz e da temperatura é possível gerar uma curva sigmoide chamada curva do fusão de DNA, como mostrado na Fig. 2.8, que reflete as interações entre os pares de bases ligadas por ligações de hidrogênio e os efeitos cooperativos de empilhamento de bases. A temperatura de fusão é condicionada pela composição de bases. De fato, segmentos ricos em bases adenina-timina têm temperatura de fusão menor do que segmentos ricos em bases guanina-citosina, devido ao número de ligações de hidrogênio que os unem. Após a separação das duas cadeias, condições adequadas de temperatura podem renaturar o DNA [6].

Existem processos biológicos de separação envolvidos na estabilização da estrutura da dupla hélice: Superenrolamentos.

As topoisomerases permitem as alterações no grau de superenrolamento do DNA, gerando a quebra transitória de ligações fosfodiéster, permitindo a ligação contínua entre proteína e DNA, covalentemente. Desta forma as fitas do DNA passam umas sobre outras, alterando o superenrolamento da molécula [6].

O grau de superenrolamento de uma molécula de DNA pode ser verificada por meio do número de vezes que uma cadeia de DNA circular atravessa a outra cadeia. As enzimas responsáveis por estes processos são chamados topoisomerases e são responsáveis pela introdução ou remoção de superenrolamentos. Por exemplo, a Topoisomerase I quebra uma cadeia de DNA e relaxa o superenrolamento negativo, enquanto a topoisomerase II quebra as duas cadeias de DNA e acrescenta desenrolamentos negativos [6, 13].

Alguns fármacos atuam por inibição da atividade da topoisomerase, impedindo a mudança con-

formacional do DNA fita dupla e, conseqüentemente, induzindo a morte celular. Por exemplo, alguns derivados da camptotecina são capazes de inibir a topoisomerase I. Por outro lado, agentes tais como antraciclinas, derivados de acridina ou diamidinas aromáticas como o Berenil, exercem o seu efeito terapêutico sobre a topoisomerase II [6, 13].

2.4 Caracterização Biofísica do DNA como polímero em solução

Do ponto de vista químico, o DNA (ácido desoxirribonucleico) é um longo polímero de unidades simples (monômeros) de nucleótidos. Geralmente os polímeros podem ser classificados de acordo com o tipo de cadeia e constituição. No caso do DNA, ele é considerado de tipo linear uma vez que não apresenta bifurcações e copolímero randômico porque tem dois ou mais tipos de monômeros diferentes.

Dentro da mecânica de polímeros, o DNA pode ser caracterizado através de algumas propriedades mecânicas de grande importância, entre os quais estão: comprimento de persistência, comprimento de contorno, distância ponta a ponta quadrática média e raio de giro [8, 14].

O comprimento de contorno (L) é a distância entre as duas extremidades da cadeia de polímero quando este encontra-se numa configuração completamente retilínea. Esta propriedade é de grande importância, porque dá informação direta do tamanho linear do polímero.

O comprimento de persistência (A) pode ser entendido qualitativamente como a distância média entre duas dobras consecutivas ao longo do polímero. Esta propriedade é de grande importância porque dá uma ideia direta sobre a rigidez do polímero, isto é, quanto maior for o comprimento de persistência do polímero, maior será a rigidez e vice-versa.

A distância ponta a ponta quadrática média é definida como o valor quadrático médio da distância entre as extremidades da cadeia do polímero no estado de equilíbrio termodinâmico em solução. Finalmente, o raio de giro que representa o volume ocupado pelo polímero no espaço, definido como o raio da esfera cujo volume é o mesmo ocupado pelo polímero em solução.

2.4.1 Polímero em solução Aquosa

Quando o DNA é colocado em solução aquosa, ele naturalmente tende a atingir um estado de equilíbrio termodinâmico com o meio. Durante este processo o polímero sofre mudanças nas suas propriedades mecânicas dependentes de variáveis intrínsecas ou extrínsecas como a rigidez do polímero ou a temperatura do meio [7, 8].

Quanto mais elevada for a temperatura do meio, o número de interações com as moléculas

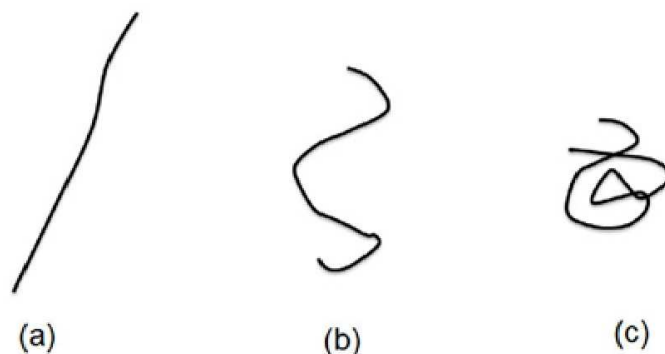


Figura 2.9: **Aumento da entropia do sistema.** Configurações A, B e C. Conforme aumenta a quantidade de dobras maior será a entropia do sistema. Adaptada da referência [8].

constituintes do meio aquoso também será maior, aumentando assim o número de dobras e as configurações possíveis do polímero (Ω) indicando que quanto maior for a temperatura, maior é a entropia (S):

$$S = k_B \log \Omega. \quad (2.1)$$

Em que k_b é a constante de Boltzmann. Por conseguinte, a entropia será menor, quanto menor for a temperatura do meio. Por exemplo, na Fig. 2.9, se mostram três configurações A, B e C. Com um aumento da temperatura do meio, a quantidade de dobras do polímero e, por conseguinte, a entropia do sistema aumentam [8].

2.4.2 Regime entrópico e entálpico

Geralmente um polímero adapta-se a configurações dependendo de seu estado de equilíbrio termodinâmico com o meio. Também é possível alterar certas configurações através da aplicação de forças externas. Dependendo da magnitude da força externa, pode-se apresentar dois casos diferentes: se a força externa aplicada é pequena, de modo que as ligações químicas do polímero não sofrem alterações estruturais e, conseqüentemente, o polímero retorna para a posição de equilíbrio original ao cessar da força, diz-se que a resposta elástica é de regime entrópico. Se, no entanto, a força externa é suficientemente grande para distorcer as ligações químicas do polímero, gerando o aumento no comprimento de contorno original, diz-se que a resposta elástica é de regime entálpico [7, 8].

No caso da molécula de DNA, a força limite que separa os dois regimes é de aproximadamente 5 pN. Por conseguinte, abaixo deste valor, a elasticidade entrópica pode ser caracterizada unicamente pelo comprimento persistência, tornando o parâmetro fundamental para a descrição mecânica do

regime entrópico da molécula de DNA [12].

Uma das expressões analíticas mais importantes no estudo das propriedades mecânicas da molécula de DNA é, definitivamente, a expressão para a curva de força por extensão da cadeia polimérica no regime entrópico. Ela foi obtido por Marko e Siggia em 1995 com base no modelo Worm Like Chain (WLC), que descreve o comportamento elástico do polímero para estiramentos próximos e distantes do equilíbrio termodinâmico dentro do regime entrópico ($F < 5 pN$):

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - \frac{z}{L})^2} - \frac{1}{4} \right], \quad (2.2)$$

F é a magnitude da força aplicada, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura, z o estiramento da molécula (extensão do DNA), L o comprimento de contorno e A o comprimento de persistência. Embora a expressão seja bastante precisa e muito usada a nível experimental, as forças externas aplicadas não devem atingir o comprimento de contorno máximo, isto é, deve-se considerar que $z \sim 0,9L$. Caso contrário, a força será suficientemente alta para atingir o regime entálpico. Pode-se observar que quando $z = L$, a expressão 2.2 diverge. A dedução matemática da expressão 2.2 pode ser encontrada em diferentes artigos e dissertações de nosso grupo de pesquisa [7, 8, 12, 14, 38, 50, 71].

Capítulo 3

INTERAÇÃO DNA-LIGANTE

Este capítulo irá apresentar de forma introdutória os tipos de interações e modelos quantitativos utilizados na caracterização físico-química de estados de equilíbrio entre a molécula de DNA e ligantes em solução. Estes parâmetros são relevantes para a análise de dados relacionados com o entendimento físico-químico da interação do nosso complexo de DNA-Berenil.

3.1 Tipos de interação DNA-Ligantes

Um ligante é o nome dado as drogas e outros compostos que se ligam ao DNA. Estes têm a capacidade de regular a atividade do polímero levando-a para um novo estado de estabilidade [15].

As características estruturais do DNA permitem a ligação entre diferentes tipos de ligantes. Para ligantes carregados positivamente são capazes de se ligar com polímeros aniônicos como DNA, gerando diferentes tipos de comportamento funcional ou conformacional do complexo final. A estrutura do DNA faz com que as interações possam ocorrer de forma covalente, ou seja, ligações diretas entre o composto e as bases nitrogenadas ou grupos fosfatos do DNA e de forma não covalente através de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas na fenda menor do DNA ou intercalação entre as bases nitrogenadas do polímero. A Fig. 3.1 mostra esquematicamente os tipos de interação.

Devido ao comportamento da ligação entre o DNA e nosso composto, nesta seção são apresentados em detalhe apenas dois tipos de interação: a intercalação e ligação de fenda [15].

3.1.1 Intercalação

A intercalação é a inserção de uma molécula aromática entre os pares de base consecutivos de DNA, como pode ser visto na Fig. 3.1 [17]. Este tipo de ligação não covalente foi descoberto por Lerman em 1961 como resultado da pesquisa no estudo da interação DNA-Acridina [18].

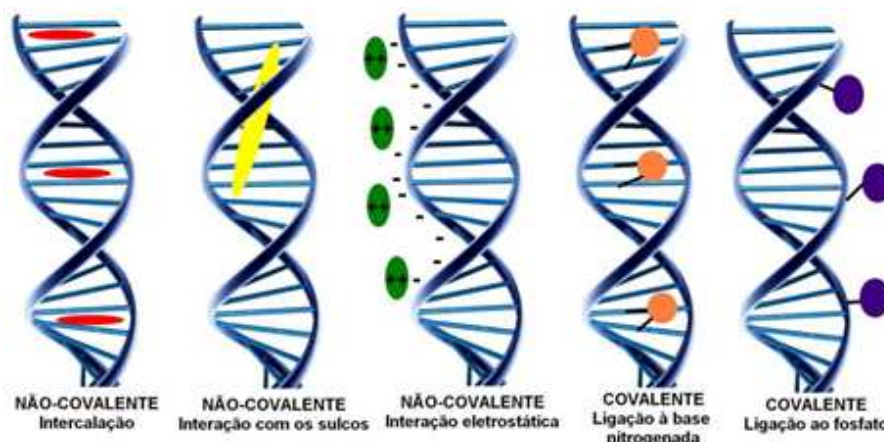


Figura 3.1: **Tipos de interação.** Tipos de ligações não covalentes e covalentes entre DNA e ligante. Adaptada da referência [16].

Entre os fatores mais importantes que contribuem para a estabilidade do complexo final (DNA-Intercalante), estão a estrutura aromática do composto, as interações com orbitais- π dos pares de base, forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre o ligante e o polímero [18].

Uma das modificações mais representativas que induzem a intercalação, é sem dúvida, o alongamento do polímero linear, ou seja, o aumento do seu comprimento de contorno, devido à separação gerada pela inserção do anel aromático entre os pares de bases do DNA. Este alongamento pode variar entre 2 e 3,5 Å e provoca mudanças estruturais ao longo da cadeia do polímero, gerando um desenrolamento da dupla hélice de DNA. Por outro lado, uma volta da dupla hélice na maioria das vezes representa uma perda na estrutura helicoidal regular seguida por uma diminuição no diâmetro do polímero [8].

Além disso, os estudos mostram que a intercalação de moléculas dentro da estrutura helicoidal do DNA contribui de forma significativa para a formação e estabilidade eletrostática do complexo final [19]. Um modelo que descreve quantitativamente a separação longitudinal causada por intercalação é ilustrado na Fig. 3.2. O comprimento de contorno do DNA puro é dado pela expressão:

$$L_0 = N_{bp}\Delta. \quad (3.1)$$

Por outro lado, o comprimento do contorno do complexo de DNA-Intercalante é:

$$L = L_0 + N_b\delta \quad (3.2)$$

Onde Δ é o espaçamento natural entre dois pares de base consecutivos, δ é o aumento induzido

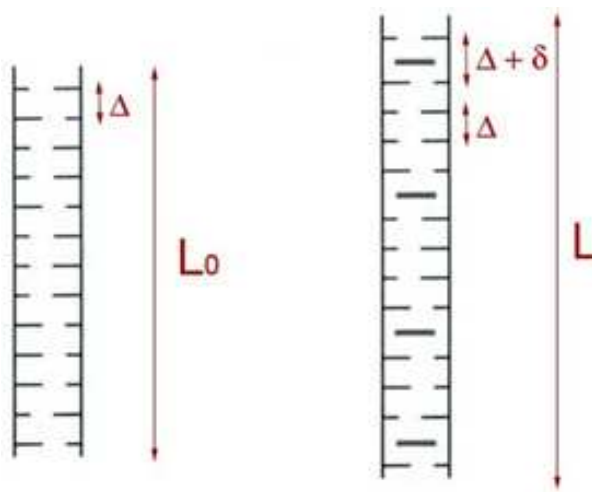


Figura 3.2: **Intercalação do ligante.** Aumento no comprimento de contorno devido a intercalação do ligante [8].

entre os pares de bases devido à molécula intercalada, N_{bp} o número de pares de bases de DNA e N_b o número de moléculas intercaladas em uma respectiva concentração.

Assim, o aumento relativo do comprimento de contorno Θ gerado pela molécula intercalada para um sistema de volume fixo é dada por:

$$\Theta = \frac{L - L_0}{L_0} = \frac{N_b \delta}{N_{bp} \Delta} = r \frac{\delta}{\Delta} \quad (3.3)$$

Onde $r = \frac{C_b}{C_{bp}} = \frac{N_b}{N_{bp}}$. Este parâmetro é chamado fração de sítios ligados, como se verá na próxima seção.

Entre os intercalantes mais conhecidos se encontram o Brometo de etídio que gera um aumento do contorno do DNA de 0,34 nm com um desenrolamento angular de 26° por molécula intercalada, a daunorubicina, o psoralen, entre outros [8].

3.1.2 Ligação de Fenda

No mercado existem algumas drogas de tipo antitumoral e antimicrobiana que possuem este tipo de ligação com o DNA. Estes ligantes são caracterizadas por interagir especificamente com a fenda maior ou menor do DNA, tal como ilustrado na Fig. 3.1. Em geral, este tipo de interação não covalente gerado entre a molécula e a cadeia do polímero é acompanhada por forças eletrostáticas, de van der Waals e ligações de hidrogênio [8].

Alguns compostos como as bisamidinas aromáticas interagem de forma reversível com a fenda menor. Normalmente esta ligação é acompanhada por interações hidrofóbicas não covalentes e ligações de hidrogênio fracas entre o ligante e as bases da cadeia do polímero. Estes compostos têm despertado o interesse da comunidade científica devido à sua eficiência no tratamento de doenças como a AIDS e infecções causadas por protozoários como a leishmaniose e tripanossomíase [20,21].

Outros exemplos de interação com a fenda menor do DNA são a distamicina-A, causadora de alterações na elasticidade e estabilidade do esqueleto na cadeia polimérica, e a família Hoescht usados como marcadores fluorescentes do DNA. Além disso, há também drogas que interagem de forma não covalente com o fenda maior do DNA acompanhada também por interações eletrostáticas fracas. Um dos mais conhecidos é o peptídeo alfa-hélice (*Leu – Ala – Arg – Leu*)₃ – NH. Também existem casos de drogas com ligação mista (Intercalação e ligação de fenda), por exemplo, os marcadores fluorescentes: YO e YOYO. Este último caracterizado pela actividade antitumoral como inibidor da topoisomerase [8].

3.2 Equilíbrio Químico nas interações DNA-Ligantes

Em qualquer processo químico, o equilíbrio químico é um estado estacionário de duas ou mais partições diferentes de um sistema, ou seja, o equilíbrio químico é alcançado quando as concentrações dos reagentes e produtos em uma reação química qualquer não mostram nenhuma mudança no tempo. Neste trabalho, os reagentes referem-se à molécula de DNA e os ligantes em solução, enquanto que o produto é o complexo DNA-Ligante.

Este estado de equilíbrio é de grande importância em nosso estudo. Além de vislumbrar os processos de interação entre a cadeia polimérica e o ligante em solução também permite a análise das características físico-químicas que fornecem informações sobre o tipo e forma de ligação do complexo DNA-Ligante. Para a determinação destas variáveis físico-químicas são utilizados vários métodos quantitativos, que dependem principalmente do modo de ligação. No caso do complexo de DNA-Berenil foram utilizados dois modelos que descrevem corretamente a tendência dos nossos dados experimentais: o modelo de Hill e o modelo sequencial de ligação.

3.2.1 Modelo de Hill

Em meados de 1910, A. V. Hill apresentou uma teoria que poderia explicar a curva de associação do oxigênio transportado na hemoglobina.

A hemoglobina presente nas células vermelhas do sangue tem como função transportar oxigênio

dos alvéolos pulmonares para outros tecidos. Ela é uma proteína globular composta de quatro subunidades proteicas, cada uma das quais é capaz de se ligar a um oxigênio usando um átomo de ferro. Hill conseguiu apresentar um gráfico da quantidade de proteína ligada ao oxigênio em função da quantidade de oxigênio presente. Também descobriu que esta curva era de tipo sigmoideal, diferente da encontrada pelo modelo de Scatchard, segundo a qual um único modo de ligação de associação é independente do número anterior de moléculas de oxigênio ligados a hemoglobina.

A reação química que descreve a atividade de hemoglobina é dada pela seguinte expressão:



Onde $H_B(O_2)_n$ representa o composto final. A variável n é conhecida como número de Hill e representa o número máximo de moléculas de oxigênio (quatro) que se pode ligar à hemoglobina. É também comum neste tipo de reação, definir a constante química aparente de associação K_A dada pela expressão:

$$K_A = \frac{[H_B(O_2)_n]}{[H_B][O_2]^n} \quad (3.5)$$

De acordo com Hill, o processo de ligação deve ser encarado como uma ligação simultânea de todas as moléculas de oxigênio possível, ou seja, deve-se considerar o sistema com apenas dois estados: $r = 0$ e $r = r_{max}$ (saturado), como é mostrado na Fig. 3.3. Isso pressupõe que se a constante aparente K_A representa a interação de n moléculas de oxigênio com uma única proteína de hemoglobina (Eq.3.7) e a constante intrínseca K_i representa a interação de uma única molécula de oxigênio com um único sitio de ligação na hemoglobina, então, as quatro constantes intrínsecas são iguais $K_1 = K_2 = K_3 = K_4 = K_i$ e, portanto, a constante de associação está dada por:

$$K_A = K_i^n \quad (3.6)$$

Várias investigações demonstraram que moléculas de diferentes tipos de ligantes podem ligar-se simultaneamente ao DNA, formando agregados aleatórios ao longo da cadeia polimérica, e que o processo de ligação pode ser ajustado pela isoterma de Hill. Portanto, a adaptação do modelo de Hill para o caso específico da molécula de DNA [8, 22] implica que a constante de associação aparente pode ser escrita como se segue:

$$K_A = \frac{C_b}{(C_{bp} - C_b)C_f^n} \quad (3.7)$$

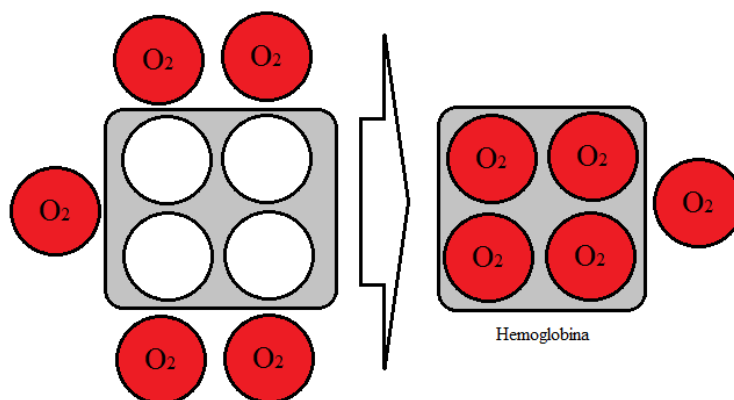


Figura 3.3: **Modelo de Hill.** Ligação simultânea de todas as moléculas de oxigênio possíveis na hemoglobina.

Em que C_b representa a concentração de ligantes ligados ao DNA, C_{bp} a concentração de pares de bases do polímero e C_f a concentração de ligante livre em solução. Se $r = \frac{C_b}{C_{bp}}$ e $K_A = K_i^n$, então a isoterma de ligação de Hill conhecida como a relação entre a fração de sítios ligados (r) com a concentração de ligante livre em solução, pode ser escrita como:

$$r = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (3.8)$$

Assim, para ligantes que ocupam mais do que um par de bases no polímero, é possível acrescentar o parâmetro r_{max} :

$$r = \frac{r_{max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (3.9)$$

De acordo com a expressão 3.9, para valores fixos de K_i e r_{max} , quanto maior for o coeficiente de Hill n , o sistema vai saturar a uma concentração de ligante livre em solução cada vez menor. Assim, quanto maior for n , a afinidade química entre os ligantes e o DNA também será maior. Esta propriedade é apresentada em alguns complexos e é denominada cooperatividade, isto é, a ligação de uma molécula ao DNA aumenta a probabilidade de uma segunda molécula ligar e assim por diante, até ocupar todos os sítios de ligação possíveis do polímero. Certamente, este efeito depende de dois parâmetros físico-químicos, K_A e n :

1. Se $n > 1$, K_A aumenta com n , ou seja, a primeira molécula que se liga ao DNA, aumenta a probabilidade ou a afinidade de ligação da seguinte. Esse comportamento é chamado cooperatividade positiva.

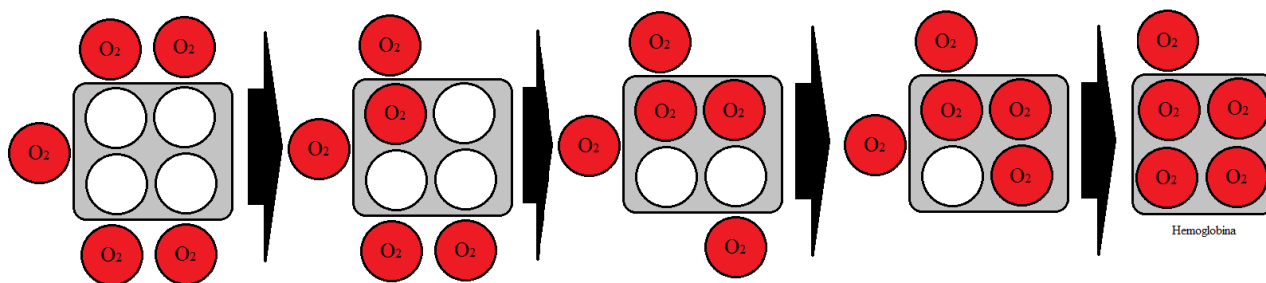


Figura 3.4: **Modelo sequencial de ligação.** Ligação sequencial de todas as moléculas de oxigênio, até atingir a saturação.

2. Se $n < 1$, K_A diminui com n , isto é, a primeira molécula que se liga ao DNA, reduz a probabilidade ou dificulta a afinidade de ligação da seguinte. Esse comportamento é chamado cooperatividade negativa.
3. Se $n = 1$, a primeira molécula que se liga ao DNA, não interfere com a ligação da molécula seguinte. Este tipo de ligação é não cooperativa e reflete o modelo de Scatchard mencionado acima.

3.2.2 Modelo sequencial de ligação

De acordo com o modelo de Hill, todas as moléculas possíveis (ligantes) se ligam simultaneamente ao substrato, com constantes intrínsecas iguais para todos os sítios de ligação. O modelo sequencial de ligação leva em conta o processo de agregação intermediário, isto é, todas as moléculas possíveis envolvidas na ligação irão ligar-se sequencialmente até atingir a saturação, tal como ilustrado na Fig. 3.4. Neste caso, as constantes intrínsecas dos n sítios de ligação são diferentes, e por conseguinte, o sistema adota n estados intermediários ou diferentes configurações possíveis, dadas pela expressão:

$$[P_0] + [P_1] + [P_2] + \dots + [P_n] = [P_0](1 + K_1 C_f + K_1 K_2 C_f^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n C_f^n) = [P_0] Q \quad (3.10)$$

com,

$$K_1 K_2 \dots K_i = \frac{[P_i]}{[P_0] C_f^i} \quad (3.11)$$

Onde P_i representa o substrato com i sítios ligados, K_i a constante intrínseca para cada passo i da reação e Q a soma sobre todos os estados possíveis do sistema. Para determinar a isoterma de ligação é necessário calcular a fração total média de sítios ligados r , definida como a razão entre o número total de sítios ocupados no substrato e o número total de sítios do mesmo:

$$r = \frac{[P_1] + 2[P_2] + \dots + n[P_n]}{n([P_0] + [P_1] + \dots + [P_n])} = \frac{K_1 C_f + K_1 K_2 C_f^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n C_f^n}{n(1 + K_1 C_f + K_1 K_2 C_f^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n C_f^n)} \quad (3.12)$$

Assim, a isoterma de ligação para o modelo sequencial pode ser expressa como:

$$r = \frac{C_f}{nQ} \frac{dQ}{dC_f} = \frac{1}{n} \frac{d \log Q}{d \log C_f} \quad (3.13)$$

Devido à quantidade excessiva de parâmetros no modelo sequencial, o modelo de Hill é mais desejado na análise de dados experimentais.

Capítulo 4

BERENIL: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Neste capítulo a caracterização estrutural e funcional do nosso fármaco será exibida, além da sua interação com o DNA na formação do complexo DNA-Berenil. Também será descrita a metodologia de preparação da amostra.

4.1 Aceturato Diminazene ou Berenil

O aceturato diminazene, também conhecido como berenil, é um tipo de benzamidina aromática [1,3 - bis(4' - amidinofenil) triazene], composto orgânico caracterizado por ter uma cadeia alcano central inerte unida através de ligação éter ao grupo amidino polar terminal. Alguns ensaios biológicos mostraram que esta droga tem atividade tripanocida e babesial [23,24]. Tem sido cada vez mais utilizada no tratamento da tripanossomíase bovina na África, embora também tenham sido relatados ensaios para o tratamento da doença do sono no homem, babesia em cães e inibição do crescimento de um número de espécies de bactérias e fungos. O aspecto interessante sobre a funcionalidade desta droga é a sua capacidade como inibidor seletivo da síntese de DNA no cinetoplasto de tripanossoma, tornando-se uma ferramenta valiosa na investigação sobre a caracterização de compostos que, embora sejam usados em outras doenças como o cancer, compartilham um mecanismo de ação muito semelhante.

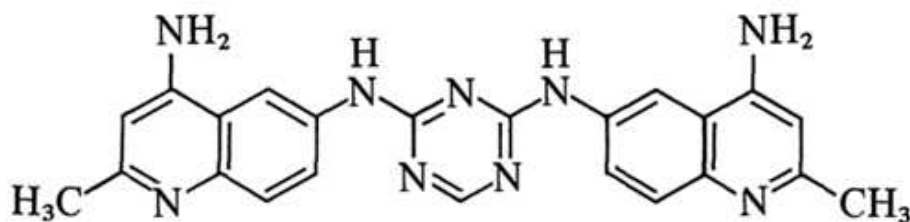


Figura 4.1: **Surfen C**. Estrutura química do composto Surfen C. Adaptada da referência [25].

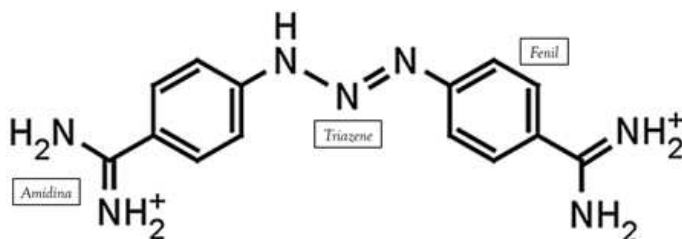


Figura 4.2: **Aceturato Diminazene ou Berenil**. Estrutura química do composto Berenil. Adaptada da referência [25].

4.1.1 Caracterização Físico-Química

As conclusões por Jensch em 1958, permitiram o desenvolvimento do Berenil através da dissecção sistemática de uma tripanocida tóxica chamada Surfen C, como é mostrado na Fig. 4.1. Jensch conseguiu sintetizar um número de moléculas simétricas contendo porções amidino ou guanidina-fenil separados por uma variedade de pontes entre os anéis. Além disso, se encontrou que a atividade tripanocida máxima acontecia quando dois resíduos de amidino-fenilo eram acompanhados por uma ponte chamada triazeno.

A molécula de Berenil é de tipo coplanar, encontra-se sobre um eixo duplo cristalográfico e tem um grupo amidino protonado em solução aquosa, conseguindo uma carga total de +2. Além disso, devido a várias ligações simples na sua estrutura, a molécula pode assumir determinados estados conformacionais produto de pequenas torções entre os seus anéis aromáticos [26], como é ilustrado na Fig. 4.2.

4.1.2 Berenil como Tripanocida

O Berenil tem sido usado primeramente como um composto medicinal curativo para o tratamento da tripanossomíase. Vários estudos têm relatado que a droga é mais eficaz contra *Trypanosoma Congolense* em comparação com o *Trypanosoma Brucei* e *Rhodesiense* [27–29]. De acordo com Williamson, embora a atividade profilática seja baixa, as principais vantagens do berenil são seu alto índice terapêutico e a sua resistência a outras drogas.

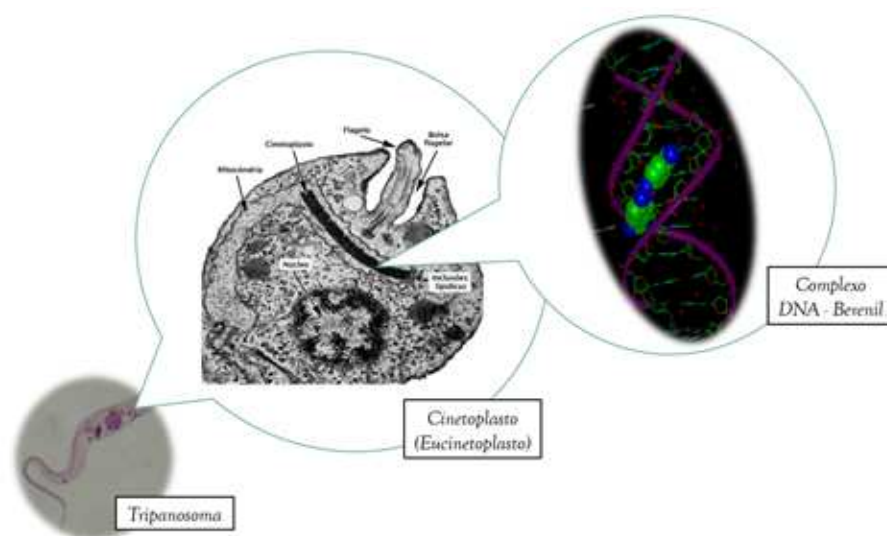


Figura 4.3: **Complexo DNA-Berenil no tripanossoma.** Localização específica do complexo DNA-Berenil no cinetoplasto do tripanossoma.

Também tem sido demonstrado que o Berenil possui uma afinidade de ligação com o DNA do cinetoplasto do tripanossoma. O cinetoplasto do tipo Kinetoplastida é uma massa de DNA circular extranuclear encontrado dentro da membrana dupla de uma grande mitocôndria e está situado perto da base do flagelo, por causa de sua ligação com o citoesqueleto celular do tripanossoma, como é ilustrado na Fig. 4.3. O realmente interessante é que várias investigações com diferentes técnicas experimentais como fluorescência, detergente de lise, centrifugação e autorradiografia sugeriram que Berenil atua como um inibidor seletivo da replicação do DNA no cinetoplasto, produto da interação direta entre o fármaco e o DNA [25, 29, 30].

4.1.3 Evidência experimental da formação do complexo DNA-Berenil

Vários estudos mostram a formação de complexo DNA-Berenil. Um deles é o aumento no comprimento de onda do espectro de absorção do fármaco, através da adição de DNA [25]. Outras investigações recentes por métodos de filtração em gel, calorimetria e espectrofotometria demonstram a ligação de uma molécula de fármaco por cada quatro ou cinco nucleotídeos [25, 31, 32]. Além disso, para concentrações elevadas de droga, ocorrem alterações conformacionais ou alostéricas em que o número de sítios ligados pode aumentar aproximadamente ao triplo [32]. Estudos adicionais por ultracentrifugação em gradientes de cloreto de célio e sedimentação de DNA mostram que aumentando o conteúdo de bases AT para forças iônicas elevadas, a densidade do complexo aumenta, sugerindo assim, a ligação preferencial para esses pares de bases. Outros estudos por análise cris-

talográfica de raios X, RMN, UV, MS e ITC indicam que a droga tem um grau de preferência por 5'-AT-3' [25, 74].

De acordo com alguns estudos, a estabilidade na formação do complexo DNA-Berenil para forças iônicas elevadas é suportado na junção entre os grupos amino terminais da molécula de Berenil e os átomos de oxigênio carregados nos grupos fosfato do DNA, através de ligações de hidrogênio [25].

Outro aspecto relevante na estabilidade do complexo é a distância mínima entre os anéis aromáticos na molécula de Berenil, isto é, aproximadamente a distância da ponte de triazeno. De acordo com experiências de ultracentrifugação e de fluorescência, foi demonstrado que a remoção de um átomo de nitrogênio na ponte de triazeno, reduz a atividade de inibir o crescimento e a capacidade de se ligar ao DNA dentro da célula, enquanto se removido dois átomos de nitrogênio, o composto resultante não age seletivamente sobre o DNA do cinetoplasto [25].

4.2 Preparação de Amostras

Nosso principal objetivo é visualizar com precisão o mecanismo de ação do complexo DNA-Berenil in vitro sob certas condições. Para tais fins, experimentos de pinçamento ótico foram realizados, tema que será discutido mais tarde. Esta técnica permite analisar as mudanças estruturais de uma única molécula de DNA ou complexo DNA-Berenil, através das mudanças nas propriedades mecânicas determinadas por alongamentos entrópicos do mesmo.

Para alcançar sucesso nos experimentos, o grupo do laboratório de Física Biológica da Universidade Federal de Viçosa adaptou um método de preparação da amostra. Ele permite a ligação de uma das extremidades do DNA a uma microesfera de poliestireno, sendo este objeto aprisionado pela pinça ótica, enquanto a outra extremidade é presa á superfície no fundo da lamínula do porta amostra, conforme ilustrado na Fig. 4.4. Esta configuração permite o alongamento do polímero e a extração das propriedades mecânicas.

Com respeito ao DNA, trabalhou-se com amostras de DNA do fago- λ biotinizadas em uma solução salina tamponada em concentração de $[NaCl] = 140 \text{ mM}$. Este DNA foi abstraído experimentalmente do bacteriófago λ , um vírus que infecta a bactéria *Escherichia coli*. Este tipo de DNA é caracterizado por ser de fita dupla, forma B, com cerca de 48,500 pares de bases e ter dimensões espaciais ótimas para os alongamentos por pinçamento ótico. O seu comprimento de contorno é de aproximadamente $16,5 \mu\text{m}$ e um comprimento de persistência em torno de 50 nm [8, 33–36].

Devido à forte afinidade de interação entre a proteína biotina e estreptavidina, foi necessário a adaptação [37] e a implementação de um protocolo experimental que consiste em biotinar o DNA, ou seja, marcar as extremidades do polímero com a proteína biotina e revestir a lamínula do porta amostra e a microesfera de poliestireno de $3 \mu\text{m}$ de diâmetro com estreptavidina. A configuração experimental pode ser visto na fig. 4.4. Como dado adicional, as microesferas revestidas são fornecidas

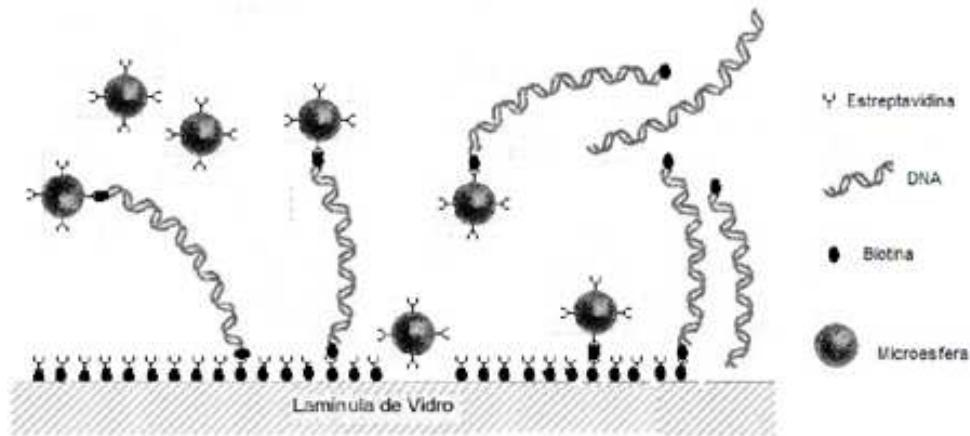


Figura 4.4: **Preparação de Amostra.** Configuração de união entre o DNA e a lamínula, na preparação de amostra. Adaptada da referência [8].

pelo fabricante. A preparação da solução de DNA e a montagem do porta amostra é apresentada na continuação.

4.2.1 Construção do porta amostra

1. Escolhe-se uma lamínula de vidro de $150 \mu\text{m}$ de espessura, 5 cm de comprimento e 2 cm de largura. Um O-ring de 1 cm de diâmetro é fixado no centro da lamínula usando parafina derretida.
2. Depois acrescentam-se $20 \mu\text{L}$ de BSA-biotinilada (BSA-Biot) em solução tampão A (solução previamente feita com 10 mM de MgCl_2 , 40 mM de KCl e 25 mM de Tris-HCl em $\text{pH } 8,0$), com uma concentração de $1,8 \mu\text{g/mL}$ no interior do O-ring.
3. Após 20 minutos, retira-se o BSA-Biot do O-ring e lava-se com $25 \mu\text{L}$ de tampão A.
4. Imediatamente a seguir, são adicionados $20 \mu\text{L}$ de estreptavidina (STP) em solução de tampão PBS de concentração igual a $0,1 \text{ mg/mL}$.
5. Após 20 minutos, remove-se a estreptavidina do interior do O-ring e lava-se com PBS $7,4$ ($\text{NaCl} = 140 \text{ mM}$). Finalmente, depois de 10 minutos de secagem, se leva o porta-amostras para o piezoelétrico do microscópio onde é fixado.

4.2.2 Preparação da solução de DNA

1. São colocados 2 μL de microesferas de poliestireno, 5 μL de DNA – λ biotilado e 20 μL de PBS 7,4 em um microtubo (Eppendorf).
2. Em seguida, o eppendorf é levado a banho térmico durante cerca de uma hora.
3. Imediatamente a seguir, são acrescentados 100 μL de PBS 7,4 e esperados 10 minutos em banho térmico para a homogeneização da solução.
4. Em seguida, a solução é levada ao microscópio e colocada no interior do O-ring. Finalmente deixam-se 30 minutos em repouso para obter ligar a biotina da extremidade do DNA e a estreptavidina do fundo da lamínula.

Capítulo 5

PINÇAMENTO ÓPTICO E METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Existem várias técnicas experimentais para caracterizar e analisar as mudanças estruturais de vários complexos. Geralmente, existem dois métodos de análise: molécula única e múltiplas moléculas. No nosso caso, a técnica utilizada é a pinça óptica, uma técnica experimental de uma única molécula que possibilita uma análise detalhada do nosso complexo DNA-Berenil, sem a necessidade de recorrer a estatísticas sobre várias moléculas diferentes. Em seguida, será realizada uma visão geral de seu funcionamento, montagem experimental, calibração e procedimento experimental usado no laboratório.

5.1 Funcionamento Físico da Pinça Óptica

Como definição geral, o pinçamento óptico consiste no aprisionamento de micropartículas dielétricas no foco de um feixe fortemente focalizado através da objetiva de um microscópio [43, 48, 49]. Esta técnica tornou-se uma ferramenta forte na análise estrutural de complexos DNA-ligantes, porque, além de permitir a manipulação de micropartículas, também possibilita a compreensão dos mecanismos de interação entre o DNA e o ligante [45, 47].

O aprisionamento e manipulação destas microesferas dielétricas deve-se ao equilíbrio e à competição entre duas forças:

1. A força de espalhamento (pressão de radiação) que empurra a partícula na direção da luz incidente [41, 42, 44] e é representada por um único raio, como:

$$F \propto P_r \left(\frac{1}{v} \right) \propto P_r \left(\frac{n}{c} \right) \quad (5.1)$$

Onde P_r é a potência do raio, n o índice de refração do meio de incidência e c a velocidade da luz no vácuo.

2. A força de gradiente que aponta em direção a região focal do feixe [46]. Esta surge devido a refração da luz incidente na partícula dielétrica, a diferença entre os índices de refração e a conservação do momento linear entre o feixe de luz e a microesfera. Por óptica geométrica, sabe-se que quando um raio passa de um meio para outro com índices de refração diferentes, o raio incidente sofre um desvio na sua trajetória inicial e, conseqüentemente, o seu momento linear também muda. Portanto, considerando a lei do movimento de Newton, a microesfera vai sofrer uma variação de momento da mesma magnitude, mas oposta à variação do momento do raio. Agora, como a partícula tem massa e tem um índice de refração superior ao meio de incidência, a mudança de momento vai fazer que apareça uma força sobre ela para levá-la ao foco do feixe.

A ordem de grandeza destas forças podem ser deduzidas a partir de uma análise que utiliza a interpretação quântica da luz como um conjunto de fótons, que têm uma quantidade de movimento linear e uma energia bem definida [8]. Imagine um fóton incidindo em um espelho com momento linear \vec{p} que sofre reflexão total, adquirindo um momento $-\vec{p}$. Assim, a transferência de quantidade de momento ao espelho é dada pela seguinte expressão:

$$\Delta\vec{p} = \vec{p} - (-\vec{p}) = \hbar\vec{k} - (-\hbar\vec{k}) = 2\hbar\vec{k} \quad (5.2)$$

Onde \vec{k} é o vetor de onda e \hbar a constante de Planck. Reescrevendo a equação 5.2 em função da energia do fóton E , encontramos que a mudança de momento pode ser escrita da forma:

$$\Delta\vec{p} = 2\hbar\vec{k} = 2\frac{\hbar\omega}{c} = 2\frac{E}{c} \quad (5.3)$$

Sendo ω a frequência angular da luz incidente. Assim, podemos concluir que a força total exercida por N fótons com energia E_t sobre o espelho é:

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt} = \frac{d}{dt} \left(2\frac{NE}{c} \right) = \frac{2}{c} \frac{d}{dt} (E_t) = \frac{2}{c} (P_t) \quad (5.4)$$

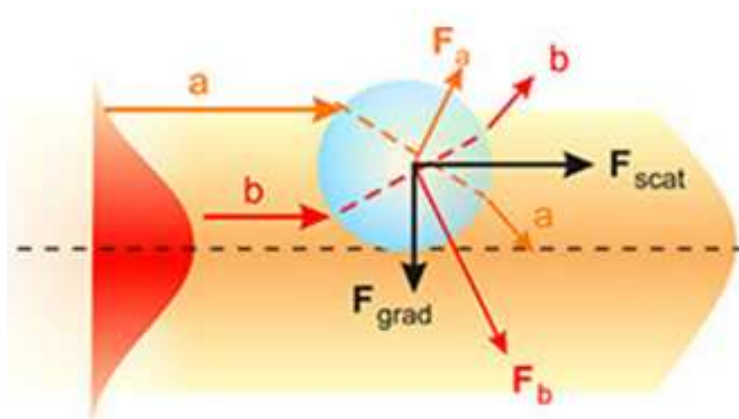


Figura 5.1: **Caso No 2: Pinçamento Óptico.** Efeito dos raios refratados para uma microesfera situada acima do foco. Além disso, os efeitos dos raios refletidos na microesfera quando não tem focalização do laser. Extraída da página “*Pinzas ópticas*“, disponível no site “<http://www.ariasgonzalez.com/phone/nmo—pinzas-opticas.html>“.

Onde P_t é a potência do feixe incidente e cuja ordem de magnitude encontra-se normalmente ao redor dos mW . Assim, podemos estimar aproximadamente a ordem de grandeza da força em um experimento de pinça óptica, que é em torno dos piconewtons.

A Fig. 5.1 a microesfera encontra-se acima da região central do feixe de luz não focalizado. O desvio dos raios refratados a e b , geram duas forças F_a e F_b . Porém, como a intensidade do laser tem um perfil gaussiano, então a força F_b é maior em magnitude que a força F_a . Assim, a força de gradiente resultante também vai estar dirigida à região central do feixe. No caso dos raios refletidos, a força de espalhamento atua na direção de incidência do feixe e o seu módulo é representativamente maior, porque o laser não está focalizado. Daí a importância da focalização do feixe de luz [8].

No caso da Fig. 5.2 mostra dois raios de luz a e b que são focalizados pela lente de uma objetiva. Os dois raios sofrem refração e portanto, o desvio do raio a dá origem à força F_a e o raio b dá origem à força F_b , assim, a força de gradiente (F_{grad}) resultante tende a trazer a microesfera ao foco do feixe, enquanto que os raios que se refletem geram uma força de espalhamento (F_{scat}) na direção do feixe. A competição entre estas duas forças leva a partícula para a região focal, permitindo o aprisionamento da microesfera [8].

Este aprisionamento na região focal do feixe pode ser visto como um poço de potencial harmônico Browniano (a esfera experimenta um movimento browniano dentro do poço em solução aquosa) para diferentes deslocamentos da microesfera no interior do mesmo. A curvatura do poço, ou seja, a potência do feixe de luz é caracterizada pela constante de força k da pinça óptica [8].

Os casos acima mencionados estão dentro do regime da óptica geométrica, isto é, o raio das microesferas é maior do que o comprimento de onda da luz incidente ($r > \lambda$). Caso contrario, este

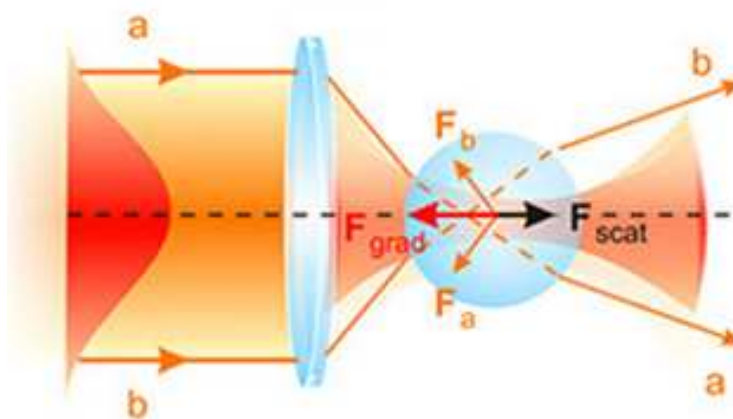


Figura 5.2: **Caso No 1: Pinçamento Óptico.** Aprisionamento da microesfera no foco do feixe de luz, devido ao equilíbrio entre duas forças: força de espalhamento (F_{scat}) e força de gradiente (F_{grad}). Extraída da página “Pinzas ópticas“, disponível no site “<http://www.ariasgonzalez.com/phone/nmo—pinzas-opticas.html>“.

regime é conhecido como limite de Rayleigh e a esfera comporta-se como um dipolo elétrico induzido num campo elétrico. Curiosamente, a força que atua sobre a microesfera é proporcional ao gradiente de intensidade do campo elétrico incidente, isto é, da mesma forma ocorre aprisionamento no foco do feixe, fazendo com que esta técnica seja uma ferramenta poderosa de manipulação em qualquer escala [8, 38].

Outros modelos tem sido desenvolvidos nos últimos anos, por exemplo a teoria MDSA⁺ (Mie Debye Spherical Aberration) proposta por Mazoli, Maia Neto e Nussenzveig da UFRJ [39, 40], que através de pinçamento óptico é possível estimar as forças axiais e transversais que atuam em uma microesfera de raio e índice de refração arbitrário. Esta teoria é o modelo quantitativo mais geral que existe hoje em dia, porque além de ser utilizado para microesferas de qualquer tamanho, permite a medição independente de grandezas utilizadas nos cálculos sem parâmetros ajustáveis, tornando-a um modelo ideal de análise experimental.

5.1.1 Montagem Experimental

A configuração experimental utilizada nas nossas experiências de pinçamento óptico, é mostrado na Fig. 5.3. Na parte superior do esquema, encontramos um laser de fibra dopada com itérbio (IV) que é estimulado por meio do aparelho IPG Photonics, cujo feixe de luz que emerge é caracterizado por ter um comprimento de onda de 1064 nm , potência máxima de $5,8\text{ W}$, perfil gaussiano e operar no modo TEM_{00} .

O feixe de luz tem um caminho óptico delineado por um conjunto de espelhos E_1 e E_2 , que

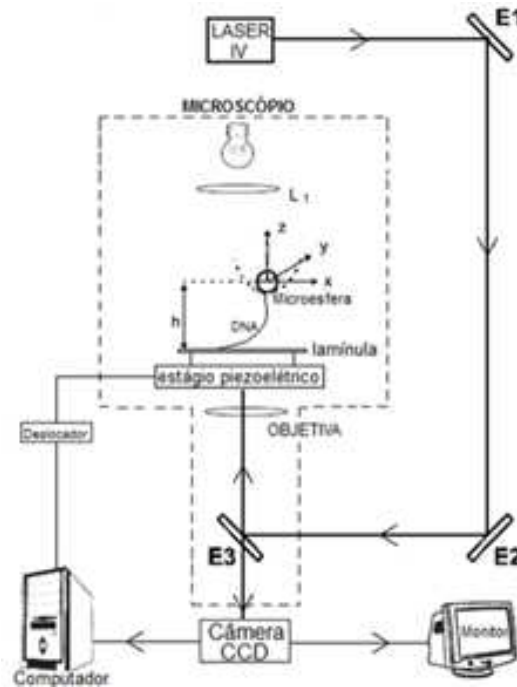


Figura 5.3: **Montagem experimental.** Configuração experimental do laboratório de Física biológica da UFV. [14].

atinge o microscópio por um espelho dicróico E_3 de uma elevada transmitância para a luz visível e alta reflectância para a luz infravermelha. Subsequentemente, uma parte do laser é dirigido para a objetiva do microscópio onde é focalizado para o pinçamento óptico. Por outro lado, a luz do condensador do microscópio é levado para duas câmeras CCD, onde é realizado o acompanhamento do processo de videomicroscopia e armazenamento de dados. As duas câmaras se encontram dirigidas para o monitor de visualização de experimento e o computador, o último controla e dirige o deslocamento do estágio piezoelétrico em nanoescala.

Entre as linhas pontilhadas encontramos um microscópio invertido de referência *Nikon Ti-S*, uma objetiva, um estágio piezoelétrico onde repousa a lamínula, um porta amostras (lamínula) onde encontra-se a solução aquosa de DNA-microesferas e uma lente L_1 que representa o capacitor do sistema de iluminação do porta amostra. A objetiva é caracterizada por ser corrigida no infinito, ter um aumento máximo de $100X$ e uma abertura numérica de $N_A = 1,4$.

5.1.2 Calibração da Pinça Óptica

Para o sucesso nos experimentos de pinçamento óptico, é muito importante conhecer certos parâmetros que servem como padrões de referência nas estimações quantitativas de todos os ex-

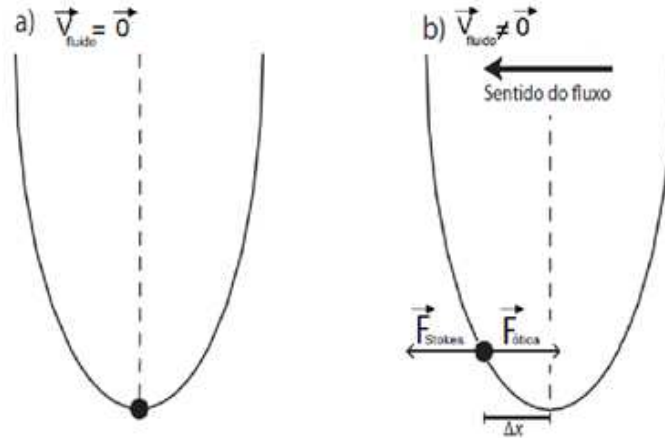


Figura 5.4: **Poço de potencial harmônico.** (a) Estado de equilíbrio inicial da microesfera, antes de estabelecer o fluxo. (b) Estado de equilíbrio final da microesfera devido ao fluxo [14].

perimentos realizados. Um deles é a constante de força, que caracteriza a curvatura do poço de potencial Harmônico gerado pelo feixe de luz focalizado. Esta variável fornece medições de força com alta precisão, sendo esse o principal objetivo da calibração, como veremos na próxima seção.

Embora existam vários métodos para a calibração das pinças ópticas, utilizou-se o método de Stokes, um modelo simples, confiável e fácil de aplicar. Este método leva em conta duas variáveis: a força de arrasto do fluido e o deslocamento do estágio piezoelétrico [50].

Para a estimativa quantitativa da constante de força [7, 14, 38, 50], vamos supor que uma microesfera está presa no foco do laser, isto é, encontra-se dentro de um poço de potencial Harmônico, como é mostrado na Fig. 5.4a. Se o estágio do microscópio começa a se mover a uma velocidade constante, aparecerá uma força de arrasto (F_{stokes}), devido à viscosidade do fluido. Na Fig. 5.4b mostra-se a esfera deslocada de uma distância Δx da posição original, em estado de equilíbrio devido à ação de duas forças: a força de Stokes e a força óptica ($F_{ótica}$) por causa do aprisionamento do feixe focalizado. Assim, sustenta que:

$$\vec{F}_{stokes} = \vec{F}_{ótica} \quad (5.5)$$

Onde o módulo da força de Stokes, está dado por:

$$\vec{F}_{stokes} = \zeta v \quad (5.6)$$

Sendo ζ o coeficiente de atrito sobre a microesfera em solução aquosa e v a velocidade do fluxo em relação à microesfera. Por exemplo, para movimentos paralelos à superfície da lamínula, ζ pode

ser escrito como [7]:

$$\varsigma = 6\Pi\eta a \left(1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 + \dots \right)^{-1} \quad (5.7)$$

Onde a é o raio da microesfera, h a distância do centro da microesfera em relação a lamínula e η a viscosidade do fluxo, o qual depende da temperatura do meio em graus Celsius [50]. Além disso, o movimento do piezoelétrico gera um deslocamento na microesfera com respeito à posição original de equilíbrio, fazendo com que apareça uma força restauradora de tipo Hooke, devido à forma de oscilador harmônico que tem o poço em que encontra-se presa a microesfera, dada por:

$$\vec{F}_{otica} = -k\Delta\vec{x} \quad (5.8)$$

Dessa forma, a equação 5.5 pode ser reescrita como:

$$\varsigma V = -k\Delta x \quad (5.9)$$

E assim, encontramos que a constante de força pode ser estimada pela expressão:

$$k = \frac{\varsigma V}{\Delta x} \quad (5.10)$$

Através de videomicroscopia é determinada o deslocamento Δx , calculando a diferença entre a posição média final e a inicial da microesfera depois de movimentar o estágio, isto é, depois do fluxo ser estabelecido. Por conseguinte, determinando a variação de posição num determinado intervalo de tempo, estabelecemos a velocidade de fluxo em relação a microesfera. Da mesma forma, o coeficiente de atrito (Equações 5.7) é calculado a partir de parâmetros conhecidos, tais como a temperatura do meio ($Tc = 20^\circ C$), o raio ($R = 3 \mu m$) e a altura ($4,43 \mu M$) da microesfera com respeito a lamínula.

5.1.3 Procedimento Experimental

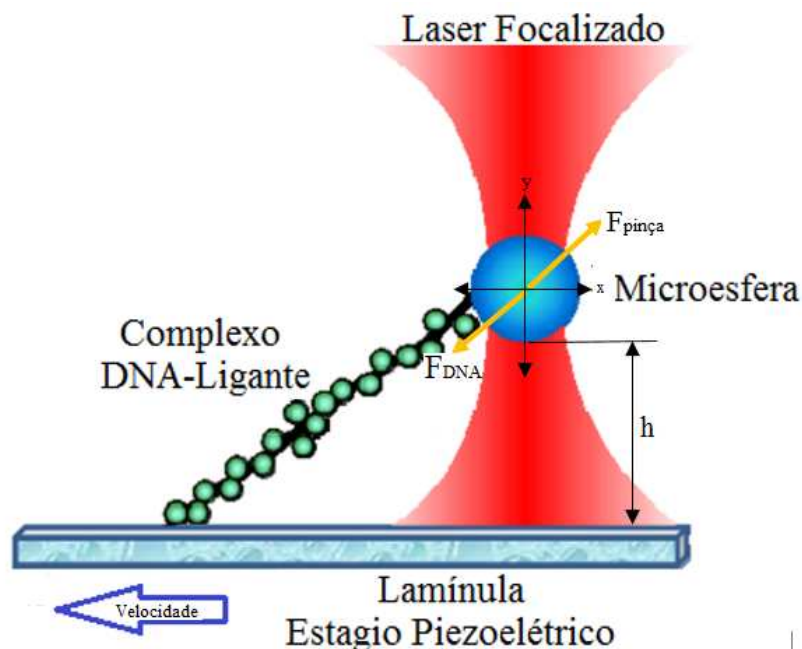


Figura 5.5: **Processo de alongamento do DNA.** Variáveis envolvidas no alongamento de DNA por pinçamento óptico.

Procedimento experimental na pinça óptica e determinação das propriedades mecânicas

Uma das principais vantagens da pinça óptica é, sem dúvida, a manipulação e extensão de moléculas individuais. Conforme mencionado na preparação da amostra, a ideia básica do experimento é grudar uma extremidade do DNA em uma microesfera dielétrica, enquanto a outra extremidade está fixa a lamínula do porta amostras. Subsequentemente a lamínula é movida por um deslocador piezoelétrico que é controlado por computador, enquanto a microesfera é mantida presa no foco do feixe, tal como é mostrado na Fig. 5.5.

Deve-se ter em conta que as forças exercidas sobre a microesfera são baixas, bem como, os alongamentos devem ser realizados a baixas velocidades constantes, para garantir que a força de Stokes seja desprezível e o experimento seja quase estático.

Durante o alongamento do DNA, o módulo da força óptica da pinça é igual ao módulo da força restauradora exercida pelo DNA. Sabendo a constante de força da pinça óptica k e o deslocamento Δx da microesfera no poço, pode-se determinar a força exercida pelo polímero, pela equação 5.8. A extensão do DNA é determinada a partir da velocidade do piezoelétrico e o tempo de experimento.

Assim, é possível construir a curva experimental de força por extensão da molécula de DNA. Finalmente, os dados obtidos são ajustados pela expressão de Marko e Siggia, com o objetivo de abstrair as propriedades mecânicas: comprimento de contorno L e comprimento de persistência A , tal como ilustra-se na Fig. 5.6. Para o tratamento dos dados foi usado o programa Kaleida-Graph.

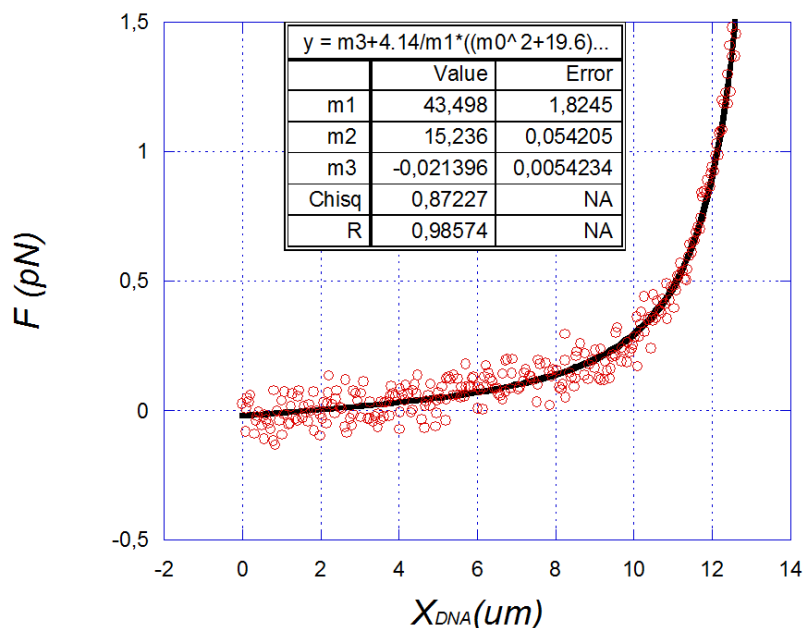


Figura 5.6: **Curva de força de um DNA Padrão** Propriedades mecânicas de um DNA padrão em sua forma nativa: $m1$ representa o comprimento de persistência e $m2$ o comprimento de contorno. A força máxima utilizada está em torno de $1,5pN$.

A busca do DNA não é fácil, no interior da solução são encontradas várias configurações que podem ser detectadas diretamente na câmera do monitor de visualização ou durante o alongamento, tais como: esferas grudadas à superfície, com mais de um DNA, soltas no interstício da solução, conjunto de microesferas ligadas umas as outras, entre outras. Os estiramentos são realizados quantas vezes for necessário. Se houver um DNA com as condições exigidas, este simula um sistema mola-massa e, portanto, a microesfera deve escapar da pinça durante o alongamento, além disso, deve atender as condições de um bacteriófago λ -padrão ($L \sim 16,5 \times 10^{-6} m$ e $A \sim 50 \times 10^{-9} m$), cujas medidas devem ser mantidas por um conjunto de alongamentos consecutivos. No nosso caso, para garantir a confiabilidade do DNA, foram feitos cerca de seis alongamentos por cada molécula de DNA.

Depois de encontrar um DNA com as condições exigidas, em seguida, é realizada a adição em sequência do fármaco na solução. Foram utilizadas oito concentrações diferentes de Berenil que variavam desde $0,5 \mu M$ até $4 \mu M$. Para cada mudança de concentração, foi usada uma micropipeta, que extraia cerca de $60 \mu L$ a $80 \mu L$ de solução original e adicionava em torno de $80 \mu L$ da nova alíquota. Para garantir a mudança na concentração da solução, foram realizados três mudanças consecutivas da mesma alíquota. Em seguida, espera-se cerca de 20 minutos, para que a droga atinja o equilíbrio químico com o DNA. Finalmente são realizados os respectivos alongamentos para

análise e abstração das propriedades mecânicas que vão fornecer através de uma análise estatística as propriedades físico-químicas, cujas informações são pertinentes na visualização do mecanismo de interação do complexo DNA-Berenil.

O mesmo procedimento foi realizado para forças ópticas baixas em soluções salinas altas ($[Na] = 150 \text{ mM}$) e baixas ($[Na] = 10 \text{ mM}$). Além disso, como informação adicional foram realizados experimentos de força máxima aplicada ($6pN$, $10, 5pN$ e $15pN$) em presença de forças iônicas altas e baixas em solução, a fim de analisar as alterações do comprimento de persistência gerados pela variação na potência do laser, que de acordo com estudos recentes [51] fornece informações relevantes para a compreensão dos tipos de interação entre o complexo DNA-Berenil, como será detalhado no próximo capítulo.

Determinação dos parâmetros Físico-químicos

Há um método que foi desenvolvido para determinar os parâmetros físicos-químicos e, conseqüentemente, a isoterma de ligação, conhecendo apenas o comprimento de persistência do complexo e a concentração total de ligante em solução [8]:

Conceitualmente, a curva de comprimento de persistência de um complexo é chamado comprimento de persistência efetiva (A_E) e refere-se à curva gerada pelos comprimentos de persistência testados em cada uma das concentrações da droga. Além disso, cada um dos comportamentos monotônicos representados na curva do comprimento de persistência efetivo, são chamados comprimentos de persistência locais (A_0, A_1, A_2, \dots). Probabilisticamente, o comprimento de persistência efetivo pode ser associado com uma configuração de molas em série:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f(r)}{A_0} + \frac{g(r)}{A_1} + \frac{h(r)}{A_2} + \dots \quad (5.11)$$

Onde $f(r)$, $g(r)$ e $h(r)$ são funções que estão relacionados com a fração de sítios ligados r , isto é, sendo a molécula de DNA uma rede muito extensa, a probabilidade de encontrar um sitio ligado pode ser representado pela fração de sítios ligados r .

Neste sentido, tendo o comprimento de persistência efetivo em função da concentração total de ligante, podemos determinar os parâmetros físico-químicos, que fornecem informação valiosa na caracterização estrutural de nosso complexo DNA-Berenil.

O método consiste em resolver numericamente uma isoterma de ligação adequada. No caso da isoterma de Hill, a fração de sítios ligados r em função da concentração total de ligante, pode ser escrita na forma:

$$x = \frac{r}{r_{max}} = \frac{(k_i C_f)^n}{1 + (k_i C_f)^n} = \frac{[k_i (C_T - r_{max} C_{bp} x)]^n}{1 + [k_i (C_T - r_{max} C_{bp} x)]^n} \quad (5.12)$$

Onde C_{bp} é a concentração de pares de base do DNA na amostra. Sabendo K_i , r_{max} e n , a equação de Hill pode ser resolvida numericamente para x , portanto, foi adaptada a seguinte metodologia:

1. Um valor provisório é atribuído a cada um dos parâmetros físico-químicos: K_i , r_{max} e n .
2. Usando um programa de computador (em nosso caso *MATLAB*), é resolvido numericamente a equação de Hill, obtendo-se o valor de x em termos da concentração total de ligante. Estes últimos dados são usados para ajustar o comprimento de persistência efetivo na equação 6.3 pelo método dos mínimos quadrados.
3. O procedimento anterior é repetido quantas vezes for necessário, até atingir o ajustamento que atenda aos critérios de convergência do método dos mínimos quadrados. Assim, os parâmetros físico-químicos e os comprimentos de persistência locais são obtidos.

No caso do modelo sequencial de ligação, o número de parâmetros ajustáveis é maior, r_{max} , n , K_1 e K_2 :

$$r = \frac{1}{n} \frac{dQ}{dC_f} = \frac{1}{n} \left[\frac{d(1 + k_1[C_T - rC_{bp}] + K_1k_2[C_T - rC_{bp}]^2)}{d(C_T - rC_{bp})} \right] \quad (5.13)$$

Capítulo 6

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Após previa calibração da pinça óptica, foram realizados os experimentos de pinçamento óptico. As curvas de força por extensão da molécula de λ -DNA permitiram abstrair as propriedades mecânicas (comprimento de persistência e de contorno) e, por conseguinte, os parâmetros físico-químicas da interação. Neste capítulo, apresentam-se os resultados obtidos e a discussão realizada de acordo com a literatura atual. De modo a investigar o papel da força iônica na interação λ -DNA-Berenil, os experimentos foram realizados em duas soluções de PBS $[Na] = 150 \text{ mM}$ e PBS $[Na] = 10 \text{ mM}$. Além disso, foram realizados experimentos de força máxima aplicada dentro do regime entrópico para analisar alterações no comprimento de persistência do complexo DNA-Berenil, mudanças que são representativas na compreensão dos tipos de interação entre o λ -DNA e o ligante.

6.1 Análise de resultados do comprimento de persistência

Depois do ajuste das curvas de força por extensão pelo modelo WLC foram obtidas as propriedades mecânicas. Na Fig. 6.1 se mostra o comprimento de persistência A do complexo de λ -DNA-Berenil em função da concentração total do ligante (C_T) na presença de duas soluções salinas diferentes, $[Na] = 150 \text{ mM}$ e $[Na] = 10 \text{ mM}$. Para cada solução salina, foi utilizado o mesmo λ -DNA ao longo do processo e cada comportamento foi o resultado médio no comprimento de persistência de mais de quatro moléculas de DNA diferentes. As barras de erro foram calculados pelo erro padrão da média.

No gráfico, observa-se um aumento no valor de A até certo limite de concentração de ligante, e, em seguida, uma diminuição até atingir a saturação, evidenciando um comportamento de tipo não

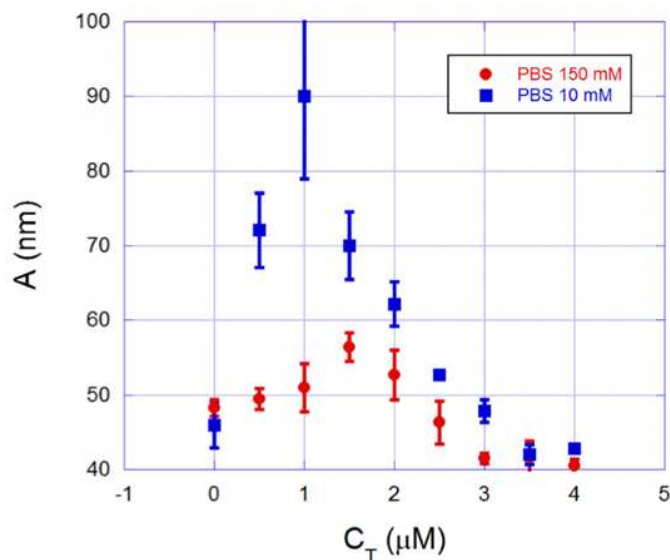


Figura 6.1: **Comprimento de Persistência em função da concentração total de ligante.** Comportamento não monotônico do comprimento de Persistência em função de C_T para duas soluções salinas diferentes: $[Na] = 150 \text{ mM}$ e $[Na] = 10 \text{ mM}$.

monotônico. Esses tipos de comportamentos são exibidos por vários tipos de complexos e geralmente ocorrem quando há uma competição entre dois modos de ligação diferentes [14, 52] ou quando um modo de ligação induz alterações conformacionais na dupla hélice [53].

Para forças iônicas altas, o aumento ocorre de aproximadamente 48 nm a aproximadamente 58 nm , até um limite de concentração de $1,5 \mu\text{M}$ de Berenil. Para forças iônicas baixas, o aumento ocorre de aproximadamente 46 nm a aproximadamente 90 nm , num limite de concentração igual a $1 \mu\text{M}$ de Berenil. Este aumento prolongado no comprimento de persistência sugere a existência de uma possível intercalação, sendo esta mais predominante para forças iônicas baixas. Embora a intercalação possa estar presente, certamente não é o único mecanismo de união já que para outros intercalantes típicos o comportamento no comprimento de persistência é muito diferente, isto é, o nosso comportamento não-monotônico no comprimento de persistência sugere um mecanismo de união misto.

Além disso, observa-se que para forças iônicas elevadas e baixas, a saturação ocorre em concentrações muito baixas de fármaco, em torno de $3,5 \mu\text{M}$. Isto sugere um forte grau de ligação entre o fármaco e a molécula de λ -DNA.

Segundo Reinert (1999), o único modo de ligação entre o ctDNA (DNA de timo de vitela) e o Berenil é a ligação não covalente com a fenda menor do polímero, que é acompanhada por alterações conformacionais na estrutura da dupla hélice, como flexões e desenrolamentos, e afetam diretamente os parâmetros mecânicos. Por outro lado, experimentos de viscosimetria mostram que para baixas concentrações de sal, ocorre um aumento no comprimento de contorno e persistência, evidenciando

uma possível intercalação. Embora estes resultados sejam consistentes com os nossos, existem duas possibilidades:

1. uma ligação mista entre dois tipos de ligação (ligação de fenda e intercalação), que está fortemente relacionado com a força iônica em solução, ou
2. um único modo de ligação (ligação de fenda) acompanhado de alterações conformacionais, como desenrolamentos ou flexões na dupla hélice como produto da ligação com a fenda menor do DNA, a qual gera aumentos nas propriedades mecânicas do complexo.

No caso de um modo de ligação mista, nossos resultados não permitem saber se os modos de ligação são independentes ou acoplados. Existem fármacos que apresentam comportamentos mistos de ligação como a actinomicina D [52,54–59]. Esse composto exhibe dois modos de ligação simultânea, ou seja, uma parte da molécula intercala, enquanto a outra liga em uma das fendas do DNA, por sua vez a daunomicina ou doxorubicina, que além de apresentar intercalação, mostram uma dependência na formação de pequenos autoagregados ao longo da cadeia polimérica do DNA [60]. Por outro lado, encontramos ligantes com modos independentes de ligação mista, como o Hoechst 33258 [14] e β -Ciclodextrina [61], cujos modos de ligação são controlados pela concentração do substrato da amostra [14,61]. No caso do psoralen [62], pode-se controlar seus modos de ligação de forma independente, através da modulação na iluminação da amostra [53,62,63].

6.1.1 Determinação dos parâmetros Físico-químicos da interação

A fim de abstrair e analisar os parâmetros físicos-químicos envolvidos na interação, segundo o capítulo anterior, para um comportamento não monotônico do comprimento de persistência como o nosso, se pode utilizar o modelo estatístico de desordem de dois sítios. Nesse modelo, um sítio local ocupado por um agregado de moléculas de ligante tem probabilidade igual a $\frac{r}{r_{max}}$ enquanto a probabilidade de estar desocupado é de $1 - \frac{r}{r_{max}}$.

O comprimento de persistência efetiva de nosso complexo (Fig. 6.1) sugere uma associação por duas molas entrópicas em série que conseqüentemente estão dados por três comprimentos de persistência locais A_0 , A_1 e A_2 :

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f(r)}{A_0} + \frac{g(r)}{A_1} + \frac{h(r)}{A_2} \quad (6.1)$$

Onde,

1. $f(r)$ é a probabilidade de ter dois sítios desocupados, $f(r) = (1 - \frac{r}{r_{max}})^2$,

2. $g(r)$ é a probabilidade de ter dois sítios consecutivos, um ocupado e outro desocupado, $g(r) = 2\left(\frac{r}{r_{max}}\right)\left(1 - \frac{r}{r_{max}}\right)$, e
3. $h(r)$ é a probabilidade de ter dois sítios consecutivos ocupados, $h(r) = \left(\frac{r}{r_{max}}\right)^2$,

assim, o comprimento de persistência efetiva A_E pode ser escrito da forma:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{\left(1 - \frac{r}{r_{max}}\right)^2}{A_0} + 2\frac{\left(\frac{r}{r_{max}}\right)\left(1 - \frac{r}{r_{max}}\right)}{A_1} + \frac{\left(\frac{r}{r_{max}}\right)^2}{A_2} \quad (6.2)$$

Finalmente, para determinar os parâmetros físicos-químicos envolvidos na interação do nosso complexo, a fração de sítios ligados r deve ser representada mediante uma isoterma de ligação adequada. Para esses fins foi utilizada a isoterma de Hill e a isoterma de ligação sequencial.

Forças iônicas altas (Solução com PBS, [Na]=150 mM)

O primeiro teste foi a isotérma de Hill. Geralmente, para sistemas DNA-Ligantes que têm um único modo de ligação, é utilizada a isoterma de Hill (simple Hill), a qual tem uma única constante de associação. Para os sistemas DNA-ligantes que possuem dois modos de ligação acoplados e cuja interação ocorre de forma simultânea, utiliza-se uma isotérma de Hill como uma soma de dois processos de Hill (Duplo Hill), a qual é caracterizada por duas constantes de associação, correspondentes a cada modo de ligação.

Os três ajustes mencionados são apresentados na Fig. 6.2. Como é mostrado na figura, o modelo de ligação sequencial não ajusta-se aos dados experimentais obtidos, por conseguinte, não é um modelo ideal para a análise da curva experimental. Por outro lado, no caso do modelo de Hill, o ajuste feito pelas duas isotérmias (simple Hill e duplo Hill) se encaixa com precisão aos nossos dados experimentais. De fato, os parâmetros físicos-químicos captados pelas duas isotérmias são iguais, o que significa que existe apenas um modo de ligação efetivo.

Os parâmetros físicos-químicos obtidos são: $K = (7,9 \pm 0,7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = (7 \pm 2,5)$, $A_1 = (75 \pm 7) \text{ nm}$, $A_2 = (41 \pm 1) \text{ nm}$ e $r_{max} = (0,4 \pm 0,1)$. Estes resultados indicam que a constante de associação é consistente com outros resultados [32, 64, 65]. Seu valor confirma a forte ligação entre o Berenil e o λ -DNA, tal como mencionado acima. Em relação ao coeficiente de Hill, o modo de ligação é altamente cooperativo indicando que, devido à elevada força iônica na solução, a interação eletrostática repulsiva entre cada molécula não impede a ligação do seguinte, gerando

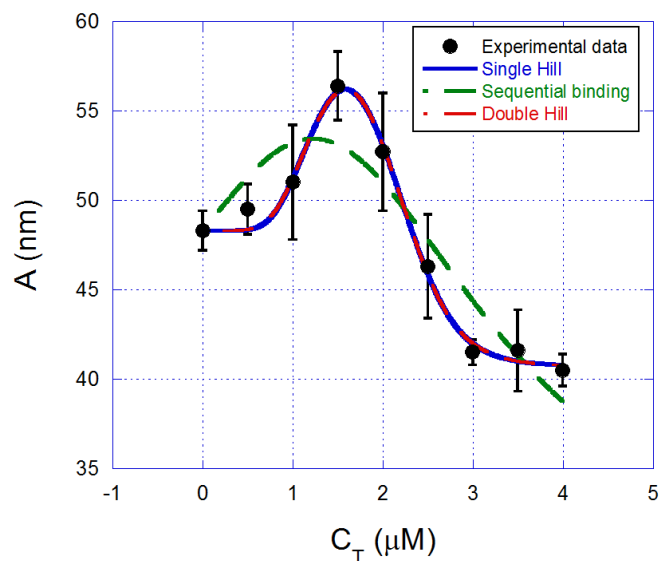


Figura 6.2: Ajuste do comprimento de Persistência para forças iônicas altas. Ajuste de A pela isoterma simple Hill, Dupla Hill e sequencial de ligação. Verifica-se um único modo de ligação de tipo altamente cooperativo.

uma ligação simultânea de ~ 7 moléculas de fármaco ao longo da dupla hélice do λ -DNA. O local de ligação seria preferencialmente a fenda menor do λ -DNA, segundo resultados conduzidos por RMN e cristalografia de raios X [25,26]. Estes resultados são muito importantes, porque, devido ao seu elevado grau de cooperatividade, o mecanismo de união sugerido na interação do complexo λ -DNA-Berenil para forças iônicas altas é a ligação não covalente com a fenda menor do λ -DNA, como relatado por Reinert e Pilch et al [32,66].

O parâmetro r_{max} indica que para uma concentração de $\sim 3\mu\text{M}$ de ligante livre há uma saturação quando aproximadamente 40% da molécula de DNA está ligada pelo Berenil, como relatado por outros investigadores [32,64]. Também os resultados da persistência local A_1 e A_2 sugerem que para baixas concentrações de Berenil ($C_T < 1,5 \mu\text{M}$) aumenta a rigidez durante o alongamento, enquanto que para concentrações elevadas de Berenil ($C_T > 1,5 \mu\text{M}$) a rigidez tende a diminuir, como é mostrado na Fig. 6.1, que mostra o ajuste da persistência efetiva em função da concentração total de ligante.

Forças iônicas baixas (Solução com PBS, $[\text{Na}] = 10 \text{ mM}$)

Neste caso, verificou-se que a isotérma de Hill mostra um comportamento idêntico com a isotérma dupla de hill. Além disso, tanto o modelo de Hill como o modelo de ligação sequencial encaixam em conformidade com os nossos dados experimentais, tal como ilustrado na Fig. 6.3.

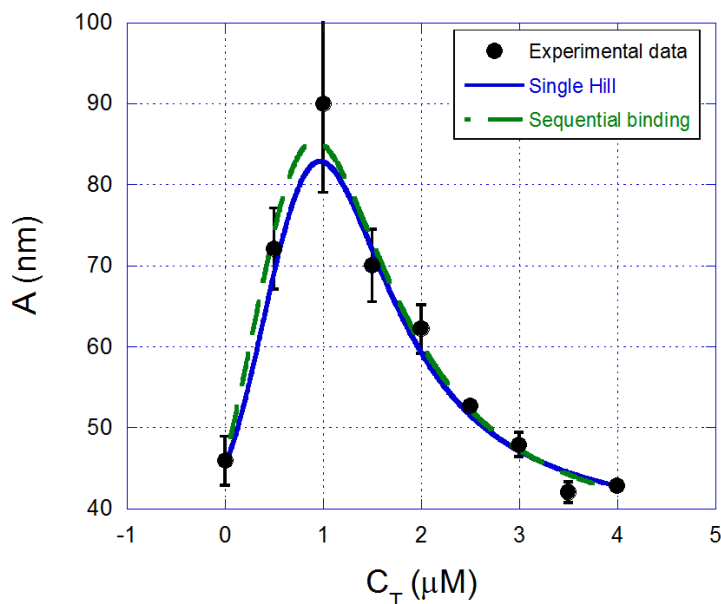


Figura 6.3: **Ajuste do comprimento de persistência para forças iônicas baixas.** Ajuste do comprimento de persistência pela isoterma de Hill (simple Hill) e sequencial de ligação em função da concentração total de ligante.

De acordo com o modelo de ligação sequencial, as constantes de afinidade K_1 e K_2 são iguais, indicando mais uma vez que existe uma forma única de ligação. Além disso, o fato de que os nossos resultados poderem ser ajustados por essa isotérma, significa que o modo de ligação é do tipo não cooperativo, isto é, moléculas de ligante individuais se ligam ao DNA quase sequencialmente.

Segundo o modelo de ligação sequencial, as constantes de afinidade são: $K_1 = K_2 = (1,3 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e os parâmetros pelo modelo de Hill estão dados por: $K = (1,7 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n = (1,6 \pm 0,6)$ e $r_{max} = (0,4 \pm 0,1)$. Embora a constante de afinidade seja cerca de duas vezes a constante de afinidade para forças iônicas altas, a cooperatividade entre as moléculas de Berenil diminui fortemente, atingindo um processo de tipo não cooperativo, conforme identificado no coeficiente de Hill. Aparentemente, devido à carga total da molécula de Berenil e a baixa força iônica em solução, a interação eletrostática repulsiva entre cada molécula dificulta a ligação da seguinte, evitando a ligação simultânea de várias moléculas.

Tal como no caso anterior, o parâmetro r_{max} indica que aproximadamente 40% da molécula de λ -DNA está ocupada por Berenil na saturação. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ligação na interação do complexo λ -DNA-Berenil para forças iônicas baixas é, possivelmente a intercalação [8, 14].

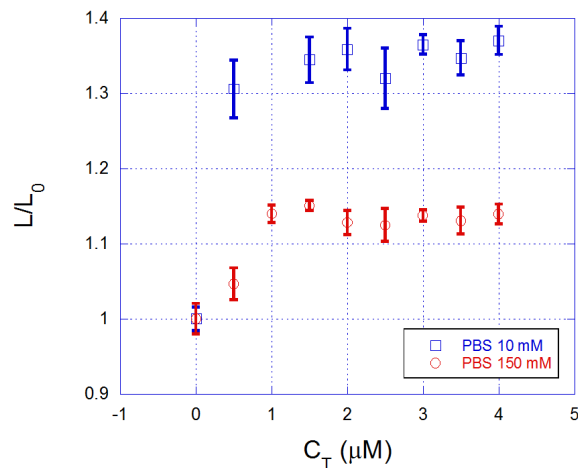


Figura 6.4: **Comprimento de contorno em função da concentração total de ligante.** Variação de L em função de C_T para duas forças iônicas diferentes: $[Na] = 150\text{mM}$ e $[Na] = 10\text{mM}$.

6.2 Análise de resultados do comprimento de contorno

Outra propriedade mecânica abstraída das curvas força versus extensão é o comprimento de contorno L . Na Fig.6.4 mostra-se o comportamento normalizado do comprimento de contorno do complexo λ -DNA-Berenil em função da concentração total de ligante, para duas forças iônicas opostas, $[Na] = 150\text{mM}$ e $[Na] = 10\text{mM}$. A normalização de L foi realizada com referência ao comprimento de contorno de um DNA puro (sem ligante), correspondendo aproximadamente a $16,5\ \mu\text{m}$.

De acordo com a Fig. 6.4, evidencia-se um comportamento monotônico crescente, que satura depois de uma concentração aproximada de $1\ \mu\text{M}$ de Berenil, novamente indicando a forte ligação entre o fármaco e o DNA. Para forças iônicas baixas o aumento é mais longo, atingindo a saturação em torno de $L/L_o = 1,35$. No entanto, para forças iônicas elevadas, ocorre a saturação após $L/L_o = 1,14$ aproximadamente.

Este aumento no comprimento de contorno sugere novamente duas possibilidades: que a intercalação desempenha um papel importante na interação do nosso complexo de λ -DNA-Berenil, tal como referido por Pilch et al, e outros complexos com comportamento é semelhante [53, 67, 68], ou que este aumento é o resultado de mudanças conformacionais geradas pela ligação não covalente com a fenda menor do DNA, como é relatado por Reinert [66].

Para analisar a intercalação como possível solução, de acordo com o capítulo 3, o aumento

máximo induzido por uma molécula intercalada δ_{max} , entre os pares de base está dado por:

$$\delta_{max} = \frac{\Delta\Theta_{max}}{r_{max}} \quad (6.3)$$

Geralmente, o espaçamento natural entre dois pares de base consecutivos é de $\Delta = 0,34 \text{ nm}$. Uma vez que a fração de sítios ligados na saturação (r_{max}) foi de 0,4 para ambas resistências iônicas, então, se tem que para resistências iônicas altas, segundo a Fig. 6.4 o aumento relativo máximo de L é de $\Theta_{max} = 0,14 \text{ nm}$. Portanto, o aumento máximo induzido δ_{max} , segundo a equação 6.3 é de $\sim 0,12 \text{ nm}$. No caso de forças iônicas baixas, $\Theta_{max} = 0,35 \text{ nm}$, e por consequência, $\delta_{max} = 0,3 \text{ nm}$. Este resultado é muito interessante, porque mostra que, para forças iônicas baixas, o aumento induzido é compatível com o gerado por um intercalante típico. Enquanto para forças iônicas altas o aumento induzido é menor, e concorda plenamente com o valor obtido por Reinert na interação do complexo ctDNA-Berenil.

Além disso, o fato de que para forças iônicas baixas, o processo de ligação é de tipo não cooperativo, ou seja, cada molécula é ligada de forma independente ao longo da rede do polímero, indicando fortemente que o modo de ligação predominante para esta força iônica é a intercalação. Por outro lado, os resultados das figuras 6.1 e 6.4 não concordam totalmente com um intercalante puro, sugerindo uma pequena interferência de um segundo modo de ligação.

No caso de forças iônicas elevadas, o processo de ligação é altamente cooperativo, portanto, o modo de ligação predominante é, a ligação de fenda. Embora haja um ligeiro aumento no comprimento de contorno, os nossos resultados não podem discriminar se, de fato, é uma intercalação parcial pelas moléculas de Berenil, como está expresso na pesquisa de Pilch et al, que sugere uma ligação mista entre a ligação de fenda e intercalação parcial.

Assim, por meio de uma compilação dos resultados até agora obtidos por Pilch et al, Reinert, Zhou e os nossos resultados, propomos o seguinte mecanismo de interação para o complexo DNA-Berenil:

O mecanismo de interação do complexo λ -DNA-Berenil encontra-se estabelecido mediante a ligação mista e acoplada entre a ligação de fenda (modo de ligação primária) e intercalação parcial, este último dependente da força iônica em solução e causadora dos aumentos no comprimento de contorno do polímero (0,12 para $[Na]=150 \text{ mM}$ e 0,3 para $[Na]=10 \text{ mM}$). Para forças iônicas altas, a intercalação parcial é fraca, e, o modo de ligação predominante é a ligação não covalente com a fenda menor do λ -DNA. Por outro lado, para forças iônicas baixas, sobressai a intercalação parcial.

6.3 Análise dos experimentos de Força Máxima Aplicada

De acordo com Bazoni et al, a aplicação de forças elevadas sobre complexos λ -DNA-intercalantes geram mudanças no seu comprimento de persistência que estão diretamente relacionados com possíveis desnaturações parciais ao longo da estrutura do polímero. Esta análise é de grande importância para o nosso trabalho, porque nos permite verificar a interferência da intercalação no mecanismo de ligação do nosso complexo λ -DNA-Berenil.

O protocolo experimental é semelhante ao que tinha-se trabalhado. Para três potências diferentes do laser, abstraem-se o comprimento de contorno e o comprimento de persistência do ajuste experimental feito pelo modelo WLC sobre a curva de força por extensão do complexo λ -DNA-Berenil para determinada concentração de droga. Como discutido acima, a potência do laser está diretamente relacionado com a força máxima de aprisionamento e, portanto, com a constante de força k . Nesta ordem de ideias, se tem realizado medições para três valores diferentes de k , $(6,2 \pm 0,3) pN/\mu m$, $(10,9 \pm 0,5) pN/\mu m$ e $(15,5 \pm 0,8) pN/\mu m$, que correspondem a 6, 10,5 e 15 pN aproximadamente. Cada valor de k foi obtido mediante a calibração da pinça óptica pelo método de Stokes e foi modificada através da variação da potência de saída do laser utilizando uma série de filtros colocados ao longo do percurso óptico.

Na Fig. 6.5 mostra-se o comprimento de persistência dos complexos λ -DNA-Berenil em função da força máxima aplicada para duas soluções salinas diferentes. No caso de forças iônicas elevadas, a concentração de fármaco foi de $1,5 \mu M$, enquanto que para forças iônicas baixas, a concentração de Berenil foi de $1 \mu M$. De acordo com a Fig. 6.1, cada concentração corresponde ao ponto de inflexão máxima na curva, a qual determina a transição na rigidez do polímero durante a interação.

Como é mostrado na Fig. 6.5 para forças iônicas baixas evidencia-se uma queda monotônica no comprimento de persistência do complexo λ -DNA-Berenil, como função da força máxima aplicada. Esse mesmo comportamento foi relatado por Bazoni no caso de dois intercalantes típicos, a doxorubicina e o Brometo de Etídio. No caso de forças iônicas elevadas, o comprimento de persistência não apresenta mudanças significativas dentro das barras de erro, tal e como o relata Bazoni (2015) et al, ao analisar a dependência da força máxima em moléculas de λ -DNA sem farmaco ligado (λ -DNA puro). Foram feitos outros experimentos para um par de concentrações diferentes de fármaco, mostrando o mesmo comportamento fortalecendo assim, o mecanismo de interação proposto por nós.

O comportamento exibido pelo comprimento de persistência é dependente da força aplicada. Segundo Rocha e Bazoni, este comportamento pode ser interpretado como uma desnaturação parcial da molécula de DNA, produto do rompimento localizado de algumas ligações de hidrogênio, induzidos previamente pela intercalação de moléculas de ligante ao longo da dupla hélice do polímero. Geralmente, estas quebras ocorrem aleatoriamente em forma de espaços vazios ao longo do DNA, conhecidos como bolhas de desnaturação. Assim, essas bolhas contribuem com a queda no

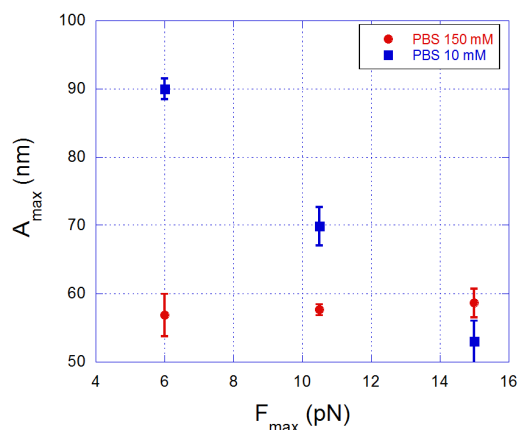


Figura 6.5: **Varição do comprimento de persistência máxima em função da força máxima aplicada.** Variações no comprimento de persistência dos complexos λ -DNA-Berenil em função da força máxima aplicada para duas soluções salinas diferentes: $[Na] = 150mM$ e $[Na] = 10mM$.

comprimento de persistência local e efetiva do complexo.

Na Fig. 6.6 encontra-se a relação entre o comprimento de contorno L dos complexos λ -DNA-Berenil e a força máxima aplicada, para duas forças iônicas, $[Na] = 150mM$ e $[Na] = 10mM$. É claro que em ambas situações, L não apresenta alterações significativas dentro das barras de erro, como reportado por Bazoni et al, para a interação com doxorrubicina, Brometo de etídio e para a molécula de λ -DNA sem fármaco ligado (λ -DNA puro). Assim, parece que o comprimento de contorno é independente da força aplicada.

Como informação complementar, para forças iônicas baixas, foram realizados experimentos de força alta, invertendo a ordem das forças máximas aplicadas ($15pN$, $10,5pN$ e $6pN$). Para intercalantes típicos como a doxorrubicina e o Brometo de etídio, quando uma força inicial máxima é aplicada, esta causa uma desnaturação parcial máxima. Se uma segunda força de módulo inferior é aplicada, esta força será independente das alterações no comprimento de persistência do complexo, como é relatado por Bazoni et al. Segundo a nossa experiência, de acordo com a Fig. 6.7 verificou-se que, na verdade, o comprimento de persistência experimenta uma queda abrupta para uma força máxima de $15pN$. Embora para $10,5pN$ não ocorra mudança representativa, um ligeiro aumento é evidente no comprimento de persistência para $6pN$. Uma vez que o comportamento é quase semelhante ao relatado na literatura, sugere-se que a pequena alteração para $6pN$, é devido à interferência de um segundo modo de união, que embora não seja dominante, poderia chegar a ter um efeito sobre o comportamento do complexo.

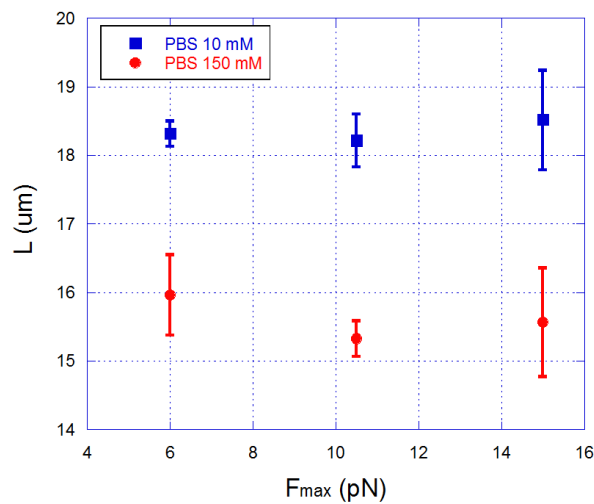


Figura 6.6: **Variação do comprimento de contorno em função da força máxima aplicada.** Variações no comprimento de contorno dos complexos λ -DNA-Berenil em função da força máxima aplicada para duas soluções salinas diferentes: $[Na] = 150mM$ e $[Na] = 10mM$.

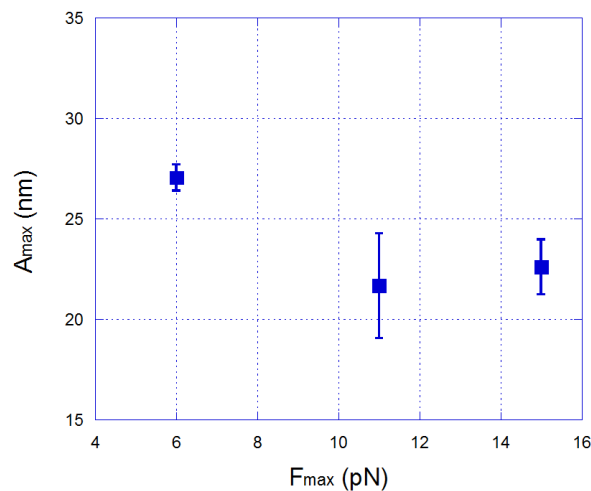


Figura 6.7: **Invertendo a potencia: Variação do comprimento de persistência máximo em função da forma máxima aplicada.** Variações no comprimento de persistência devido á inversão da força máxima aplicada (de maior a menor magnitude) para forças iônicas baixas.

Capítulo 7

Conclusões

Mediante experimento de pinçamento óptico foram realizados alongamentos de molécula única do complexo DNA-Berenil no regime entrópico de baixas e máximas forças aplicadas. A partir do ajuste da curva de força por extensão, foram extraídas as propriedades mecânicas, comprimento de contorno e comprimento de persistência para diferentes concentrações de Berenil.

No caso de forças baixas ($1,5 \text{ pN}$), para forças iônicas altas e baixas, constatou-se que a variação do comprimento de persistência apresenta um comportamento não monotônico, crescente até uma concentração de $1,5 \mu\text{M}$ para forças iônicas elevadas e $1 \mu\text{M}$ para força iônicas baixas e, em seguida, decrescente até uma concentração de $3,5 \mu\text{M}$, onde a saturação é atingida. Além disso, um comportamento monotonicamente crescente no comprimento de contorno do complexo foi registado, que satura para certa concentração de Berenil ($1,5 \mu\text{M}$ a elevadas resistências iônicas, $1 \mu\text{M}$ de força iônica baixa). Nas forças iônicas baixas o aumento no comprimento de persistência e contorno é maior, que indica que seja resultado de uma intercalação parcial do ligante.

A partir de uma metodologia baseada no modelo estatístico de desordem de dois sítios e uma isoterma de ligação adequada, no nosso caso isoterma de Hill, foram obtidos as propriedades físico-químicas da interação (constante de afinidade, grau de cooperatividade, fração de sítios ligados na saturação) a partir do comprimento de persistência do complexo. Estes resultados mostram que os modos de ligação do complexo λ -DNA-Berenil, ligação de fenda e intercalação, podem ser modulados alterando a força iônica em solução. Para concentrações iônicas elevadas ($[Na] = 150 \text{ mM}$), o modo de ligação entre o Berenil e o λ -DNA, é uma ligação não covalente com a fenda menor, sendo o modo de ligação dominante na interação. Por outro lado, para as concentrações iônicas baixas ($[Na] = 10 \text{ mM}$), o ligante também intercala parcialmente com a dupla hélice, tal como demonstrado não só pela análise por pinçamento óptico, mas também por outras técnicas experimentais, tais como fluorescência, espectropolarimetria por dicroísmo circular, viscosimetria, cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear, entre outros [24–26, 32, 66, 74].

No caso de forças máximas dentro do regime entrópico, foram aplicadas três forças de 6, 10, 5 e

15 pN ao complexo DNA-Berenil para concentrações de ligante de 1,5 μM , para forças iônicas altas e de 1 μM para forças iônicas baixas respectivamente. Em altas forças iônicas, o comprimento de persistência do complexo é independente da força, no entanto, para baixas concentrações iônicas, o comprimento de persistência apresenta uma queda, produto da desnaturação parcial do polímero devido à força máxima aplicada. Em relação ao comprimento de contorno, verificou-se ser independente da força aplicada. O comportamento apresentado para forças iônicas baixas é semelhante ao de outros fármacos tais como doxorubicina e brometo de etídio, considerados intercalantes típicos. Essa observação reforça a proposta de que, para forças iônicas baixas, o complexo experimenta uma intercalação parcial por parte do ligante.

Como perspectivas, esta metodologia pode ser aplicada no caso de outros complexos que experimentam vários modos de ligação, especialmente aqueles ligantes cuja intercalação faz parte desses modos de ligação.

Além disso, se poderiam aplicar outras técnicas experimentais (espectroscopia de absorção, espalhamento de luz, espectropolarimetria e ressonância magnética nuclear) para o análise estrutural do complexo λ -DNA-Berenil em diferentes condições iônicas. Este análise estrutural permitira identificar os sítios de ligação específicos ao longo do polímero produto da intercalação parcial do fármaco. Até agora é desconhecido o sítio preferencial onde ocorre a intercalação, ao igual que as mudanças conformacionais do complexo, produto dos câmbios na força iônica em solução.

Embora o análise foi feito para o complexo DNA-Berenil, seria ideal desenvolver um protocolo de análise para a interação do berenil dentro e fora do núcleo celular.

Finalmente como perspectiva pessoal, seria importante focalizar todos os estudos recebidos ao longo destes dois anos, ao desenvolvimento de novos projetos no campo da biologia molecular, a biofísica e a engenharia genética. Embora o pinçamento óptico é relativamente novo, ainda não é muito conhecido em latinoamérica. Por isso, atualmente é importante a criação de novos grupos de pesquisa que ajudem ao desenvolvimento deste campo de estudo, que tem virado de grande importância no desenho e produção de fármacos.

Capítulo 8

Apêndice A: Artigo aceito para publicação

Neste apêndice apresentamos o artigo “*Unraveling the physical chemistry and the mixed binding modes of complex DNA ligands by single molecule stretching experiments*” aceito para publicação na revista RSC Advances da Royal Society of Chemistry na data de 29/10/2016 durante execução dos trabalhos de mestrado.

RSC Advances



PAPER

Unraveling the physical chemistry and the mixed binding modes of complex DNA ligands by single molecule stretching experiments

W. F. P. Bernal, E. F. Silva and M. S. Rocha*

E Cite this: DOI: 10.1039/c6ra22580h

E

Received 14th September 2016
Accepted 29th October 2016

DOI: 10.1039/c6ra22580h

www.rsc.org/advances

In this work we present a complete methodology to unravel the physical chemistry and the mixed binding modes of complex DNA ligands. Single molecule stretching experiments were performed with complexes formed between a DNA binding drug that exhibits multiple mixed binding modes (Berenil) and the biopolymer. From these experiments we determine the changes of the two basic mechanical properties, the contour and persistence lengths, as a function of the drug concentration in the sample. Combining a modeling analysis for the two mechanical properties, we were able to extract the physicochemical parameters of the interaction and to determine the effective binding mechanisms. In particular, we have shown that in this case the binding modes can be modulated by changing the ionic strength of the surrounding buffer: for high ionic strengths (150 mM), Berenil behaves as a typical minor groove ligand in its interaction with λ -DNA; while, for low ionic strengths (10 mM), the drug also partially intercalates into the double-helix. The methodology developed in the present analysis can be promptly applied to other complex DNA ligands, therefore allowing one to investigate and decouple different binding mechanisms.

1 Introduction

DNA can interact with small molecules such as drugs and other types of ligands in many different ways. Classic intercalation, for instance, is characterized by the insertion of a flat aromatic molecule between two adjacent DNA base pairs. Such process induces strong structural perturbations on the double-helix structure, increasing the DNA contour length and unwinding the double-helix.^{1–4} Groove binding, on the other hand, is usually characterized by a combination of electrostatic, van der Waals and hydrogen bonds between the ligand molecules and the DNA minor or major groove floor.^{5,7} This kind of interaction can also induce structural perturbations on the double-helix, such as bendings and twists, depending on the structure and on the net charge of the ligand. Finally, ligands such as some platinum-based compounds^{8–11} and drugs from the family of furcoumarins^{12–14} can also form covalent bonds with the DNA base-pairs.

There is also a considerable number of ligands that can interact with DNA by multiple mixed binding modes, for example, combining intercalation and groove binding. In some cases the ligand molecule has distinct portions which bind to DNA by different modes.^{15–22} In other cases there is only a single binding mode for the entire ligand molecule, which can be changed upon determined conditions such as the type of

surrounding buffer and the DNA base-pair sequence.^{23,24} Some studies have suggested that there is a correlation between ligands that exhibit multiple mixed binding modes and those that exhibit anticancer activity by inhibiting the activity of topoisomerases.^{25,26} Therefore, there is a considerable interest in identifying and characterizing such types of ligands and their interactions with the DNA molecule.

Berenil [1,3-bis(4'-aminophenyl) triazene] (Fig. 1), also known as Diminazen or Azidin, is a compound used to treat some animal diseases as an antitrypanosomal or antiprotozoal agent. In the past it was classified as a typical minor groove binder,^{27,28} but some studies have pointed that it can also intercalate at certain DNA sequences,^{29,30} although the intrinsic details about the coupling of these binding modes remain unknown.^{28,29} In addition, all the studies concerning the DNA–Berenil interaction were performed using ensemble-averaging techniques such as microcalorimetry, viscometry, and various optical spectroscopies.^{29–31} To the best of our knowledge, a single molecule study on the DNA–Berenil interaction is lacking. Such kind of study is important because it gives

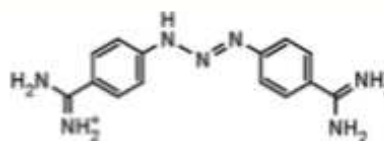


Fig. 1 Chemical structure of the Berenil molecule.

Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. E-mail: marcos.rocha@ufv.br; Fax: +55-31-3899-3463; Tel: +55-31-3899-3399

insights on the mechanical behavior of individual DNA–ligand complexes, from where the relevant physicochemical properties of the interaction can be extracted.²³ In addition, such kind of study can be used to identify and decouple different binding modes of a ligand.^{24–25}

In order to get new insights on the understanding of DNA interactions with complex ligands that exhibit multiple mixed binding modes, here we have used optical tweezers to perform single molecule stretching experiments with λ -DNA–Berenil complexes at various ligand concentrations, in order to determine the effects of Berenil binding on the mechanical properties of the DNA molecule (contour and persistence lengths). Combining a modeling analysis for these two properties, we were able to: (a) extract the physicochemical parameters of the interaction (binding constants, cooperativity degree, etc.); (b) determine the effective binding mechanisms; and (c) determine the role of the buffer ionic strength on the interaction. Such methodology can be promptly applied to other complex DNA ligands, therefore allowing one to investigate and decouple different binding mechanisms.

2 Materials and methods

The samples in this work consist of λ -DNA molecules (New England Biolabs Cat. N3011) end-labeled with biotin in a Phosphate Buffered Saline (PBS) solution. Berenil was purchased from Sigma-Aldrich (Cat. D7770) and used without further purification. We have carried all the experiments in two different PBS solutions with $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ and $[\text{Na}] = 10 \text{ mM}$ in order to investigate the role of the ionic strength on the Berenil interaction with λ -DNA. The sample chamber consists of an o-ring glued in the surface of a glass coverslip, where the working solution is deposited. One end of the DNA molecules is attached to the coverslip surface, which is coated with streptavidin,²⁶ while the other end is attached to a streptavidin-coated polystyrene bead with a diameter of $3 \mu\text{m}$ (Bangs Labs Cat. CP01N).

Our optical tweezers consist of a 1064 nm ytterbium-doped fiber laser (IPG Photonics) operating in the TEM₀₀ mode, mounted on a Nikon Ti-S inverted microscope with a 100 \times NA 1.4 objective. The tweezers is previously calibrated by using the Stokes force calibration procedure before the experiments. We use a very soft optical tweezers, with a trap stiffness $\kappa = (2.8 \pm 0.2) \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, in order to perform high resolution measurements in the low-force regime ($<5 \text{ pN}$). Once calibrated, the tweezers is used to trap the polystyrene bead attached to a DNA molecule. By moving the microscope stage using a piezoelectric actuator, we stretch the DNA while monitoring the changes of the bead position in the tweezers' potential well, using video-microscopy. In order to guarantee that the DNA–Berenil interaction will not be disturbed by using the tweezers, we limit the maximum stretching forces to $\sim 2 \text{ pN}$, working therefore within the entropic regime. The Marko–Siggia worm-like chain (WLC)²⁷ expression for the entropic force is then used to fit the experimental data and to extract the basic mechanical parameters: the persistence length A and the contour length L .

Before adding the drug, the bare DNA molecule chosen to perform the experiments is carefully tested by performing at least 6 repeated stretching measurements in order to obtain the average values and the error bars (standard error of the mean) of the mechanical properties. The results obtained are $A_0 = (48.3 \pm 1.1) \text{ nm}$ and $L_0 = (16.8 \pm 0.4) \mu\text{m}$ in PBS 150 mM; and $A_0 = (45.9 \pm 3.0) \text{ nm}$ and $L_0 = (16.4 \pm 0.3) \mu\text{m}$ in PBS 10 mM. The Berenil concentration in the sample chamber was then changed by using micropipettes, maintaining the same DNA molecule trapped by the tweezers. We wait ~ 30 minutes for drug equilibration with DNA. We have found that this time interval is sufficient for the complexes to achieve the chemical equilibrium, verifying that the mechanical properties stabilizes at their equilibrium values after such time. Thus, we determine the average mechanical properties and the error bars of this particular λ -DNA–Berenil complex at the chosen Berenil concentration, by performing 6 repeated stretching experiments. Then, the series of stretching experiments were repeated scanning various Berenil concentrations. Finally, in order to evaluate the variability of the results over different DNA molecules, we use different samples to repeat the entire experiment (scanning all the chosen concentrations) for 4 different DNA molecules. The results and error bars reported below in Fig. 4 and 5 for the mechanical properties are averages over these 4 different DNA molecules. All experiments were carried out at room temperature (23 °C). More details about the experimental methods and procedures can be found in ref. 23.

3 Results and discussion

In Fig. 2 we show some representative force–extension curves obtained for three different Berenil concentrations in the PBS 150 mM buffer. The fittings to the WLC model are also shown (solid lines). Fig. 3 shows the similar result obtained in the PBS 10 mM buffer. Berenil affects both the contour and persistence lengths of the DNA molecule upon binding, which can be observed by analyzing the shape of the force–extension curves.

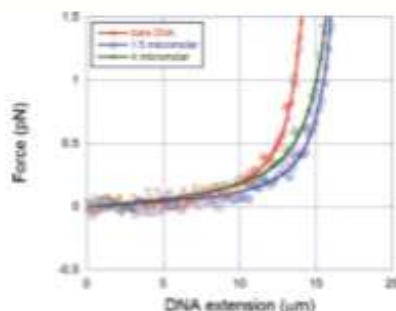


Fig. 2 Representative force–extension curves of the DNA–Berenil complexes obtained for three different Berenil concentrations in the PBS 150 mM buffer. The fittings to the WLC model are also shown (solid lines).

Paper

RSC Advances

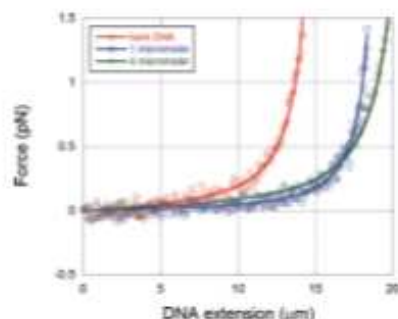


Fig. 3 Representative force–extension curves of the DNA–Berenil complexes obtained for three different Berenil concentrations in the PBS 10 mM buffer. The fittings to the WLC model are also shown (solid lines).

In Fig. 4 we show the behavior of the average contour length L of the λ -DNA–Berenil complexes (normalized by the bare λ -DNA value L_0) as a function of the Berenil concentration in the sample C_T , obtained for the two ionic strengths used. Observe that the contour length presents a simple monotonic increase, saturating at $L/L_0 \sim 1.14$ for $C_T > 1 \mu\text{M}$ in the PBS 150 mM buffer; and at $L/L_0 \sim 1.35$, also for $C_T > 1 \mu\text{M}$, in the PBS 10 mM buffer. Such behavior suggests that intercalative binding possibly plays a role in this system, since a nearly similar behavior of the contour length is usually verified for intercalating ligands.^{22,29} Nevertheless, such behavior can also be related to possible changes on the DNA solenoidal tertiary structure caused by groove binding of the ligand, as suggested by Reinert.²¹

In Fig. 5 we show the behavior of the average persistence length A for the same λ -DNA–Berenil complexes as a function of C_T , obtained in both buffers. Observe that this mechanical parameter exhibits a non-monotonic behavior, increasing from the bare DNA result until reaching a certain maximum value,

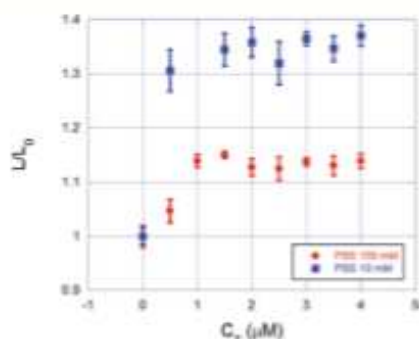


Fig. 4 Contour length L of the λ -DNA–Berenil complexes (normalized by the bare λ -DNA value L_0) as a function of the Berenil concentration in the sample C_T , obtained both in PBS 150 mM (red circles) and PBS 10 mM (blue squares).

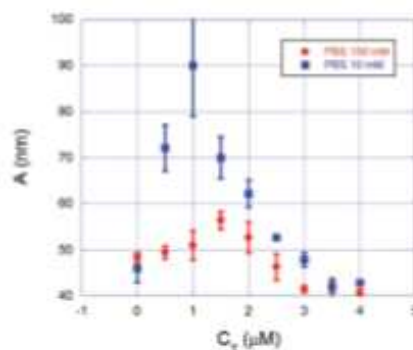


Fig. 5 Persistence length A of the same λ -DNA–Berenil complexes as a function of C_T , obtained in both buffers. Observe that this mechanical parameter exhibits a non-monotonic behavior, increasing from the bare DNA result until reaching a certain maximum value, and then decreasing until ~ 41 nm for $C_T > 3.5 \mu\text{M}$.

and then decreasing until ~ 41 nm for $C_T > 3.5 \mu\text{M}$. The main difference here is that the maximum value reached by the persistence length is much higher (~ 90 nm) in PBS 10 mM than in PBS 150 mM (~ 56 nm). In any case, this non-monotonic behavior strongly suggests that intercalation, if present, certainly is not the unique binding mechanism. In fact, the typical change induced by intercalators on the DNA persistence length is considerably different.^{22,29}

Before we proceed with the quantitative analysis to determine the physicochemical parameters of the λ -DNA–Berenil interaction, some general considerations can be drawn from the data of Fig. 4 and 5. Firstly, observe that Berenil binds strongly to the λ -DNA molecule, since saturation occurs at very low ligand concentrations. Secondly, as mentioned above, two different binding mechanisms, or a mixed binding mechanism, should play a role here in order to explain the non-monotonic behavior of the persistence length. Alternatively, as found by Reinert for calf thymus DNA (ctDNA),²¹ another possibility is the existence of only one single binding mode (groove binding) which causes conformational changes on the double-helix structure (bendings and unwinding) that are related to the behavior of the mechanical parameters. Using viscometry, Reinert has found an increase both in the contour and persistence lengths as Berenil binds for low drug concentrations, in agreement with our results. Higher drug concentrations could not be tested in these experiments due to technical reasons.²¹

If the first scenario is true (two different binding modes), the contour length data suggest that one of these mechanisms should be intercalation. Nevertheless, the non-monotonic behavior of the persistence length strongly suggests that minor groove binding plays an important role here.^{22,29,30} The following analysis will show that the pure mechanical data of Fig. 4 and 5 are sufficient to answer if these modes are mixed or independent, *i.e.*, how they are coupled/mixed. There are some compounds such as the chemotherapeutic drug actinomycin D that have two distinct portions, one that intercalates and other

that binds to the DNA minor groove.^{35,37–39} Thus, in this case a single ligand molecule exhibits the two binding modes that simultaneously occur, *i.e.*, the modes are completely coupled. Other ligands such as the anthracyclines (doxorubicin, daunomycin) intercalate, but have a strong tendency to form self-aggregates composed of a few molecules. Since only one molecule of these aggregates can intercalate, the others remain outside the double-helix interacting with the phosphate backbone.^{23,24} This is another example of two binding mechanisms that cannot be dissociated easily, unless it is possible to modify the buffer composition to hinder the ligand self-association. There are, however, some types of ligands that exhibit independent binding modes that are, in principle, dissociable, such as Hoechst 33258,²² β -cyclodextrin⁴⁰ and psoralen.⁴¹ In the first two cases, a particular binding mode can be strongly favored by controlling the ligand concentration in the sample.^{23,42} In the last case, the binding modes can be controlled by modulating the sample illumination with ultraviolet light.^{33,34,43}

In the second scenario (a single binding mode), the changes measured both in the persistence and contour lengths arise from the conformational changes such as bendings and twists induced in the double-helix structure due to Berenil binding at the minor groove, without intercalation.

In order to advance in the above discussion, we use here a recently developed quenched-disorder statistical model to extract the physical chemistry of the λ -DNA-Berenil interaction from the persistence length data.^{33,44} This model has been used in recent works to investigate DNA interactions with various ligands, and it has been proven extremely useful and efficient to determine the physicochemical parameters of the interaction and to decouple multiple binding modes.^{33,35,36,45} Basically, the approach consists in fitting the persistence length data with the equation

$$\frac{1}{A} = \frac{(1-r/r_{\max})^2}{A_0} + \frac{2(r/r_{\max})(1-r/r_{\max})}{A_1} + \frac{(r/r_{\max})^2}{A_2}, \quad (1)$$

where A_0 is the bare DNA persistence length, A_1 is the local persistence length due to the binding of a single ligand molecule (or a single bound cluster of molecules if they form aggregates), A_2 if the local persistence length if two ligand molecules (or two bound clusters) became nearest neighbors, r is the bound site fraction (fraction of bound DNA base-pairs) and r_{\max} is the maximum value of r .^{33,46} Observe that the boundary values for the bound ligand fraction are $r = 0$ (no bound ligand, *i.e.*, bare DNA) and $r = r_{\max}$ (DNA saturated with bound ligand).

The bound site fraction r can be expressed by a convenient binding isotherm involving the relevant physicochemical parameters of the interaction.³³ Here we have tested some different binding isotherms plugged into eqn (1) in order to get insights on the mechanisms of Berenil binding to λ -DNA. The technical details of the fitting procedure were described elsewhere.³³ The first isotherm tested was the Hill binding isotherm, which can be written as

$$\frac{r}{r_{\max}} = \frac{(KC)^n}{1 + (KC)^n}, \quad (2)$$

where K is the equilibrium binding association constant, n is the Hill exponent (a cooperativity parameter which is a lower bound for the number of cooperating ligand molecules involved in the reaction), and C_f is the free ligand concentration in solution, which is related to the total ligand concentration C_T by $C_f = C_T - C_b$, where C_b is the bound ligand concentration. Note that $r = C_b/C_{bp}$, where C_{bp} is the DNA base-pair concentration in solution.

Observe that such isotherm has only one single association constant. Thus, it can be applied to DNA–ligand systems which have only a single binding mode or two or more coupled modes that simultaneously occur, in this last case giving the effective parameters of the interaction.³³

A relatively easy way to use the Hill model to decouple two binding modes is expressing the effective binding isotherm as a sum of two Hill processes,³³ *i.e.*,

$$\frac{r}{r_{\max}} = \frac{(K_1 C_f)^n}{2[1 + (K_1 C_f)^n]} + \frac{(K_2 C_f)^n}{2[1 + (K_2 C_f)^n]} \quad (3)$$

Another possibility is using the sequential binding isotherm, which is adequate if the two binding modes do not occur simultaneously. It reads

$$\frac{r}{r_{\max}} = \frac{K_1 C_f + 2K_1 K_2 C_f^2}{2(1 + K_1 C_f + K_1 K_2 C_f^2)} \quad (4)$$

In Fig. 6 we show the experimental data and the three fittings mentioned above for the PBS 150 mM data. The fitting performed with the sequential binding isotherm (green dashed line) do not agree well with the experimental results, returning some unmeaning physicochemical parameters. As we will show

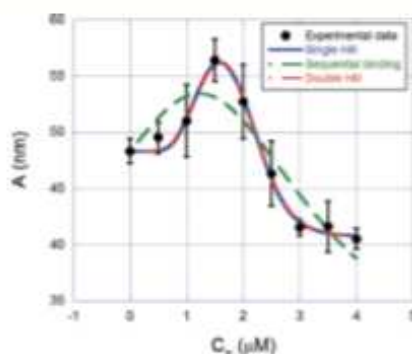


Fig. 6 Persistence length data (black circles) obtained in PBS 150 mM and the fittings to our quenched disorder statistical model³³ using three different binding isotherms: sequential binding (green dashed line), single Hill (blue solid line) and double Hill (red dashed line). The sequential binding isotherm cannot explain the experimental data, while the fittings to a single or a double Hill process are indistinguishable, indicating that there is only a single effective binding mechanism.

below, this result is related to the fact Berenil binding at high ionic strengths exhibits a considerably high positive cooperativity, which cannot be accounted for by using the sequential binding isotherm. Such positive cooperativity induces a nearly simultaneous binding of a few Berenil molecules in each binding event.²⁴ Thus, a sequential binding model cannot be the scenario at least for high ionic strengths. On the other hand, observe that the fittings performed with the single Hill (blue solid line) and double Hill (red dashed line) isotherms are indistinguishable, both explaining with accuracy the experimental data. In fact, the physicochemical parameters returned by these two fittings are identical; and when using the double Hill isotherm we found $n_1 \sim n_2$ and $K_1 \sim K_2$. This result strongly indicates that there is only a single effective binding mechanism for the λ -DNA-Berenil interaction at high ionic strengths. Thus, if intercalation occurs here, it should be strongly coupled/mixed to the groove binding mode. Berenil intercalation was previously reported by Pilch *et al.* for other types of DNA, although they have found that the existence of such mode strongly depends on the specific DNA sequence.²⁸

From the fitting with the single Hill process, we find the physicochemical parameters $K = (7.9 \pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = 7 \pm 2.5$, $r_{\text{max}} = 0.4 \pm 0.1$, $A_1 = (75 \pm 7) \text{ nm}$ and $A_2 = (41 \pm 1) \text{ nm}$. The result found for the equilibrium association constant K is compatible to results reported in the literature for various different DNA sequences²⁸⁻³⁰ and confirms the strong binding of Berenil to the λ -DNA. In addition, the result found for the Hill exponent suggests that Berenil binding occurs here with a high positive cooperativity, with ~ 7 drug molecules binding simultaneously to the double-helix at each binding event.³¹ Cooperativity was also reported in previous works which have investigated the binding of Berenil to other DNA sequences.²⁸ The value of r_{max} indicates that approximately $\sim 40\%$ of the DNA base-pairs are occupied by Berenil at saturation, a result compatible with other investigations.^{28,29} Finally, the results found for the local persistence lengths A_1 and A_2 reflect the fact that Berenil binding firstly increases the bending rigidity of the double-helix at low concentrations and then decreases it at higher concentrations. Such behavior occurs for many ligands which exhibit complex binding to DNA, and can arise from the competition of two distinct binding modes^{24,25} as well as from conformational changes on the double-helix induced by the ligand at a certain concentration.^{34,35}

In Fig. 7 we show the similar fittings obtained for the PBS 10 mM data. The double Hill isotherm is not shown here because it is again identical to the single Hill isotherm, with $n_1 \sim n_2$ and $K_1 \sim K_2$. Observe that, for low ionic strengths, both the single Hill (blue solid line) and sequential binding (green dashed line) isotherms explain well the experimental data. Nevertheless, when using the sequential binding isotherm, the fitting returns $K_1 \sim K_2$, indicating again that there is only a single effective binding mode here. In the present case, such binding mode should be non-cooperative since it can be explained with a sequential binding isotherm, which assumes that individual molecules bind nearly sequentially to the DNA.

From the fitting with the sequential binding isotherm, we found $K_1 = K_2 = (1.3 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. From the fitting with the

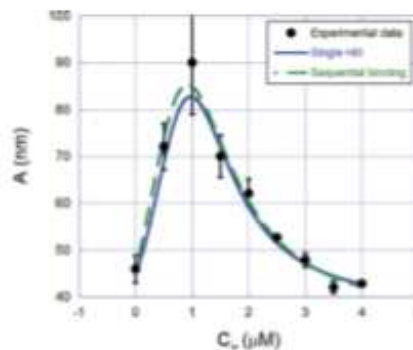


Fig. 7 Persistence length data (black circles) obtained in PBS 10 mM and the fittings to our quenched disorder statistical model³⁶ using two different binding isotherms: sequential binding (green dashed line) and single Hill (blue solid line). The fitting with the sequential binding isotherm returns $K_1 \sim K_2$, indicating again that there is only a single binding mode here. The double Hill isotherm is not shown here because it is again identical to the single Hill isotherm.

single Hill process, we found $K = (1.7 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $n = 1.6 \pm 0.6$, and also $r_{\text{max}} = 0.4 \pm 0.1$. These results indicate that the binding affinity increases for lower ionic strengths (the equilibrium constant is approximately twice the value found in the PBS 150 mM buffer), but the cooperativity between Berenil molecules strongly decreases, becoming very close to a complete non-cooperative system (Hill exponent ~ 1 (ref. 15 and 33)). In non-cooperative binding reactions the ligand molecules bind individually, not influencing the binding of the subsequent ones. This result is strongly correlated to the net charge of the Berenil molecules (+2). At high ionic strengths, the repulsive electrostatic interaction between these molecules is strongly screened, making cooperativity possible. Nevertheless, at low ionic strengths, such repulsive interaction can difficult the subsequent binding of Berenil molecules close to previously bound sites of the double-helix. Thus, we expect a strong decrease of the Hill exponent as the ionic strength of the buffer is lowered, as measured here.

In summary, from the results of the fitting analysis performed in both buffers, it is clear that there is only a global effective binding mode in the interaction between Berenil and λ -DNA, and not two independent modes. What is not clear yet is if this effective binding mode involves partial intercalation of Berenil molecules into the double-helix. In fact, such information could not be deduced from the analysis performed here with the persistence length data. As mentioned before, we have two possibilities: a mixed binding mode involving partial intercalation and groove binding, or alternatively, a groove binding mechanism which induces conformational changes on the double-helix structure, probably unwinding, that increases the DNA contour length. The first scenario was proposed by Pilch *et al.*, who have studied Berenil interaction with some particular DNA sequences at low ionic strengths.²⁸ The second scenario was proposed by Reinert, who has studied Berenil

interaction with ctDNA at a high ionic strength.⁴⁴ In order to clarify which is the case here for the Berenil interaction with λ -DNA, we return to the contour length data shown in Fig. 4. If one supposes that the increase verified for this parameter is due only to intercalative binding, it may satisfy the relation^{43,44}

$$\Theta = \frac{L - L_0}{L_0} = \gamma r, \quad (5)$$

with $\gamma = \delta/\Delta$, where $\Delta = 0.34$ nm is the mean distance between two consecutive base pairs in the bare DNA molecule at B-form and δ is the increase of this length caused by a single intercalated molecule.⁴⁴

For typical intercalators one has $\delta \sim 0.34$ nm and $\gamma \sim 1$.^{44,45} Thus, determining the values of δ and γ is a simple way to quantify the role of intercalation in a DNA–ligand binding reaction. From Fig. 4, we have $\Theta_{\max} = 0.14$ for the PBS 150 mM data and $\Theta_{\max} = 0.35$ for the PBS 10 mM data. Since we have determined $r_{\max} \sim 0.4$ for both buffers data from the persistence lengths fittings, it is straightforward to obtain $\gamma_{\text{PBS } 150} \sim 0.14/0.4 = 0.35$ and $\gamma_{\text{PBS } 10} \sim 0.35/0.4 = 0.88$. Thus, $\delta_{\text{PBS } 150} \sim 0.35 \times (0.34 \text{ nm}) \sim 0.12$ nm and $\delta_{\text{PBS } 10} \sim 0.88 \times (0.34 \text{ nm}) \sim 0.3$ nm. One should observe that in PBS 10 mM, the value found for γ (and consequently for δ) is very close to the result expected for intercalators. Nevertheless, in PBS 150 mM, the values of γ and δ are much smaller, but compatible to the result found by Reinert for the interaction of Berenil with ctDNA at high ionic strengths.⁴⁴

Thus, based on the analysis performed with our experimental data, we propose the following scenario for the interaction between Berenil and λ -DNA: the ionic strength of the buffer solution is the factor that determines if the partial intercalation of Berenil occurs. By increasing the ionic strength of the buffer, one decreases the affinity of Berenil to partially intercalate into the double-helix of λ -DNA. In any case, such intercalation, when exists, is always mixed/coupled with minor groove binding, which is the main binding mechanism of the λ -DNA–Berenil interaction. Both intercalation and groove binding contribute here to increase the DNA contour length, but such increase is much stronger when partial intercalation is present at low ionic strengths, due to the intrinsic nature of this type of interaction. The fact that the existence of the intercalative binding mode depends on the ionic strength is strongly correlated to the net charge of the Berenil compound (+2). Indeed, our results show that electrostatic driven interactions play a very important role in this DNA–ligand system. This is the reason why the variation of the ionic strength affects significantly the maximum values obtained for the mechanical properties (contour and persistence lengths), the physicochemical parameters (equilibrium constant and Hill exponent), and the whole binding mechanism.

4 Conclusion

By using single molecule stretching and a new methodology of data analysis, we were able to show that one can determine the binding mechanisms and the physicochemical parameters of the DNA interaction with the complex ligand Berenil. In

particular, we show that the interaction can be modulated by changing the ionic strength of the surrounding buffer. For high ionic strengths (150 mM), Berenil behaves as a typical minor groove DNA ligand. For low ionic strengths (10 mM), otherwise, the drug also partially intercalates into the double-helix. Besides such conclusions, our analysis promptly allows one to extract the physicochemical parameters (equilibrium constants, cooperativity degree, bound ligand fraction at saturation, etc.) of the interaction for each ionic strength studied. Our methodology can be readily applied to other DNA ligands, allowing one to investigate and decouple different binding mechanisms for complex ligands which present multiple mixed binding modes to DNA.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- 1 L. D. Williams, M. Egli, Q. Gao and A. Richa, *Struct. Funct., Proc. Conversation Discip. Biomol. Stereodyn.*, 7th, 1992, 1.
- 2 M. F. Brana, M. Cacho, A. Gradillas, B. de Pascual-Teresa and A. Ramos, *Curr. Pharm. Des.*, 2001, 7, 1745–1780.
- 3 M. K. Gofar, N. M. Kor and Z. M. Kor, *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, 2014, 2, 811–822.
- 4 A. Sischka, K. Tönsing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Rios and D. Anselmetti, *Biophys. J.*, 2005, 88, 404–411.
- 5 J. B. Chaires, N. Dattagupta and D. M. Crothers, *Biochemistry*, 1982, 21, 3933–3940.
- 6 H. Fritzsche, H. Triebel, J. B. Chaires, N. Dattagupta and D. M. Crothers, *Biochemistry*, 1982, 21, 3940–3946.
- 7 B. H. Geierstanger and D. E. Wemmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1995, 24, 463–493.
- 8 F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha, *Integr. Biol.*, 2012, 2012, 568–574.
- 9 K. Stehlikova and H. Kosthrunova, *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30, 2894–2898.
- 10 X.-M. Hou, X.-H. Zhang, K.-J. Wei, C. Ji, S.-X. Dou, W.-C. Wang, M. Li and P.-Y. Wang, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 14001410.
- 11 N.-K. Lee, J.-S. Park, A. Johner, S. Obukhov, J.-Y. Hyon, K. J. Lee and S.-C. Hong, *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2009, 79, 041921.
- 12 M. S. Rocha, A. D. Lúcio, S. S. Alexandre, R. W. Nunes and O. N. Mesquita, *Appl. Phys. Lett.*, 2009, 95, 253703.
- 13 D. W. Ussery, R. W. Hoepfner and R. R. Sinden, *Methods Enzymol.*, 1992, 212, 242–262.
- 14 G. D. Cimino, H. B. Gamper, S. T. Isaacs and J. E. Hearst, *Annu. Rev. Biochem.*, 1985, 54, 1151–1193.
- 15 E. C. Cesconetto, F. S. A. Junior, F. A. P. Crisafuli, O. N. Mesquita, E. B. Ramos and M. S. Rocha, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, 15, 11070–11077.

- Paper RSC Advances
- 16 T. Paramanathan, I. Vladescu, M. J. McCauley, I. Rouzina and M. C. Williams, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 4925-4932.
- 17 D. J. Patel, S. A. Kmłowski, J. A. Rice, C. Broka and K. Itakura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, **78**, 7281-7284.
- 18 W. Müller and D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.*, 1968, **35**, 251-290.
- 19 H. M. Sobell, S. C. Jain, T. D. Sakore and C. E. Nordman, *Nature, New Biol.*, 1971, **231**, 200-205.
- 20 R. Eickel, R. Ros, A. Ros, S. D. Wilking, N. Sewald and D. Anselmetti, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 1968-1973.
- 21 T. Berge, N. S. Jenkins, R. B. Hopkirk, M. J. Waring, J. M. Edwardson and R. M. Henderson, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 2980-2986.
- 22 P. L. Hamilton and D. P. Arya, *Nat. Prod. Rep.*, 2012, **29**, 134-143.
- 23 E. F. Silva, R. F. Bazoni, E. B. Ramos and M. S. Rocha, *Biopolymers*, 2016, DOI: 10.1002/bip.22998.
- 24 C. Pérez-Arnaiz, N. Busto, J. M. Leal and B. García, *J. Phys. Chem. B*, 2014, **118**, 1288-1295.
- 25 A. Y. Chen and L. F. Liu, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1994, **34**, 191-218.
- 26 D. S. Pilch, C. Yu, D. Makhay, E. J. LaVoie, A. R. Srinivasan, W. K. Olson, R. R. Sauer, K. J. Breslauer, N. E. Gearintow and L. F. Liu, *Biochemistry*, 1997, **36**, 12542-12553.
- 27 L. H. Pearl, J. V. Skelfy, B. D. Hudson and S. Neidle, *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**, 3469-3478.
- 28 H.-U. Schmitz and W. Hubner, *Biophys. Chem.*, 1993, **48**, 61-74.
- 29 D. S. Pilch, M. A. Kirulos, X. Liu, G. E. Plum and K. J. Breslauer, *Biochemistry*, 1995, **34**, 9962-9976.
- 30 F. Barceño, M. Ortiz-Lombardía and J. Portugal, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1519**, 175-184.
- 31 K. E. Reinert, *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**, 3411-3430.
- 32 C. Caramelo-Nunes, T. Tente, P. Almeida, J. C. M. and C. T. Tomaz, *Anal. Biochem.*, 2011, **412**, 153-158.
- 33 M. S. Rocha, *Integr. Biol.*, 2015, **7**, 967-986.
- 34 M. J. McCauley and M. C. Williams, *Biopolymers*, 2009, **91**, 265-282.
- 35 E. F. Silva, E. B. Ramos and M. S. Rocha, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 7292-7296.
- 36 I. Amitani, B. Liu, C. C. Dombrowski, R. J. Baskin and S. C. Kowalczykowski, *Methods Enzymol.*, 2010, **472**, 261-291.
- 37 J. F. Marko and E. D. Siggia, *Macromolecules*, 1995, **28**, 8759-8770.
- 38 M. S. Rocha, M. C. Ferreira and O. N. Mesquita, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 105108.
- 39 J. E. Coury, L. McFail-Isom, L. D. Williams and L. A. Bottomley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 12283-12286.
- 40 R. F. Bazoni, C. H. M. Lima, E. B. Ramos and M. S. Rocha, *Soft Matter*, 2015, **11**, 4306-4314.
- 41 P. S. Alves, O. N. Mesquita and M. S. Rocha, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2015, **6**, 3549-3554.
- 42 M. S. Rocha, N. B. Viana and O. N. Mesquita, *J. Chem. Phys.*, 2004, **121**, 9679-9683.
- 43 L. Siman, I. S. S. Carrasco, J. K. L. da Silva, M. C. Oliveira, M. S. Rocha and O. N. Mesquita, *Phys. Rev. Lett.*, 2012, **109**, 248103.
- 44 M. S. Rocha, *Phys. Biol.*, 2009, **6**, 036013.

Bibliografía

- [1] WATSON J. D. and CRICK F. H. C.; “*Molecular structure of nucleic acids a structure for desoxyribose nucleic acid*”. Nature, **171**, (4356), 737–738, 1953.
- [2] WATSON J. D. and CRICK F. H. C.; ‘*Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*’. Nature, **171**, (4361), 964–967, 1953.
- [3] WATSON J. D. e CRICK F. H. C.; ‘*Watson e Crick. A história da descoberta da estrutura do DNA*’. Revista da SBHC, **Vol. 2, No. 2**, 166-170, 2004.
- [4] NEUSA M. J. S., NADIR F., e DEMÉTRIO D.; ‘*A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA*’. Ciência e Educação, **11**, 223-233, 2005.
- [5] WATSON J., BAKER T., BELL S., GANN A., LEVINE M. and LOSICK R.; ‘*Molecular Biology of the Gene*’. **Ed. 5**, Person Education, 2004.
- [6] ADAMS R. L. P., KNOWLER T. J. and LEADER P. D.; ‘*The biochemistry of the nucleic acids*’. 11th Ed., Chapman & Hall Ltd, 1992.
- [7] CRISAFULI F.A.P.; ‘*Caracterização da interação DNA-Cisplatina usando pinça ótica e video-microscopia*’. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.
- [8] ROCHA M. S.; ‘*Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*’. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2008.
- [9] VERONICA B.; ‘*Estructura y propiedades de los acidos nucleicos*’. Química aplicada a la ingeniería biomédica, Master en ingeniería biomédica, UV-UPV, **3**, 1-17, 2008.
- [10] DAUNE M.; ‘*Molecular Biophysics: Structures in Motion*’. Inter Editions, Paris, 1993. Translated by Duffin, W. J., Oxford Universit Press, New York, US, 1999.
- [11] ZAHA A., FERREIRA H., SCHRANK A. e PASSAGLIA L.; ‘*A estrutura dos Ácidos Nucléicos*’. Biología Molecular Básica, **3**, 33-58, 2003.

- [12] NETO J. C.; '*Medida da Elasticidade Entropica de Uma Molécula de DNA*'. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2001.
- [13] ALMEIDA LEITAO A., BARRET L., MONTANARI C. e DONNICI C.; '*Cancer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução*'. Química Nova, **Vol. 28, No. 1**, 118-129, 2005.
- [14] FERREIRA E. e ROCHA M. S.; '*Estudo da interação DNA-HOECHST (33258) por pinçamento ótico*'. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2013.
- [15] WATSON J., D. BAKER T., BELL S., GANN A., LEVINE M. and LOSICKE R.; '*Biología moléculas do gene*'. Artmed, **Ed. 7**, 2015.
- [16] BARRA C. e NETTO A. V.; '*Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores*'. Revista virtual de Química, **Vol.7, No.6**, 1998-2016, 2015.
- [17] IHMELS H. and OTTO D.; '*Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments*'. Supermolecular dye chemistry, series topics in current chemistry, **Vol. 258**, 161-204, 2005.
- [18] LERMAN L. S.; '*Structural considerations in the interaction of DNA and acridines*'. Journal of Molecular Biology, **Vol. 3, No. 18**, 1961.
- [19] ZEGLIS B. M., PIERRE V. C. and BARTON J. K.; '*Metallo-intercalators and metallo-insertors*'. Chemical Communications, **Vol. 44**, 4565, 2007.
- [20] WALSER P. D.; '*Pneumocystis carini Pneumonia*'. In Lung Biology in Health and Disease, **Vol.69**, New york, 1994.
- [21] OLIVEIRA A. M. e MONTANARI C. A.; '*Estudo das interações com a fenda menor do B-DNA com grupos característicos de alguns compostos antimicrobianos por meio do programa GRID*'. Núcleo de Estudos em Química Medicinal (NEQUIM), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- [22] ALLEVA K. y FEDERICO L.; '*Análisis estructuralista de las teorías de Hill: una elucidación de explicación en bioquímica*'. scientiæ zudia, São Paulo, **Vol. 11, No. 2**, 333-353, 2013.
- [23] BAUER F.; '*Trypanosomen und Babesien-Erkrankungen in Afrika und ihre Behandlung mit dem neuen Praparat "Berenil"*'. Z. Tropenmed. Parasitol, **6**, 129, 1955.
- [24] FUSSGANGER R.; '*Berenil in der Veterinarmedizin*'. Veterinar Medizinische Nachr, Ed. H. Van Den Bossche, 146, 1955.

- [25] NEWTON B. A.; “Recent studies on the mechanism of action of berenil (*Diminazene*) and related compounds“. Comparative biochemistry of parasites, **No. 3**, New York: Academic Press 1972.
- [26] LAURENCE H. P., SKELLY J. V., HUDSON B. and NEIDLE S.; “The crystal struct of the DNA-binding drug berenil: molecular modelling studies of berenil-DNA complexes“. Nucleids Acid Research. Cancer Research Campaign Biomolecular Structure Unit, Institute of Cancer Research, Clifton Avenue, Sutton, Surrey SM2 5PX, UK, **Vol. 15 No. 8**, 3469-3478, 1987.
- [27] HOUVE K. V. e GRAINGE E. B.; “Berenil sensitivity in vitro of trypanosomes of the *T. brucei* sub group and *T. congolense* group“. East African Trypanosomiasis Organisation Report, **63**, 1966.
- [28] GRAY A. R. and ROBERT C. J.; “The cyclical transmission of strains of *Trypanosoma congolense* and *T. oivax* resistant to normal therapeutic doses of trypanocidal drugs“. Parasitology, **63**, 67, 1971.
- [29] WILLIAMSON J.; “Review of chemotherapeutic and chemoprophylactic agents“. The African trypanosomiasis, Ed. H. W. MULLIGAN. London: George Allen and Unwin, 125, 1970.
- [30] MACADAM R. R. and WILLIAMSON J.; “Lesions in the fine structure of *Trypanosoma rhodesiense* specifically associated with drug treatment“. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **63**, 421, 1969.
- [31] HUMMEL J. P. and DREYER W. J.; “Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration“. Biochem. Biophys, Acta **63**, 530, 1962.
- [32] PILCH D. S., KIROLOS M. A., LIU X., PLUM G. E. and BRESLAUER K. J.; “Berenil [1,3-Bis(4'-amidinophenyl)triazene] Binding to DNA Duplexes and to a RNA Duplex: Evidence for Both Intercalative and Minor Groove Binding Properties“. Biochemistry, **34**, 9962-9976, 1995.
- [33] SAITO M., KOBAYASHI M., IWABUCHI S., MORITA Y., TAKAMURA Y. and TAMIYA E.; “DNA Condesation Monitoring After Interaction with Hoechst 33258 by Atomic Force Microscopy and Fluorescence Spectroscopy“. J.Biochem, **136**, 813-823, 2004.
- [34] RAJAGOPALA S. V., CASJENS S. and UETZ P.; “The protein interaction map of bacteriophage lambda“. BMC Microbiology, **11**, 2011.
- [35] STRICK T., ALLEMAND J.F., CROQUETTE V. and BENSIMON D.; “Twisting and Stretching Single DNA Molecules“. Prog. Biophys. Mol. Biol., **74**, 115-140, 2000.
- [36] WANG M. D., YIN H., LANDICK R., GELLES J. and BLOCK S. M.; “Stretching DNA with Optical Tweezers“. Prog. Biophys Journal, **72**, 1335-1346, 1997.

- [37] AMITANI I., LIU B., DOMBROWSKI C., BASKIN R. J. and KOWLCZYKOWSKI S. C.; “*Watching Individual Proteins Acting on Single Molecules of DNA*”. *Methods Enzymol*, **472**, 261-291, 2010.
- [38] ROCHA M. S.; “*Pinças ópticas: experimento e teoria*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2004.
- [39] MAZOLLI A., NETO P. A. M. and NUSSENSVEIG H. M.; “*Theory of trapping forces in optical tweezers*”. *Proc. R. Soc. Lon.*, **459**, (2040), 3021-3041, 2003.
- [40] NETO P. A. M. and NUSSENSVEIG H. M.; “*Theory of optical tweezers*”. *Europhys. Lett.*, **50**, (5), 702-708, 2000.
- [41] ASHKIN A.; “*Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*”. *Phys. Rev. Lett.*, **24**, 156-159, 1970.
- [42] ASHKIN A. and DZIEDZIC J. M.; “*Optical levitation by radiation pressure*”. *Appl. Phys. Lett.*, **19**, 283-289, 1971.
- [43] ASHKIN A. and DZIEDZIC J. M.; “*Optical levitation in high vacuum*”. *Appl. Phys. Lett.*, **28**, 333-335, 1976.
- [44] ASHKIN A. and DZIEDZIC J. M.; “*Observation of resonances in radiation pressure on dielectric spheres*”. *Phys. Rev. Lett.*, **38**, 1351-1354, 1977.
- [45] ASHKIN A. and DZIEDZIC J. M.; “*Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*”. *Science*, **235**, 1517-1520, 1987.
- [46] ASHKIN A. DZIEDZIC J. M. BJORKHOLM J. E. and CHU S.; “*Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*”. *Opt. Lett.*, **11**, 288-290, 1980.
- [47] ASHKIN A. DZIEDZIC J. M., YAMANE T.; “*Optical trapping and manipulation of single cells using infrared-laser beams*”. *Nature*, **330**, 769-771, 1987.
- [48] ASHKIN A.; “*Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*”. *Biophys. J.*, **61**, 569-582, 1992.
- [49] ASHKIN A.; “*Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*”. *Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4853-4860, 1997.
- [50] SANTOS P. A. e ROCHA M. S.; “*Teoria e calibração de pinças óticas*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.

- [51] BAZONI R. F., LIMA C. H. M., RAMOS E. B. e ROCHA M. S. “*Force-dependent persistence length of DNA-intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments*”. *Soft Matter*, v. **11**, 4306-4314, 2015.
- [52] CESCINETTO E. C.; JUNIOR F. S. A.; CRISAFULI F. A. P.; MESQUITA O. N.; RAMOS E. B and ROCHA M. S.; “*DNA Interaction with Actinomycin D: Mechanical Measurements Reveal the Details of the Binding Data.*”. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **15**, 11070–11077, 2013.
- [53] ROCHA M. S.; “*Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate DNA interactions with drugs and proteins in single molecule experiments*”. *Integr. Biol.*, **7**, 967–986, 2015.
- [54] PATEL D. J.; KOZLOWSKI S. A.; RICE J. A.; BROKA C. and ITAKURA K.; “*Mutual interaction between adjacent dG.dC actinomycin binding sites and dA.dT netropsin binding sites on the self-complementary d(CGCGAATTCGCG) duplex in solution*”. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 7281–7284, 1981.
- [55] MULLER W. and CROTHERS D. M.; “*Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA*”. *J. Mol. Biol.*, **35**, 251–290, 1968.
- [56] SOBELL H. M.; JAIN S. C.; SAKORE T. D. and NORDMAN C. E.; “*Stereochemistry of actinomycin-DNA binding.*” *Nature. New Biol.*, **231**, 200–205, 1971.
- [57] ECKEL R., ROS R., ROS A., WILKINGS S. D., SEWALD N. and ANSELMETTI D. E.; “*Identification of binding mechanisms in single molecule-DNA complexes.*” *Biophys. J.*, **85**, 1968–1973, 2003.
- [58] BERGE T., JENKINGS N. S., HOPKIRK R. B., WARING M. J. and EDWARDSON J. M.; HENDERSON, R. M.; “*Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualised by atomic force microscopy*”. *Nucl. Acids Res.*, **30**, 2980–2986, 2002.
- [59] HAMILTON P. L. and ARYA D. P.; “*Natural product DNA major groove binders*”. *Nat. Prod. Rep.*, **29**, 134–143, 2012.
- [60] PEREZ-ARNAIZ C., BUSTO N., LEAL J. M. and GARCIA B.; “*New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction*”. *J. Phys. Chem. B.*, **118**, 1288–1295, 2014.
- [61] ALVES P. S., MESQUITA O. N. and ROCHA M. S.; “*Controlling Cooperativity in Cyclodextrin-DNA Binding Reactions.*” *J. Phys. Chem. Lett.*, **6**, 3549–3554, 2015.
- [62] ROCHA M. S., LUCIO A. D., ALEXANDRE S. S., NUNES R. W. and MESQUITA O. N.; “*DNA-14 psoralen: Single-molecule experiments and first principles calculations*”. *Appl. Phys. Lett.*, **95**, 253703, 2009.

- [63] USSERY D. W., HOEPFNER R. W. and SINDEN R. R.; “*Probing DNA-structure with Psoralen in vitro.*” *Method. Enzymol.*, **212**, 242–262, 1992.
- [64] SCHMITZ H. U. and HUBNER W. A. “*Thermodynamic and spectroscopic study on the binding of berenil to poly d(AT) and to poly (dA).poly(dT)*”. *Biophys. Chem.*, **48**, 61–74, 1993.
- [65] BARCELO F.; ORTIZ-LOMBARDIA, M.; Portugal, J. “*Berenil [1,3-Bis(4-amidinophenyl)triazene] Heterogeneous DNA binding modes of berenil.*” *Biochim. Biophys.* **1519**, 175–184, Acta 2001.
- [66] REINERT K. E.; “*DNA Multimode Interaction with Berenil and Pentamidine; Double Helix Stiffening, Unbending and Bending*”. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **17**, 311-331, 1999.
- [67] ROCHA M. S., FERREIRA M. C. and MESQUITA O. N.; “*Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules.*” *J. Chem. Phys.*, **127**, 105108, 2007.
- [68] COURY J. E., MCFAIL-ISOM L., WILLIAMS L. D. and BOTTOMLEY L. A.; “*A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity and exclusion number: Scanning force microscopy.*” *P. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 12283–12286, 1996.
- [69] BOYKIN D. W.; “*Antimicrobial Activity of the DNA minor Groove binders furamidine and analogs*”. *J. Braz. Chem. Soc.*, **Vol 13, No 6**, 763-771, 2002.
- [70] PILCH D. S., KIROLOS M. A. and BRESLAUER K. J.; “*Berenil binding to higher ordered nucleic acid structures: complexation with a DNA and RNA triple helix*”. *Biochemistry*, **34**, 16107-16124, 1995.
- [71] MARKO J. F. and SIGGIA E. D.; “*Stretching DNA*”. *Macromolecules*, **28 (26)**, 8759–8770, 1995.
- [72] SHLOMAI J.; “*The structure and replication of kinetoplast DNA*”. *Curr. Mol. Med.*, **4 (6)**, 623-647, 2004.
- [73] SHAPIRO T. A., ENGLUND P. T.; “*The structure and replication of kinetoplast DNA*”. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 117-143, 1995.
- [74] ZHOU J., LE V., KALIA D., NAKAYAMA S., MIKEK C., LEWIS E. and SINTIM H.; “*Diminazene or berenil, a classic duplex minor groove binder, binds to G-quadruplexes with low nanomolar dissociation constants and the amidine groups are also critical for G-quadruplex binding*”. *Mol.Biosyst.*, **10**, 2724-2734, 2014.