

FABIANO AUGUSTO DE PAULA CRISAFULI

CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DNA - CISPLATINA
USANDO PINÇA ÓPTICA E VIDEOMICROSCOPIA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C932c
2012

Crisafuli, Fabiano Augusto de Paula, 1984-
Caracterização da interação DNA – cisplatina usando pinça
óptica e videomicroscopia / Fabiano Augusto de Paula
Crisafuli. – Viçosa, MG, 2012.
xii, 84f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 78-84

1. Óptica. 2. Microscopia. 3. Ácido desoxirribonucléico.
4. Agentes antineoplásicos. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 535.2

FABIANO AUGUSTO DE PAULA CRISAFULI

CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DNA - CISPLATINA USANDO PINÇA
ÓPTICA E VIDEOMICROSCOPIA

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: 17 de fevereiro de 2012.



Marcelo Lobato Martins
(Coorientador)



José Ésio Bessa Ramos Júnior
(Coorientador)



Luciano Gomes Fietto



Oscar Nassif de Mesquita



Márcio Santos Rocha
(Orientador)

À minha mãe, Maria Luiza e à minha amada, Cibely.

”Ninguém é tão sábio que nada tenha para aprender, nem tão tolo que nada tenha para ensinar.”

Blaise Pascal (1623-1662)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por iluminar minha jornada e pela força nos momentos mais difíceis. Aos meus amados pais, Carmelo e Maria Luiza, pelo amor, dedicação e ensinamentos que, certamente, levarei por toda minha vida. À vovó Maria, cujo amor e admiração superam a imensa saudade.

À todos os meus amados tios(as), pelos conselhos ao longo desses anos e por sempre terem acreditado na minha capacidade. Um agradecimento especial ao tio Carlos, pela troca de saberes, ao tio Antônio Carlos, pelas viagens inesquecíveis, à tia Julieta, por todos os telefonemas, à tia Leonor, pelo acolhimento, à tia Beatriz, pela boa vontade e à tia Edith, pelo exemplo de superação. Sem dúvida, eu não teria chegado até aqui sem o apoio de vocês.

À minha amada, Cibely, pelo amor e pela dedicação ao longo desses anos e aos seus familiares: Nelson, Tânia e Renato, pelo carinho com o qual me acolheram. Obrigado também por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida acadêmica.

Ao meu grande amigo, Tiago Rocha, pela amizade desde os tempos de infância e por todas as corridas completadas ao longo desses últimos dois anos, especialmente os 42 quilômetros de uma dolorosa maratona! Aos demais amigos do Amílcar Savassi, por toda a amizade desde os tempos do colégio.

Aos grandes amigos da Física: Felipe, Saimon, Maurício, André (um agradecimento especial pela edição de várias imagens deste trabalho), Júlio, Brunão, Bruno, José Antônio, Samuel, Davidson e aos demais amigos da sala 213, por toda ajuda e momentos de descontração. Um agradecimento especial à tia Lúcia, pelo carinho no qual recepciona a todos no almoxarifado e pelos deliciosos cafezinhos durante a tarde!

Ao meu orientador, Márcio Santos Rocha, pela ajuda na realização de todos os experimentos e pela enorme paciência, motivação e cordialidade. Gostaria de agradecer também ao Estevan, por me ajudar na realização dos longos experimentos com a cisplatina e aos demais integrantes do nosso laboratório que, de certa forma, cooperaram para a realização deste trabalho.

Ao professor Oscar Nassif de Mesquita (UFMG) pelo empréstimo do laser, sem o qual não teríamos realizado a maioria dos experimentos.

Às agências de fomento: CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do laboratório de Física Biológica e do Laboratório de Cultura de Células. Um agradecimento especial aos professores: Marcelo Lobato, Sílvio, Sukarno, Winder e Sidiney pela ajuda na aprovação dos projetos de financiamento para a montagem dos laboratórios.

Por fim, um agradecimento especial à todas as pessoas que fazem a ciência e a educação progredirem em nosso país.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 Introdução	1
2 Aspectos gerais de uma pinça óptica	4
2.1 Princípio de funcionamento	4
2.2 Montagem experimental	9
2.3 Calibração da pinça óptica	11
3 A molécula de DNA	15
3.1 Um breve histórico da molécula de DNA	15
3.2 Aspectos biológicos	17
3.2.1 O DNA do fago λ	19
3.3 Mecânica de polímeros semiflexíveis	19
3.3.1 Energia de curvatura	20
3.3.2 O modelo de Kratky - Porod	20
3.3.3 Elasticidade entrópica e comprimento de persistência	22
3.3.4 O modelo Worm - Like Chain (WLC) (modelo Cadeia Vermiforme)	24
3.4 Interação DNA - ligantes	28
3.4.1 O modelo de Michaelis - Menten	28
3.4.2 O modelo de Hill	30

4	Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina	33
4.1	Cisplatina	33
4.1.1	Um breve histórico	33
4.1.2	Aspectos biológicos	34
4.1.3	Aspectos clínicos	38
4.2	Preparação das amostras	39
4.2.1	Construção do porta - amostras	39
4.2.2	Preparação da solução DNA - microesferas	40
4.3	Procedimento experimental	41
4.3.1	Encontrando um bom conjunto DNA - microesferas	41
4.3.2	Procedimento experimental para a realização dos estiramentos .	42
4.3.3	Adição do fármaco na amostra	45
5	Resultados e discussão	47
5.1	Cinética da interação DNA - cisplatina	47
5.2	Propriedades mecânicas do DNA em função da concentração de cisplatina	52
6	Conclusões e perspectivas	59
Apêndice A: Cálculo de $\langle r_{ee}^2 \rangle$ para um polímero nos limites rígido e flexível.		61
Apêndice B: Cálculo do valor médio de $t_{\perp} ^2$ (modelo WLC)		64
Apêndice C: Artigos publicados		66
	Revista <i>Applied Physics Letters</i>	66
	Revista <i>Integrative Biology</i>	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		78

LISTA DE FIGURAS

2.1	Pressão de radiação. A força resultante nesse caso, empurra a microesfera no sentido de incidência do feixe.	6
2.2	Efeito da refração. A microesfera está situada na região abaixo do foco e, nesse caso, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe. . .	7
2.3	Efeito da refração. A microesfera está situada na região acima do foco e, mais uma vez, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe. . . .	8
2.4	Montagem experimental utilizada para as medidas.	9
2.5	(a) Microesfera presa na posição de equilíbrio no poço de potencial gerado pela pinça óptica. (b) Ao ligar o motor, a microesfera é empurrada pelo fluido e fica em equilíbrio em uma nova posição no poço de potencial gerado pela pinça óptica.	11
3.1	A estrutura dos nucleotídeos.	18
3.2	Desenho esquemático da molécula de DNA, com o pareamento das bases nitrogenadas e as pontes de hidrogênio.	19
3.3	Vareta rígida de comprimento L_c que, ao ser deformada, se transforma em um semicírculo de raio R_c	20
3.4	Variação do vetor posição e do vetor tangente unitário ao longo de uma curva arbitrária.	21
3.5	Reação química entre dois compostos A e B resultando no composto C. . . .	28
3.6	Gráfico da razão de sítios ligados, r , em função da concentração de ligantes livres em solução, C_f . O valor de r está compreendido entre $0 \leq r \leq 1$	29

3.7	Reação de interação entre o oxigênio e a hemoglobina, presente no interior das hemácias. O número n representa o número de sítios da hemoglobina onde o oxigênio pode se ligar.	30
3.8	Gráfico da razão de sítios ligados, r , em função da concentração de ligantes livres em solução, $[O_2]$, em um caso onde a cooperatividade é positiva ($n > 1$).	31
4.1	(a) O isômero cis-DDP e (b) o isômero trans-DDP.	35
4.2	As ligações entre a cisplatina e o DNA: (a) 1,2 - ligação cruzada intrafita GG (b) 1,3 - ligação cruzada intrafita GNG (c) 1,2 - ligação cruzada intrafita AG (d) monoaduto, ligação cruzada DNA - proteína e (e) 1,2 - ligação cruzada interfita GG.	36
4.3	A interação da cisplatina com as bases nitrogenadas (a) adenina e (b) guanina.	37
4.4	“Caminho” seguido pelas moléculas do fármaco, após ser administrado por via intravenosa.	38
4.5	Possíveis configurações para o DNA, as microesferas de poliestireno e do conjunto DNA - microesferas em nossa amostra.	41
4.6	Esquema da realização dos estiramentos da molécula de DNA. Como a velocidade na qual o estágio do microscópio se desloca é pequena, o estiramento se dá em um regime quase - estático, de forma que podemos considerar a força de Stokes aproximadamente zero.	43
4.7	Curva típica da componente x da força x extensão do DNA. O ajuste é feito utilizando - se a equação 4.3.	44
4.8	Ilustração do procedimento usado para a troca das alíquotas contendo a cisplatina.	46
5.1	Comportamento do comprimento de persistência A em função do tempo de difusão da droga, para um concentração fixa de fármaco na amostra, $C_T = 2$ mM. Observe que o valor de A decresce em função do tempo, indicando que a flexibilidade dos complexos aumenta a medida que o equilíbrio químico é atingido.	48

5.2	Extensão máxima, $R_{ee}(\max)$, em função do tempo de difusão do fármaco. Observe que, assim como o comprimento de persistência, A , a extensão máxima, $R_{ee}(\max)$, decresce a medida que o equilíbrio químico é atingindo, indicando que a molécula de DNA está realmente sendo compactada pela ação da cisplatina.	50
5.3	Comportamento do raio de giro (círculos), R_g , e da distância de equilíbrio ponta - à - ponta do polímero (quadrados), $R_{ee}(0)$, para os mesmos complexos DNA - cisplatina da Figura 5.1. Observe que ambas decrescem a medida que o equilíbrio químico é atingido, como esperado.	51
5.4	Comportamento do comprimento de persistência, A , em função da concentração de cisplatina na amostra, C_T . O formato sigmoidal da curva sugere um mecanismo de ligação cooperativo entre a cisplatina e o DNA.	52
5.5	Ilustração da compactação da molécula de DNA induzida pela cisplatina. Adaptado de [46].	53
5.6	Ajuste sigmoidal realizado sobre os dados experimentais da Figura 5.4, para a obtenção dos valores de A_0 e A_1	54
5.7	Fração de cisplatina ligada ($r = C_b/C_{bp}$) em função da concentração de fármaco livre em solução (C_f). <i>Linha tracejada</i> : ajuste realizado utilizando - se a equação 5.7 (equação de Hill). Deste ajuste obtivemos os valores dos parâmetros ajustáveis, $K_A = (2,2 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-n}$ e $n = 2,3 \pm 0,3$	56
5.8	Fração de cisplatina ligada ($r = C_b/C_{bp}$) em função da concentração de fármaco livre em solução (C_f). <i>Linha tracejada</i> : ajuste realizado utilizando - se a equação 5.8. Deste ajuste obtivemos os valores dos parâmetros ajustáveis, $K_i = (1,5 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n = 3,6 \pm 1,0$ e $r_{\max} = 0,56 \pm 0,12$	57

RESUMO

CRISAFULI, Fabiano Augusto de Paula, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012 **Caracterização da interação DNA - cisplatina usando pinça óptica e videomicroscopia**. Orientador: Márcio Santos Rocha. Coorientadores: José Ésio Bessa Ramos Júnior e Marcelo Lobato Martins.

Neste trabalho, utilizando a técnica de pinçamento óptico, foi possível estudar as mudanças nas propriedades mecânicas dos complexos DNA - cisplatina, em função de alguns parâmetros de interesse, tais como: o tempo de difusão do fármaco e a concentração do fármaco na amostra. Um modelo foi proposto para explicar o comportamento do comprimento de persistência em função da concentração do fármaco, utilizando - se apenas os dados obtidos a partir dos experimentos de estiramento. Tal análise nos permitiu mostrar que a cisplatina se liga cooperativamente à molécula de DNA. Além disso, a compactação da molécula de DNA pela ação da cisplatina foi caracterizada a partir do estudo da cinética de algumas propriedades mecânicas, tais como: o raio de giro e a distância máxima ponta - à - ponta dos complexos.

ABSTRACT

CRISAFULI, Fabiano Augusto de Paula, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012 **Characterization of DNA - cisplatin interaction by using optical tweezers and videomicroscopy**. Adviser: Márcio Santos Rocha. Co-advisers: José Êsio Bessa Ramos Júnior and Marcelo Lobato Martins.

In this work, by using the optical tweezers technique, it was possible to study the changes on the mechanical properties of DNA - cisplatin complexes, as a function of some parameters such as the drug diffusion time and its concentration in the sample. A model was proposed in order to explain the behavior of the persistent length as a function of drug concentration, using only the data obtained from single molecule stretching experiments. Such analysis allow us to show that cisplatin binds cooperatively to the DNA molecule. In addition, DNA molecule compactation by the action of the drug, was characterized from studying the kinetics of some mechanical properties such as the radius of gyration and the maximum average end - to - end distance.

Capítulo 1

Introdução

Em 1969, Arthur Ashkin e seus colaboradores, trabalhando nos laboratórios Bell, nos Estados Unidos, deram início a uma verdadeira revolução na Física e na Biologia, utilizando lasers para o aprisionamento e manipulação de pequenas partículas dielétricas [1]. Ashkin e seus colaboradores ficaram particularmente fascinados com a grande aceleração que as partículas atingiam ao serem incididas por um laser com poucos watts de potência.

Inicialmente, as pinças ópticas foram desenvolvidas para a manipulação e aprisionamento de átomos, mas foi na Biologia, por volta de 1987, que essa poderosa ferramenta experimental encontrou sua maior utilidade [2,3]. Uma das mais importantes aplicações das pinças ópticas é no estudo de motores moleculares. Essas enzimas mecânicas interagem com os microtúbulos ou com os filamentos de actina da célula para gerar forças responsáveis pela motilidade celular, ação muscular e movimento de organelas celulares dentro das células [4]. Outras importantes aplicações podem ser encontradas nas referências [5,6]. Atualmente, as pinças ópticas são utilizadas em vários tipos de experimentos e, no nosso caso, utilizamos a pinça óptica para realizar estiramentos da molécula de DNA, a fim de estudar as propriedades mecânicas da molécula ao interagir com fármacos utilizados no tratamento de câncer. Neste trabalho utilizamos o fármaco cisplatina, largamente utilizado em quimioterapia no combate a diversos tipos de câncer, dentre os quais podemos citar: cabeça, pescoço, pulmões e sistema geniturinário [7].

1. Introdução

De uma maneira geral, as pinças ópticas são ferramentas experimentais bastante simples, sendo compostas basicamente por um laser fortemente focalizado por uma objetiva de grande abertura numérica*. Veremos detalhadamente no Capítulo 2 quais são as condições para que ocorra o pinçamento óptico.

Utilizando o protocolo de Shivashankar *et al.* [8] uma ponta da molécula de DNA é fixada em uma lamínula de microscópio e a outra ponta é fixada a uma microesfera de poliestireno. Utilizando a pinça óptica para capturar a microesfera é possível então esticar a molécula de DNA. Uma vez conhecida a constante de força[†] da pinça óptica, é possível obter todos os parâmetros de interesse utilizando - se a expressão derivada por Marko e Siggia [9]. Todo o procedimento será discutido detalhadamente no Capítulo 4.

Nosso trabalho consiste basicamente em determinar as curvas de força x extensão para a molécula de DNA e os complexos DNA - fármacos. Utilizando o modelo teórico deduzido por Marko e Siggia [9], ajustamos as curvas obtidas e extraímos dois parâmetros importantes para nossas análises: o comprimento de persistência[‡] e o comprimento de contorno[§]. Na tentativa de elucidar as interações da molécula de DNA com a cisplatina, determinamos vários gráficos, como por exemplo: do comprimento de persistência x concentração do fármaco e da distância máxima ponta - à - ponta do polímero x tempo de difusão do fármaco, para uma dada concentração fixa do fármaco. Os gráficos serão apresentados e discutidos no Capítulo 4.

Em resumo, no Capítulo 2, discutimos os aspectos gerais de uma pinça óptica e seu princípio de funcionamento.

No Capítulo 3, discutimos algumas características importantes da molécula de DNA e, em seguida, demonstramos a expressão de Marko e Siggia para polímeros semiflexíveis. Por último, discutimos a equação de Hill para descrever a interação de

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

[†]A constante de força κ é um parâmetro que mostra o quão forte é a pinça óptica. Para uma microesfera de raio fixo, a pinça óptica gera uma força do tipo $F = -\kappa x$, ou seja, o potencial gerado pela pinça óptica é harmônico para pequenos deslocamentos x .

[‡]O comprimento de persistência fornece informação sobre a elasticidade da molécula.

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

1. Introdução

ligantes em solução.

No Capítulo 4, apresentamos todo o procedimento experimental para a caracterização da interação DNA-Cisplatina.

No Capítulo 5, apresentamos e discutimos todos os resultados obtidos.

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

Capítulo 2

Aspectos gerais de uma pinça óptica

Neste capítulo, discutiremos alguns aspectos teóricos relacionados ao fenômeno do pinçamento óptico. Serão apresentados também todos os procedimentos para a caracterização da pinça óptica e a montagem experimental utilizada neste trabalho.

2.1 Princípio de funcionamento

Com o advento da teoria eletromagnética no século XIX, foi possível demonstrar que a luz é capaz de exercer força em um objeto ao transferir momento para ele. É exatamente esse fato que dá origem ao pinçamento óptico, quando a luz do laser transfere momento para uma microesfera ou um outro objeto, exercendo assim força.

Para termos ideia da ordem de grandeza das forças envolvidas no pinçamento óptico, imagine um laser com alguns mW* de potência, incidindo radialmente sobre uma microesfera absorvedora. Cada fóton absorvido possui um momento dado por

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

onde $\vec{k}$ é o seu vetor de onda e $\hbar$ é a constante de Planck dividida por 2π . Em módulo, podemos escrever que

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

onde c é a velocidade da luz, ω é a frequência angular da luz incidente e $E = \hbar\omega$ é a

*Potência típica usada nesse tipo de experimento.

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

energia de cada fóton. Para N fótons, teremos que $E_{tot} = N\hbar\omega = NE$.

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

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

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

Deste modo, podemos estimar o valor da força na equação (2.3), como sendo

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

De fato, em experimentos com pinças ópticas, as forças estão na escala de pico-Newton.

Para entendermos qualitativamente o funcionamento da pinça óptica, devemos analisar as forças que atuam na microesfera. A primeira força, chamada pressão de radiação, surge sempre que a luz é refletida ou absorvida ao incidir numa interface entre dois meios. A expressão para a força de radiação, devido a um raio, pode ser escrita como

$$F \propto \frac{P_{raio}}{v}, \quad (2.5)$$

com

$$v = \frac{c}{n_m}, \quad (2.6)$$

onde P_{raio} é a potencia do raio e n_m é o índice de refração do meio de incidência.

Além da pressão de radiação, a luz é capaz de exercer um segundo tipo de força sobre um objeto, ao ser refratada por este. Esta força surge devido ao fato do momento linear total do sistema raio - objeto ter que ser conservado [†]. O raio de luz, ao refratar em um objeto, em geral é desviado de sua trajetória original se os índices de refração do meio de incidência e do objeto forem diferentes. Com isso, o raio refratado terá um momento linear em uma direção diferente do raio incidente. Então,

[†]Esse fato é devido ao teorema de conservação do momento linear.

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

pela 2ª Lei de Newton, o objeto sofrerá uma variação de momento de mesmo módulo e sentido contrário à variação de momento do raio. Imaginemos que esse objeto seja um microesfera. Uma vez que a microesfera possui massa, então consequentemente surgirá uma força sobre ela para fazer variar seu momento.

Toda nossa análise acima foi feita para um único raio. Agora, imaginemos que vários raios atinjam a microesfera, de forma que cada raio incidente dá origem a um raio refletido e um raio refratado. Os raios refletidos darão origem à pressão de radiação, enquanto que os raios refratados darão origem a forças semelhantes às citadas no parágrafo anterior. Se o índice de refração da microesfera for maior que o índice de refração do meio no qual ela está inserida e se o laser for fortemente focalizado, então os raios refratados darão origem à forças de gradiente, que tenderão a levar a microesfera para o foco do feixe. A competição entre as duas forças, pressão de radiação e força de gradiente, é que dá origem ao pinçamento óptico.

Para visualizar melhor este efeito, vamos começar fazendo uma análise usando o regime da óptica geométrica. Nesse regime, o raio da microesfera é muito maior que o comprimento de onda da luz ($a \gg \lambda$).

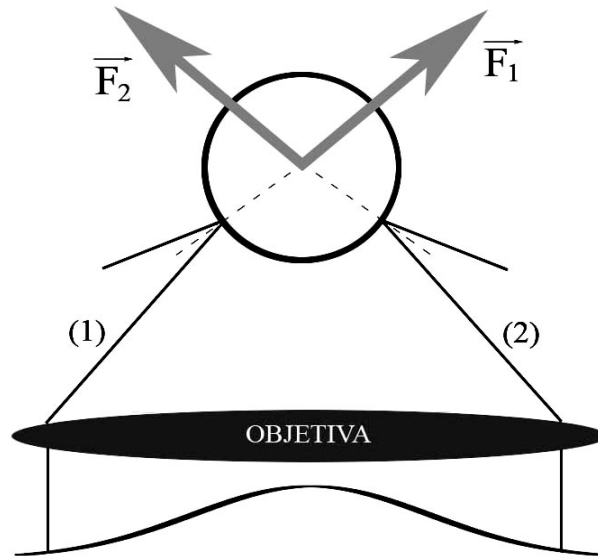


Figura 2.1: Pressão de radiação. A força resultante nesse caso, empurra a microesfera no sentido de incidência do feixe.

A Figura 2.1 mostra dois raios do feixe de extremidades opostas, bem como

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

os raios refletidos na superfície da esfera. O desvio do raio (1) dá origem à força $\vec{F}_1$ na microesfera, e o desvio do raio (2) dá origem à força $\vec{F}_2$ na microesfera. A força resultante, nesse caso, tende a empurrar a microesfera no sentido de incidência do feixe.

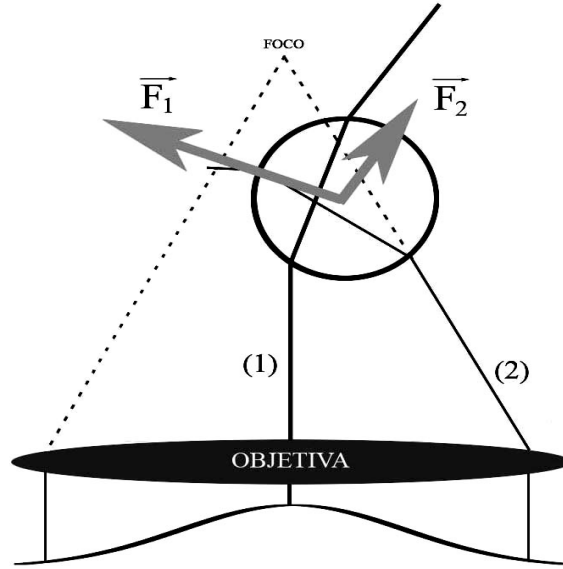


Figura 2.2: Efeito da refração. A microesfera está situada na região abaixo do foco e, nesse caso, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe.

Para finalizar nossa análise no limite da óptica geométrica, vamos discutir os efeitos da refração. A Figura 2.2 mostra uma situação na qual a microesfera está situada em uma região abaixo do foco. O raio (1) sofre um desvio ao passar pela microesfera, portanto sofrerá uma variação em seu momento linear. Para que o momento linear total do sistema raio - microesfera seja conservado, a esfera terá que sofrer uma variação de momento linear de mesma intensidade e sentido contrário à variação de momento linear do raio (1). De fato é isso que ocorre, dando origem a força $\vec{F}_1$ que aparece na Figura 2.2. A mesma coisa acontece com o raio (2), mas, como temos um perfil gaussiano de intensidade do laser, a força $\vec{F}_1$ será maior, em módulo, que a força $\vec{F}_2$, de forma que a força resultante aponta para esquerda e para cima, empurrando a microesfera para o foco do feixe.

A Figura 2.3 mostra uma situação na qual a microesfera está situada em uma região acima do foco. Analogamente ao que acontece na situação na qual a esfera está situada em uma região abaixo do foco, surgirão forças na microesfera de forma a

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

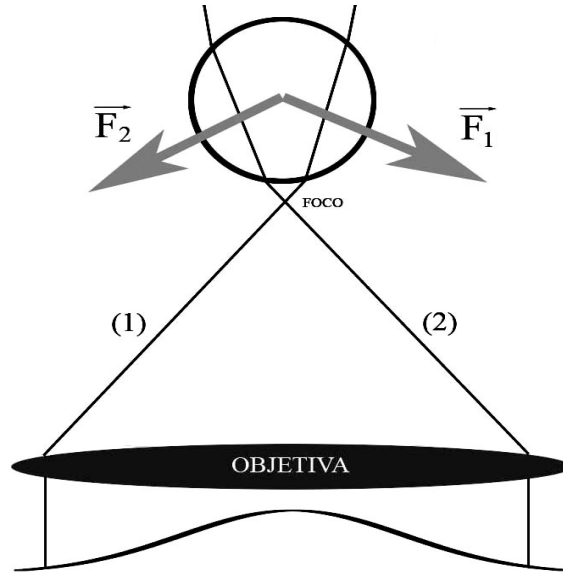


Figura 2.3: Efeito da refração. A microesfera está situada na região acima do foco e, mais uma vez, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe.

conservar o momento linear total do sistema raio - microesfera. Agora, no caso onde a microesfera está situada em uma região acima do foco, a força resultante na microesfera apontará para baixo, de forma a empurrar novamente a microesfera na direção do foco do feixe.

Devemos salientar, entretanto, que toda a discussão acima foi feita no limite da óptica geométrica, quando o raio da microesfera é muito maior que o comprimento de onda da luz incidente ($a \gg \lambda$).

Observe nas Figuras 2.2 e 2.3 que consideramos o índice de refração da microesfera maior que o índice de refração do meio. De fato, essa é uma condição fundamental para que ocorra o pinçamento.

Quando o raio da microesfera é muito menor que o comprimento de onda da luz incidente, estamos no chamado limite Rayleigh. Nesse caso, a esfera se comporta como um dipolo elétrico induzido em um campo elétrico. A força que atua na microesfera é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico da radiação incidente. Essa força faz com que a microesfera se mova para a direção de maior intensidade do campo, ou seja, o foco. Mais uma vez, a microesfera ficará presa na região focal [10,11].

Podemos perceber, então, que as pinças ópticas são ferramentas experimentais

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

importantes na manipulação de pequenas partículas. Sua aplicação pode ser encontrada em diversas áreas, principalmente na Física Biológica.

Recentemente, os pesquisadores A. Mazolli, P. A. M. Neto e H. M. Nussenzveig, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, desenvolveram uma teoria capaz de prever, quantitativamente, a força do laser sobre uma microesfera de raio e índice de refração arbitrários. A teoria, cujo nome os autores sugerem, MDSA (Mie Debye Spherical Aberration), é a mais geral sobre as pinças ópticas [12,13].

2.2 Montagem experimental

A Figura 2.4 mostra um esquema detalhado da montagem experimental utilizada em nossas medidas.

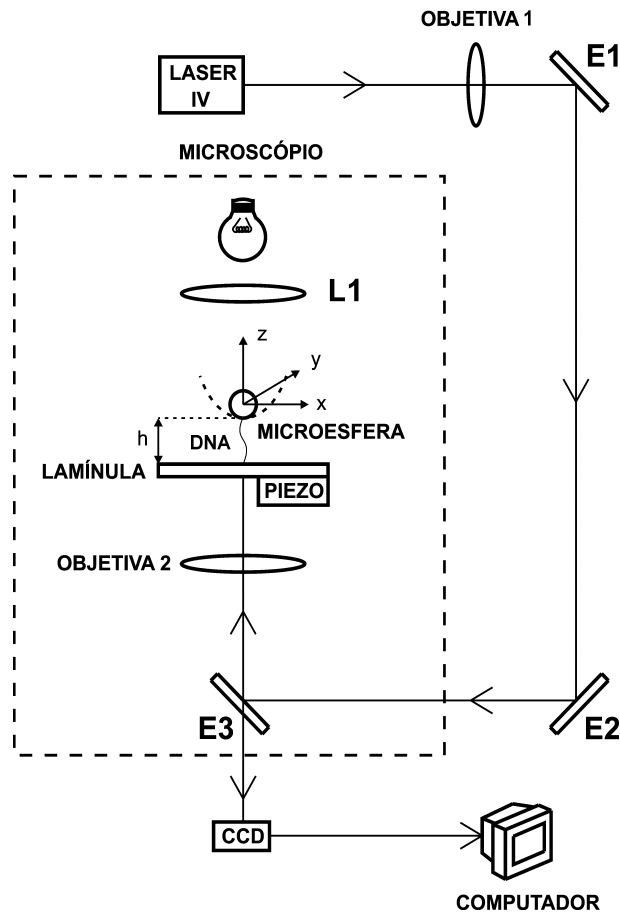


Figura 2.4: Montagem experimental utilizada para as medidas.

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

A região entre as linhas pontilhadas representa o microscópio Nikon Eclipse Ti-S, com óptica corrigida no infinito, objetiva de 100X e abertura numérica $NA = 1,4$. Essa objetiva é a responsável por focalizar o feixe de laser infravermelho, que é a pinça óptica propriamente dita.

A radiação é emitida por um laser infravermelho (IV), modelo SLD5422-H1, $\lambda = 832$ nm, potência máxima 150 mW e operando no modo TEM_{00} .

A objetiva 1 é necessária pelo fato do laser IV emitir um feixe divergente[‡]. O emissor do laser IV é posicionado no foco da objetiva 1, de forma que o feixe emerge da objetiva 1 com um perfil cilíndrico.

E_1 e E_2 são espelhos que permitem um melhor alinhamento da pinça óptica.

O primeiro componente óptico do microscópio, E_3 , é um espelho dicróico que possui uma alta transmitância para a luz visível e uma alta reflectância para a luz infravermelha.

A objetiva 2 é a responsável por focalizar o laser e prender as microesferas na região focal.

O motor piezoelétrico, representado na Figura 2.4, é o responsável por deslocar o estágio do microscópio e, conseqüentemente, a lamínula com precisão nanométrica.

A lente L_1 , representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio.

Abaixo da lente L_1 está representado o poço de potencial gerado pela pinça óptica, o sistema de referência utilizado e a nossa solução de DNA e microesferas. Note que estamos representando a situação na qual uma das pontas da molécula de DNA se encontra adsorvida na microesfera e a outra ponta adsorvida na lamínula, que é o nosso porta amostras. A altura h representa a distância do centro de massa da microesfera pinçada em relação à lamínula.

Finalmente, em uma das saídas do microscópio é conectada uma câmera CCD, modelo Jai CM-140GE, que envia as imagens até o monitor e o computador, permitindo assim que todo o experimento seja visualizado e filmado.

[‡]O laser que utilizamos na maioria dos nossos experimentos foi gentilmente emprestado pelo Prof. Dr. Oscar Nassif de Mesquita da UFMG. No laser atual utilizado em nosso laboratório, não é mais necessária a utilização da objetiva 1, uma vez que o feixe já emerge com um formato cilíndrico do emissor.

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

2.3 Calibração da pinça óptica

Como explicado em linhas gerais no Capítulo 1, a constante de força, κ , é o parâmetro que define o quão forte é a pinça óptica. Para fazer a calibração da pinça óptica utilizamos o método de Stokes, que consiste em deslocar a lamínula do microscópio com velocidade $\vec{v}$ constante e medir a nova posição de equilíbrio da microesfera.

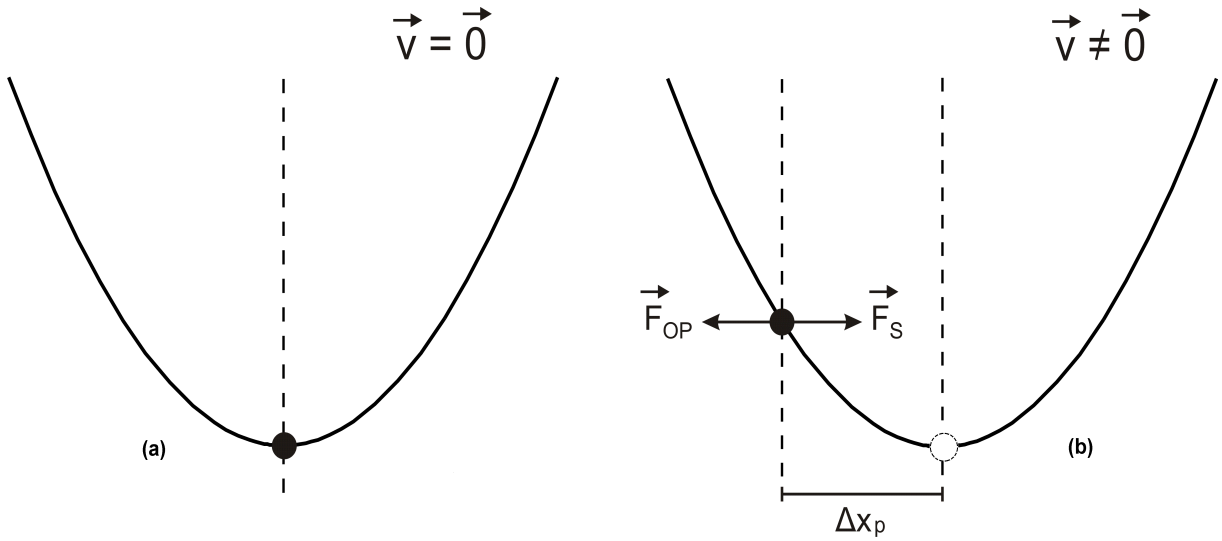


Figura 2.5: (a) Microesfera presa na posição de equilíbrio no poço de potencial gerado pela pinça óptica. (b) Ao ligar o motor, a microesfera é empurrada pelo fluido e fica em equilíbrio em uma nova posição no poço de potencial gerado pela pinça óptica.

A Figura 2.5a mostra a situação na qual a microesfera se encontra em repouso no fundo no poço de potencial. Nesse caso, como o motor que movimenta a lamínula está parado, então a velocidade média, $\bar{v}$, da microesfera é nula e, consequentemente, a força de Stokes também é nula. A microesfera presa no poço de potencial da pinça óptica, que é aproximadamente harmônico, é um oscilador harmônico browniano, estando sujeito à força óptica restauradora e a força aleatória devido à interação com o fluido. A Figura 2.5b, mostra a situação na qual a lamínula se movimento com uma velocidade constante $\vec{v}$, movimentando o fluido no qual as microesferas estão imersas. Esse movimento do fluido dá origem à uma força de atrito, chamada de força de Stokes, que faz com que a microesfera atinja uma nova posição de equilíbrio dentro do poço de potencial. Nessa nova posição de equilíbrio a força de Stokes é igual, em módulo, à força óptica gerada

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

pelo laser.

A força de Stokes pode ser escrita como,

$$\vec{F}_s = -\gamma\vec{v} , \quad (2.7)$$

onde γ é o coeficiente de atrito viscoso e $\vec{v}$ é a velocidade.

O coeficiente de atrito viscoso sobre uma microesfera em solução aquosa é dada pela expressão aproximada [14],

$$\gamma = 6\pi\eta_a a \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h} \right)^5 \right]^{-1} , \quad (2.8)$$

onde η_a é a viscosidade da água, solução na qual as microesferas estão imersas, a é o raio da microesfera e h é a distância do centro da microesfera à lamínula.

A viscosidade da água como função da temperatura é dada pela expressão empírica [15],

$$\eta_a = 10^{-3} \left[0,26 + 1,51 \exp \left(\frac{-t_c}{29} \right) \right] , \quad (2.9)$$

onde t_c é a temperatura em graus Celsius e η_a está em unidades SI.

Na nova posição de equilíbrio, mostrada na Figura 2.5b, podemos escrever que, em módulo, $F_{op} = F_s$, ou seja,

$$\kappa\Delta x_P = \gamma v . \quad (2.10)$$

Isolando κ , temos que

$$\kappa = \frac{\gamma v}{\Delta x_P} . \quad (2.11)$$

Uma vez conhecida a temperatura, a equação 2.9 é usada para encontrar o valor da viscosidade. O raio a das microesferas é determinado pelo fabricante e, no nosso caso, o valor é $1,5 \mu m$. A altura h é encontrada movimentando-se o foco do microscópio. Para descobrir o valor de Δx_P , fazemos a filmagem de todo o experimento

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

utilizando o programa *StreamPix*, que faz a captura das imagens formando um vídeo. O procedimento é basicamente composto por duas etapas:

1) Iniciamos o vídeo com a microesfera parada[§] dentro do poço de potencial da pinça, afim de encontrar a posição do centro de massa da microesfera quando ela se encontra como mostrado na Figura 2.5a.

2) Após aproximadamente 5 segundos, o motor que movimenta a lamínula é ligado e a microesfera atinge a nova posição de equilíbrio, como mostrado na Figura 2.5b. Utilizando o programa *ImageJ*, que fornece os valores do centro de massa da microesfera em função do tempo, é possível determinar o valor de Δx_P .

Uma vez conhecidas todas as variáveis, podemos substituí-las na equação 2.11 e encontrar o valor da constante de força da pinça óptica. Em nossos experimentos, a constante de força era de $(0,40 \pm 0,04)$ pN/ μ m, o que fornece uma força máxima de aproximadamente 1 a 2 pN para realizar os estiramentos da molécula da DNA. De fato, essa faixa de forças gera grandes vantagens no nosso caso, entre as quais podemos citar:

(i) Como veremos mais adiante, a equação 3.32 só pode ser utilizada no regime de baixas forças (< 5 pN), no chamado regime entrópico[¶], portanto, é esperado que tal equação descreva melhor os experimentos realizados no limite de baixas forças.

(ii) Nessa faixa, nenhuma histerese é encontrada nas curvas de forças quando os complexos de DNA - cisplatina são esticados e relaxados dentro de uma grande faixa de velocidades, o que pode ocorrer em experimentos que utilizam valores altos para as forças [16].

(iii) O equilíbrio químico entre a molécula de DNA e a cisplatina não é significativamente alterado nesse regime de forças [17]. É bem estabelecido, hoje em dia, que altas forças podem alterar o equilíbrio químico entre a molécula de DNA e os fármacos em solução. De fato, recentemente Vladescu *et al.* mostraram que importantes

[§]Estritamente falando a microesfera não fica parada dentro do poço de potencial da pinça, pelo contrário, ela executa movimento browniano. Diante disso, a microesfera é filmada durante aproximadamente 5 segundos e posteriormente fazemos a média dos valores do centro de massa em função do tempo, usando-se dois programas: o *ImageJ* que fornece a posição do centro de massa da microesfera em função do tempo e o *Kaleida Graph*, que importa os dados e calcula as médias.

[¶]Chamamos de regime entrópico, o intervalo de intensidades de forças no qual não há danos à molécula de DNA, ou seja, as suas ligações químicas não são esticadas nem rompidas.

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

parâmetros de interação dependem fortemente das forças aplicadas aos complexos DNA - fármacos [17] e, portanto, é esperado que algumas propriedades mecânicas desses complexos, como por exemplo, o comprimento de persistência e de contorno ^{||}, sejam também dependentes do regime de forças empregado, uma vez que elas dependem da quantidade de fármaco ligado ao DNA.

^{||}Essas duas grandezas serão explicadas detalhadamente na seção 3.3.

Capítulo 3

A molécula de DNA

Nesse capítulo apresentaremos alguns aspectos biológicos importantes sobre a molécula de DNA e, além disso, faremos a dedução matemática do modelo Worm - Like Chain (cadeia vermiforme), obtido por Marko e Siggia em 1995 [9]. O modelo WLC descreve de maneira satisfatória o comportamento de polímeros semiflexíveis ao serem submetidos a uma força externa.

3.1 Um breve histórico da molécula de DNA

Em 1869, Friedrich Miescher, um jovem físico suíço, consegue isolar o material genético do núcleo celular de leucócitos* dando início a uma grande busca pela molécula que seria a responsável pela transmissão do material genético de geração para geração [18].

Naquela época, as proteínas eram consideradas o principal alvo para o entendimento do funcionamento celular. Em seus experimentos, Miescher mostrou que as proteínas e os lipídios eram os principais componentes do citoplasma celular. Ainda durante esses experimentos, Miescher notou que uma substância precipitava - se da solução quando um ácido era adicionado e dissolvido novamente após a adição de uma base[†]. Pela primeira vez, um precipitado de DNA era obtido. Como essa substância

*Os leucócitos, ou glóbulos brancos, são células produzidas pela medula óssea que tem como principal função a produção de anticorpos.

[†]Segundo Arrhenius, uma base é qualquer substância que libera única e exclusivamente o ânion OH^- em solução aquosa.

3. A molécula de DNA

tinha origem no núcleo celular, Miescher a denominou como “nucleína”.

Para estudar essa substância detalhadamente, Miescher precisou criar um protocolo que permitisse isolar essa substância das proteínas que compunham o precipitado.

Em uma carta endereçada a um outro grande pesquisador, Wilhelm His, Miescher reporta a descoberta da misteriosa substância [18]:

“In my experiments with low alkaline liquids, precipitates formed in the solutions after neutralization that could not be dissolved in water, acetic acid, highly dilute hydrochloric acid or in salt solution, and therefore do not belong to any known type of protein.”

Na tentativa de comprovar que a misteriosa substância não era um tipo de proteína, Miescher aqueceu o precipitado e descobriu a existência de vários elementos comumente encontrados em moléculas orgânicas: carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Esse experimento mostrou ainda, que a substância “nucleína” continha uma grande quantidade de fósforo e, diante disso, Miescher concluiu que essa substância era diferente de qualquer outro tipo de proteína conhecida na época. Em suas próprias palavras Miescher escreveu:

“We are dealing with an entity *sui generis* not comparable to any hitherto known group”.

Poucos anos após a morte de Miescher, o cientista Albrecht Kossel faz uma importante descoberta: a substância conhecida como “nucleína” era formada por quatro bases nitrogenadas e moléculas de açúcar[‡].

Mesmo com os recentes avanços da época, a maioria dos cientistas conservadores permaneciam convictos de que as proteínas mais complexas eram as responsáveis por carregar a informação genética. O argumento desses cientistas era de que as proteínas eram formadas por vinte diferentes aminoácidos enquanto a “nucleína” era composta

[‡]Hoje sabemos que os nucleotídeos são formados pelo açúcar, a desoxirribose, um grupo fosfato e a base nitrogenada. Embora a descoberta de Kossel estivesse incompleta, ela não deixou de ser um grande avanço para a época.

3. A molécula de DNA

por apenas quatro nucleotídeos - muito pouco, eles acreditavam, para armazenar uma quantidade enorme de informação genética.

Embora descobrir a base da vida celular fosse um dos mais fundamentais problemas daquela época, ninguém havia realmente compreendido a real importância das descobertas de Miescher até a segunda metade do século XX, quando James Watson e Francis Crick desvendaram a estrutura da molécula de DNA[§] [19,20].

3.2 Aspectos biológicos

A molécula de DNA é um polímero longo que possui apenas quatro unidades básicas, chamados monômeros. Os monômeros da molécula de DNA são conhecidos por nucleotídeos. Do ponto de vista estrutural, os nucleotídeos são formados por um grupo fosfato (PO_4^-), um açúcar do tipo pentose[¶] e uma base nitrogenada. Os nucleotídeos diferem entre si apenas nas bases nitrogenadas. No caso do DNA, as quatro bases nitrogenadas são: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) [21].

A adenina (A) e a guanina (G) são semelhantes em sua estrutura química, sendo denominadas de purinas enquanto a timina (T) e a citosina (C) são denominadas pirimidinas.

Em 1950, Erwin Chargaff, estudando uma grande variedade de organismos, estabeleceu uma fórmula empírica sobre as quantidades de cada tipo de nucleotídeo encontrados no DNA [22]:

(i) A quantidade total de nucleotídeos pirimidínicos (T+C) é sempre igual a quantidade total de nucleotídeos purínicos (A+G).

(ii) A quantidade de T é sempre igual a quantidade de A, e a quantidade de C é sempre igual à quantidade de G. Mas a quantidade de A+T não é necessariamente igual a quantidade de C+G. Essa proporção varia entre organismos diferentes, mas é praticamente a mesma em células de diferentes tecidos no mesmo organismo.

A Figura 3.1 mostra a estrutura dos nucleotídeos. As bases nitrogenadas se

[§]Por essa grande descoberta, os dois pesquisadores foram laureados com Prêmio Nobel de Medicina de 1962, juntamente com Maurice Wilkins.

[¶]No caso da molécula de DNA, a pentose é a desoxirribose.

3. A molécula de DNA

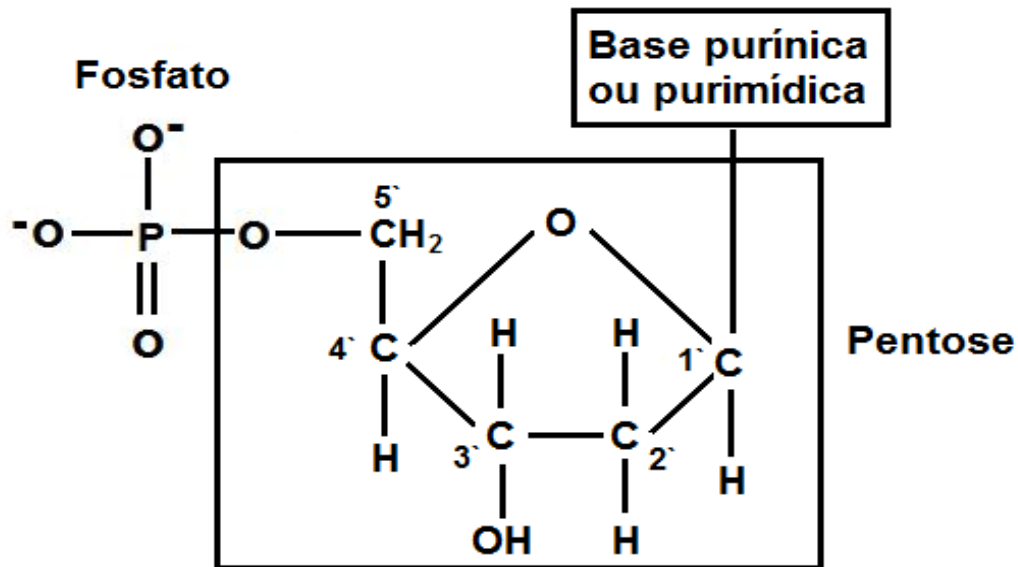


Figura 3.1: A estrutura dos nucleotídeos.

unem ao carbono 1' da pentose através de uma ligação glicosídica^{||} enquanto o fosfato se liga ao carbono 5' também da pentose.

A molécula de DNA é formada por duas fitas, que se mantêm unidas através de pontes de hidrogênio. Já os nucleotídeos, em uma mesma fita, se unem através de ligação fosfodiéster^{**}.

Os padrões das pontes de hidrogênio foram definidos por Watson e Crick em 1953, no qual uma purina se liga com uma pirimidina. No caso da molécula de DNA, a guanina se liga com a citosina através de três pontes de hidrogênio, enquanto a adenina se liga com a timina através de duas pontes de hidrogênio. É justamente esse pareamento específico das bases que permite a replicação da molécula de DNA [21].

A Figura 3.2 mostra um desenho esquemático da molécula de DNA, com suas respectivas bases, além das pontes de hidrogênio que mantêm unidas as duas fitas que compõem a molécula de DNA.

^{||}A ligação glicosídica é uma ligação covalente na qual o grupo hidroxila da pentose se une ao hidrogênio da base nitrogenada, produzindo água.

^{**}Essa ligação ocorre entre o grupo hidroxila ligada ao carbono 3' da pentose de um nucleotídeo e o fosfato no nucleotídeo seguinte [11].

3. A molécula de DNA

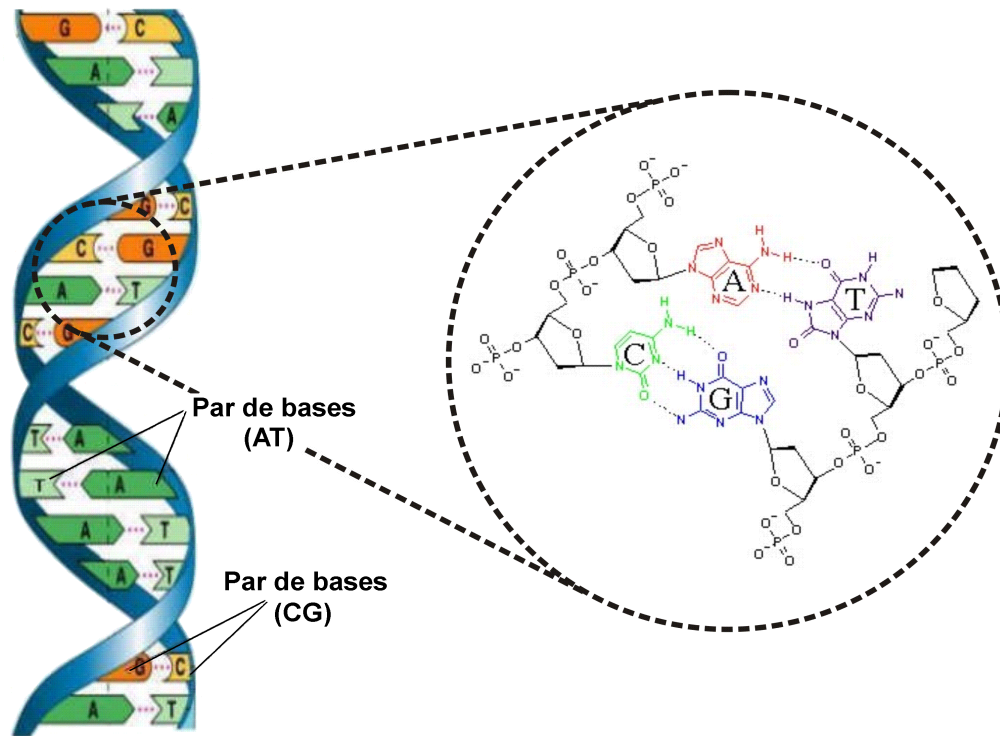


Figura 3.2: Desenho esquemático da molécula de DNA, com o pareamento das bases nitrogenadas e as pontes de hidrogênio.

3.2.1 O DNA do fago λ

O fago λ é um vírus que infecta a bactéria *E. Coli* [23]. O DNA do fago λ é ideal para nossos experimentos, devido ao seu tamanho. Uma molécula de λ - DNA possui cerca de 48.500 pares de base, o que resulta em um comprimento de contorno médio de $16,5\mu\text{m}$ [11].

3.3 Mecânica de polímeros semiflexíveis

Nesta seção, faremos a demonstração da famosa expressão obtida por Marko e Siggia em 1995 [9], que é o modelo teórico utilizado neste trabalho para a obtenção das propriedades mecânicas dos complexos DNA - cisplatina. As demonstrações realizadas nesta seção foram baseadas nas referências [9,11,24].

3. A molécula de DNA

3.3.1 Energia de curvatura

Para iniciar nossa demonstração, vamos começar com o exemplo mais simples, a vareta flexível. A Figura 3.3 mostra uma vareta rígida de comprimento L_c que ao ser deformada, se transforma em um semicírculo de raio R_c .

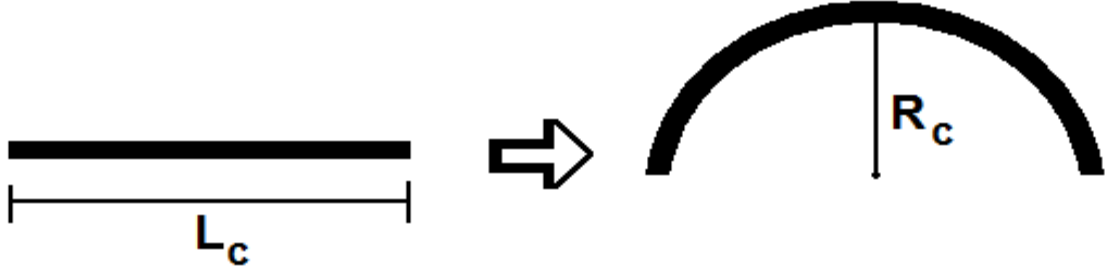


Figura 3.3: Vareta rígida de comprimento L_c que, ao ser deformada, se transforma em um semicírculo de raio R_c .

O cálculo da energia necessária para realizar essa deformação pode ser encontrado na referência [25], e é dado por

$$E_{curvatura} = \frac{\kappa_f L_c}{2R_c^2}, \quad (3.1)$$

onde κ_f é a rigidez flexural da vareta, dada por

$$\kappa_f = YI, \quad (3.2)$$

onde Y é o módulo de Young da vareta e I é o momento geométrico de segunda ordem da seção reta^{††}.

3.3.2 O modelo de Kratky - Porod

O modelo de Kratky - Porod fornece a generalização da equação 3.1, para a energia de curvatura de um polímero. A equação 3.1 pode ser generalizada se notarmos que o termo $1/R_c$ é a curvatura de um semicírculo, de forma que para uma curva

^{††}O momento geométrico de segunda ordem da seção reta é definido de maneira similar ao momento de inércia convencional da massa. Em relação ao eixo x , por exemplo, temos, $I_x = \int y^2 dA$, sendo o plano xy perpendicular ao eixo da vareta.

3. A molécula de DNA

arbitrária, podemos substituir o termo $1/R_c^2$ por C^2 , onde C é a sua curvatura. Para obtermos a curvatura C , vamos utilizar a Figura 3.4 como guia.

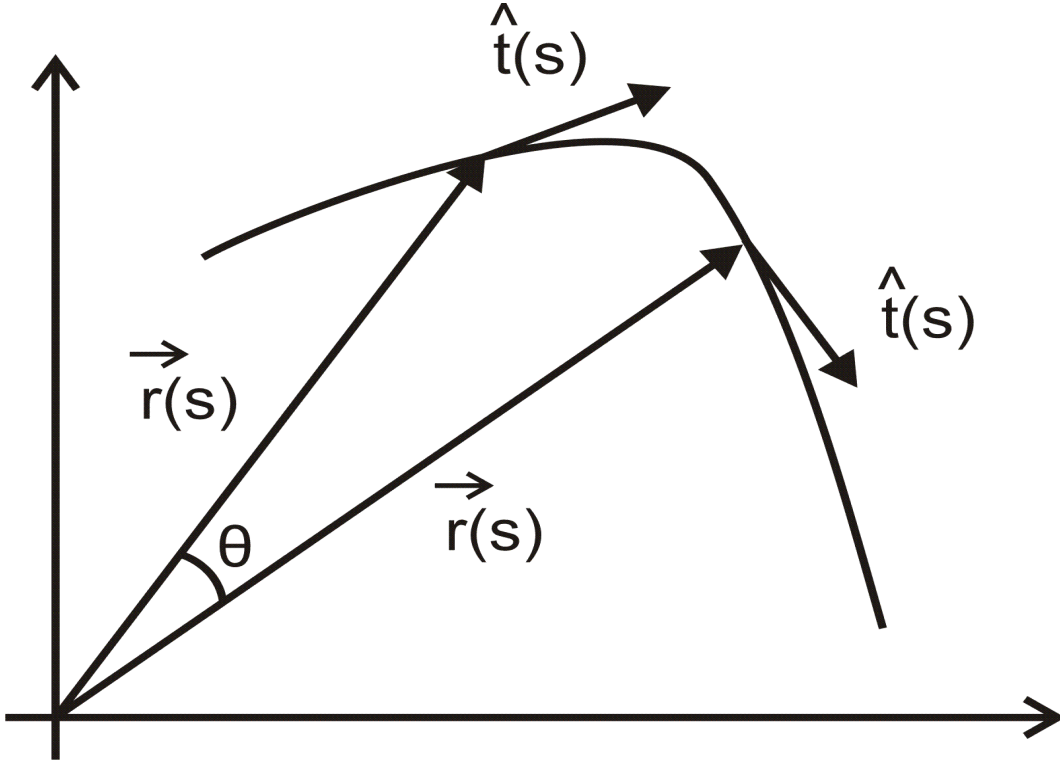


Figura 3.4: Variação do vetor posição e do vetor tangente unitário ao longo de uma curva arbitrária.

Na Figura 3.4, $\vec{r}(s)$ é o vetor posição que localiza um ponto da curva. O vetor unitário $\hat{t}(s)$ é o vetor tangente à curva em cada ponto.

Do cálculo diferencial, temos a seguinte relação

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}, \quad (3.3)$$

e a curvatura é dada por

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|. \quad (3.4)$$

Substituindo - se a equação 3.4 na equação 3.1 obtemos uma expressão mais geral para a energia de curvatura de uma vareta rígida. Além disso, realizando uma integração para a energia de curvatura por unidade de comprimento, ao longo de um

3. A molécula de DNA

polímero de forma arbitrária, obtemos de imediato o modelo de Kratky - Porod, que é dado pela equação

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds . \quad (3.5)$$

3.3.3 Elasticidade entrópica e comprimento de persistência

Vamos considerar novamente a Figura 3.4. Seja $\hat{t}(0)$ o valor de $\hat{t}(s)$ na origem do polímero e θ o ângulo entre $\hat{t}(0)$ e $\hat{t}(s)$ para uma posição arbitrária s qualquer. Para um círculo de raio R_c , θ é o ângulo gerado pelo arco de comprimento s e, de imediato,

$$E_{arc} = \frac{\kappa_f s}{2R_c^2} = \frac{\kappa_f \theta^2}{2s} . \quad (3.6)$$

A magnitude das flutuações de curvatura, pode ser avaliada através do valor de $\langle \theta^2 \rangle$. Este valor quadrático médio é definido por

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E) d\Omega}{\int \exp(-\beta E) d\Omega} , \quad (3.7)$$

onde $d\Omega = \sin \theta d\theta d\phi$ é o elemento de ângulo sólido e $\beta = 1/k_B T$, sendo k_B a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta.

Se assumirmos o limite de pequenas curvaturas, podemos aplicar algumas simplificações, como por exemplo, $\sin \theta \sim \theta$ e $E \sim E_{arc}$. Fazendo uma mudança de variáveis (chamando $x^2 = \beta E_{arc}$), faz com que as integrais na equação 3.7 se transformem em integrais conhecidas, do tipo gaussiana. Logo, o resultado final obtido é

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta \kappa_f} . \quad (3.8)$$

O comprimento de persistência A do polímero é definido como

$$A = \beta \kappa_f . \quad (3.9)$$

O comprimento de persistência A nos dá uma ideia da rigidez da molécula. Quanto maior o valor de A , mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras. Por

3. A molécula de DNA

outro lado, quanto menor o valor de A , mais flexível é o polímero, apresentando muitas dobras.

A interpretação geométrica do comprimento de persistência pode ser obtida através do valor médio do produto escalar entre os vetores unitários $\hat{t}(0)$ e $\hat{t}(s)$. Repare que

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos \theta \rangle , \quad (3.10)$$

que tem valor máximo unitário.

Fazendo a aproximação para pequenas flutuações, onde θ é pequeno, podemos fazer a seguinte aproximação $\cos \theta \sim 1 - \theta^2/2$, de onde obtemos

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A} , \quad (3.11)$$

para a aproximação em primeira ordem.

O último termo da equação 3.11 é a expansão da função exponencial em primeira ordem. De fato, se levarmos em conta os demais termos da expansão, chegamos a seguinte expressão

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \exp \left(-\frac{s}{A} \right) , \quad (3.12)$$

onde observamos que o comprimento de persistência é o comprimento de correlação da cadeia polimérica, ou seja, ele mede a distância ao longo do polímero sobre o qual a orientação da cadeia fica descorrelacionada.

Utilizando - se a equação 3.12, podemos estimar a distância quadrática média $\langle r_{ee}^2 \rangle$ entre as pontas do polímero em função do comprimento de persistência A e do comprimento de contorno L , nos limites onde ele é muito rígido (quando $L \ll A$) ou muito flexível (quando $L \gg A$). Este cálculo pode ser encontrado no Apêndice A. Os resultados são:

(i) Para $L \gg A$ (limite flexível):

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong 2AL , \quad (3.13)$$

3. A molécula de DNA

(ii) Para $L \ll A$ (limite rígido):

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong L^2 . \quad (3.14)$$

No limite rígido, a distância quadrática média entre as extremidades do polímero é o próprio comprimento de contorno ao quadrado, uma vez que nesse regime o polímero é uma vareta rígida.

3.3.4 O modelo Worm - Like Chain (WLC) (modelo Cadeia Vermiforme)

O modelo Worm - Like Chain (WLC) (modelo Cadeia Vermiforme) descreve de maneira satisfatória o comportamento de polímeros semiflexíveis ao serem submetidos a uma força externa, tanto para estiramentos pequenos (próximos à conformação de equilíbrio) quanto para longos (próximos à conformação retilínea), desde que as forças aplicadas sejam suficientemente pequenas (< 5 pN). Esses dois limites serão tratados separadamente e, no final, obteremos a expressão válida para qualquer estiramento.

Estiramentos próximos da conformação de equilíbrio

Para pequenos estiramentos, a força pode ser aproximada pela lei de Hooke,

$$F = -kz , \quad (3.15)$$

onde z é o estiramento da molécula.

Podemos escrever a extensão z do polímero como a distância quadrática média entre as duas extremidades do polímero

$$z = \sqrt{\langle r_{ee}^2 \rangle} . \quad (3.16)$$

Mas, para o limite flexível ($L \gg A$), podemos usar a equação 3.13 para escrever

$$z \cong \sqrt{2AL} . \quad (3.17)$$

3. A molécula de DNA

Usando o princípio da equipartição da energia teremos que

$$\langle \frac{1}{2}kz^2 \rangle = \frac{3}{2}k_B T , \quad (3.18)$$

e usando a equação 3.17, achamos a constante de mola k ,

$$k = \frac{3k_B T}{2AL} . \quad (3.19)$$

Para finalizar, podemos escrever a força aproximada para este regime como

$$F = -\frac{3k_B T}{2A} \frac{z}{L} . \quad (3.20)$$

Estiramentos longe da conformação de equilíbrio

Neste regime, a molécula de DNA está bastante esticada. A energia aproximada para esse regime pode ser escrita como a energia do modelo de Kratky - Porod, excluindo o trabalho exercido pela força, para manter a molécula nesta configuração, ou seja,

$$E_{WLC} = \frac{1}{2}\kappa_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz , \quad (3.21)$$

onde a força F aqui é um vínculo, ou seja, um multiplicador de Lagrange para manter z constante.

Neste regime, $z \sim L$ de forma que o vetor $\hat{t}$ é praticamente paralelo à curva $\vec{r}(s)$, que descreve a conformação da molécula. Diante disso, a componente t_z se torna muito maior que t_x e t_y e, podemos escrever

$$\hat{t} = t_x \hat{i} + t_y \hat{j} + t_z \hat{k} \quad (3.22)$$

e

$$|\hat{t}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = |t_z|^2 + |t_\perp|^2 = 1 , \quad (3.23)$$

onde $|t_\perp|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2$.

3. A molécula de DNA

Uma vez que $|t_z| = \sqrt{1 - |t_\perp|^2}$ e $|t_\perp|^2 \ll 1$, podemos fazer a aproximação em primeira ordem

$$|t_z| \cong 1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} . \quad (3.24)$$

Como consequência da mesma aproximação, é possível escrever ainda que $z = \int_0^L |t_z| ds$. Substituindo estas relações na equação 3.21, obtemos

$$\begin{aligned} E_{WLC} &= \frac{1}{2} k_B T A \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^L \left(1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} \right) ds = \\ &= \frac{1}{2} k_B T \int_0^L \left[A \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - FL , \end{aligned} \quad (3.25)$$

onde fizemos a aproximação $\partial t / \partial s \cong \partial t_\perp / \partial s$ uma vez que t_z é praticamente constante ao longo do polímero.

Utilizando a transformada de Fourier para fazer a decomposição da energia em modos normais, temos

$$\tilde{t}_\perp(q) = \int ds \exp(iqs) t_\perp(s) , \quad (3.26)$$

onde obtemos como resultado

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_B T \int \frac{dq}{2\pi} \left[A q^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_\perp(q)|^2 - FL . \quad (3.27)$$

A partir da equação 3.27, podemos calcular o valor quadrático médio de $|t_\perp|$. Este cálculo foi realizado no Apêndice B, e o resultado obtido é

$$\langle |t_\perp|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}} . \quad (3.28)$$

Utilizando a aproximação $z/L \cong |t_z| \cong 1 - |t_\perp|^2/2$, teremos

$$\frac{z}{L} \cong 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{FA}} , \quad (3.29)$$

que ao isolar F , obtemos a expressão para a força no regime de longos estiramentos,

3. A molécula de DNA

$$F = \frac{1}{4} \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right] . \quad (3.30)$$

Estiramentos arbitrários

Uma pergunta bastante plausível que poderíamos fazer ao olhar para a equação 3.30 seria a seguinte: ao expandirmos a equação 3.30 em primeira ordem, obteríamos a equação 3.20, ou seja, a equação para estiramentos longos (equação 3.30) conteria a equação para pequenos estiramentos (equação 3.20)? Surpreendentemente, a resposta é não! De fato, ao expandirmos a equação 3.30, obtemos

$$F^{(1)} \cong \frac{k_B T}{A} \left(\frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right) , \quad (3.31)$$

que é diferente da equação 3.20.

Utilizando - se uma interpolação, Marko e Siggia solucionaram esse problema, ao acrescentar dois termos para fazer a correção da equação para grandes estiramentos. Esses dois termos, entretanto, são desprezíveis quando $z \sim L$ mas fornecem a expressão correta para pequenos estiramentos quando a expansão em primeira ordem é realizada. A correção utilizada foi somar o termo $z/L - 1/4$ dentro do colchete da equação 3.30. Com isso, obtemos a expressão de Marko e Siggia para a força entrópica da molécula de DNA em função da extensão [9],

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] . \quad (3.32)$$

A equação 3.32, apesar de ser válida para estiramentos arbitrários, possui ainda algumas limitações, por ser tratar de uma aproximação. Repare que a equação diverge quando fazemos $z = L$, portanto, sua validade vai até $z \sim 0,99L$ [9]. Além disso, a equação é válida somente quando as forças aplicadas não são suficientes para deformar as ligações químicas entre os nucleotídeos, no chamado limite entrópico.

3. A molécula de DNA

3.4 Interação DNA - ligantes

Nesta seção, faremos uma descrição da bioquímica básica dos modelos de interação entre ligantes, no equilíbrio químico. Faremos a demonstração da equação de Hill, que fornece alguns parâmetros químicos importantes, dentre os quais podemos citar: a constante de ligação aparente e o coeficiente Hill. Partiremos de um modelo mais simples, o modelo de Michaelis - Menten, para então chegar ao modelo de Hill para a interação entre ligantes.

3.4.1 O modelo de Michaelis - Menten

O modelo de Michaelis - Menten foi proposto em 1913 por Leonor Michaelis e Maud Menten para generalizar as ideias propostas por Victor Henri, que em 1903, apresentou suas ideias para a catálise enzimática [21].

Seja a reação química representada pela Figura 3.5.

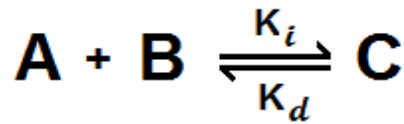


Figura 3.5: Reação química entre dois compostos A e B resultando no composto C.

Nesta reação química, duas moléculas diferentes, A e B, se associam para formar o composto C.

A constante de associação intrínseca, K_i , é dada pela razão entre a concentração do produto e o produto das concentrações dos solutos, ou seja,

$$K_i = \frac{[C]}{[A][B]} . \quad (3.33)$$

Por outro lado, a constante de dissociação, K_d é dada pelo inverso da constante de associação intrínseca

$$K_d = \frac{1}{K_i} = \frac{[A][B]}{[C]} . \quad (3.34)$$

3. A molécula de DNA

Agora, considere que $[A] \equiv C_f$, ou seja, a concentração de ligantes livres em solução (proteínas, fármacos), $[B] \equiv C_{bp} - C_b$, o número de sítios livres da molécula de DNA onde o ligante pode se ligar e $[C] \equiv C_b$, a concentração de sítios ligados. C_{bp} é a concentração de pares de base do DNA, uma constante.

Substituindo na equação 3.33, teremos

$$K_i = \frac{C_b}{C_f(C_{bp} - C_b)} . \quad (3.35)$$

Seja r a razão de sítios ligados por par de base, ou seja, $r = C_b/C_{bp}$. Substituindo - se na equação 3.35 e isolando r , obtemos a equação de Michaelis - Menten

$$r = \frac{K_i C_f}{1 + K_i C_f} , \quad (3.36)$$

que relaciona a fração de sítios ligados com a concentração de ligantes livres em solução. O gráfico da razão de sítios ligados, r , em função da concentração de ligantes livres em solução, C_f , é mostrado na Figura 3.6.

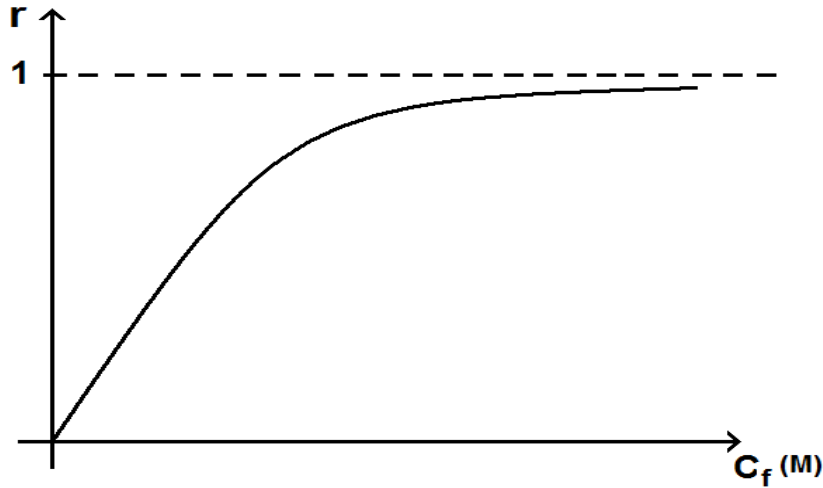


Figura 3.6: Gráfico da razão de sítios ligados, r , em função da concentração de ligantes livres em solução, C_f . O valor de r está compreendido entre $0 \leq r \leq 1$.

É importante ressaltar, entretanto, que o modelo de Michaelis - Menten não leva em conta a cooperatividade entre os compostos, ou seja, o modelo não leva em conta o fato de que a ligação química entre um ligante e um outro composto possa

3. A molécula de DNA

facilitar ou dificultar a interação da próxima molécula do ligante com o composto. Isso é equivalente a dizer que a constante de associação intrínseca, K_i , é realmente uma constante.

3.4.2 O modelo de Hill

Embora o modelo de Michaelis - Menten explique a interação de vários ligantes, ele não é capaz de explicar os compostos que seguem uma cinética não - michaeliana, como mostrado na Figura 3.8.

Historicamente, o modelo de Hill foi proposto por A. V. Hill em 1910, para explicar a interação do oxigênio com a hemoglobina^{††} [26]. A Figura 3.7 mostra a reação de interação entre o oxigênio e a hemoglobina.

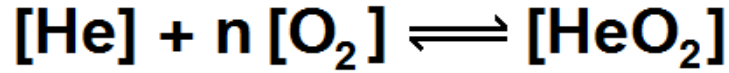


Figura 3.7: Reação de interação entre o oxigênio e a hemoglobina, presente no interior das hemácias. O número n representa o número de sítios da hemoglobina onde o oxigênio pode se ligar.

A constante de ligação aparente, K_A , é definida pela razão entre a concentração do composto resultante, $[H_eO_2]$, e o produto das concentrações dos solutos, sendo o segundo deles elevado ao número de sítios de ligação n .

$$K_A = \frac{[H_eO_2]}{[H_e][O_2]^n} . \quad (3.37)$$

Se cada oxigênio que se liga com a hemoglobina possuir a mesma constante de associação intrínseca, K_i , então, a seguinte relação é válida

$$K_A = K_i^n . \quad (3.38)$$

Seguindo com a nossa análise, podemos escrever a equação 3.37 da seguinte forma

^{††}A hemoglobina é uma proteína presente nas hemácias (H_e), cuja função é absorver e transportar o oxigênio presente no sangue.

3. A molécula de DNA

$$K_A = \frac{[H_e O_2]}{[O_2]^n([H_e] - [H_e O_2])} , \quad (3.39)$$

onde o termo $([H_e] - [H_e O_2])$ representa o número de sítios livres na hemoglobina onde o oxigênio pode se ligar.

Seja r fração de sítios ligados, ou seja, $r = [H_e O_2]/[H_e]$. Substituindo - se na equação 3.39 e isolando r , obtemos a equação de Hill

$$r = \frac{K_A [O_2]^n}{1 + K_A [O_2]^n} = \frac{K_i^n [O_2]^n}{1 + K_i^n [O_2]^n} , \quad (3.40)$$

onde o parâmetro n , conhecido como coeficiente Hill, possui duas interpretações:

a) Representa o número de sítios do substrato disponíveis para a ligação, como discutido anteriormente.

b) Representa o parâmetro de cooperatividade, de forma que,

(i) $n > 1 \rightarrow K_i$ aumenta com o aumento de $n \rightarrow$ cooperatividade positiva.

(ii) $n < 1 \rightarrow K_i$ diminui com o aumento de $n \rightarrow$ cooperatividade negativa.

(iii) $n = 1 \rightarrow K_A = K_i \rightarrow$ não há cooperatividade entre os ligantes, como no caso do modelo de Michaelis - Menten.

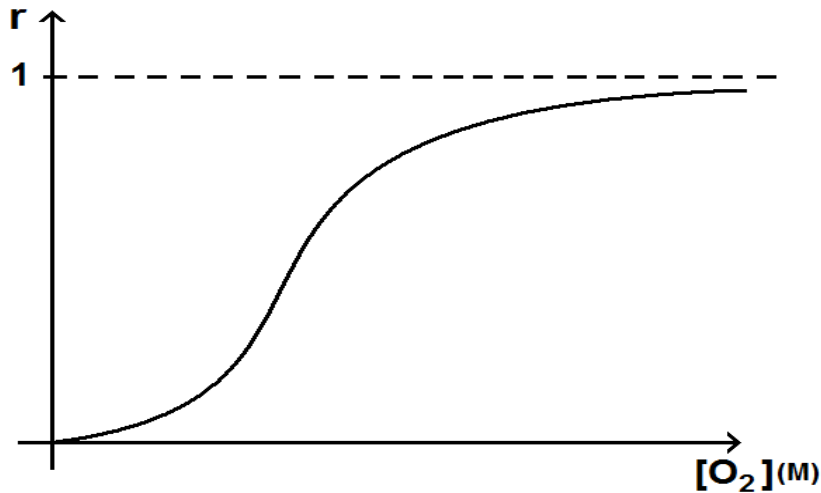


Figura 3.8: Gráfico da razão de sítios ligados, r , em função da concentração de ligantes livres em solução, $[O_2]$, em um caso onde a cooperatividade é positiva ($n > 1$).

A Figura 3.8 mostra o gráfico da razão de sítios ligados, r , em função da con-

3. A molécula de DNA

centração de ligantes livres em solução, $[O_2]$, em um caso onde $n > 1$. Nesse caso, a curva mostrada é uma sigmóide.

Entretanto, devemos ressaltar que o modelo de Hill apresenta ainda algumas limitações e que, de fato, o modelo fornece informações mais precisas somente quando [27]:

- (i) A cooperatividade entre os ligantes é positiva.
- (ii) Os ligantes são pequenos, ocupando apenas um único sítio da rede.
- (iii) Deseja - se obter informações envolvendo apenas dois estados: rede vazia ou preenchida o máximo possível (equilíbrio químico).

Capítulo 4

Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

Nesse capítulo faremos uma descrição do fármaco utilizado, apresentaremos os detalhes da preparação das amostras e discutiremos os métodos empregados para estudar as propriedades mecânicas da molécula de DNA.

4.1 Cisplatina

A cisplatina, como será discutido em sequência, recebeu grande atenção da comunidade científica desde a sua descoberta, devido ao seu amplo potencial anticarcinogênico. A descoberta de sua atividade antitumoral constituiu um marco para a Química e para a Medicina e, desde então, vários compostos metálicos têm sido amplamente estudados.

4.1.1 Um breve histórico

A cisplatina foi sintetizada pela primeira vez por Michele Peyrone em 1845 e, por isso, o composto ficou conhecido durante décadas como cloreto de Peyrone. Em 1893, 48 anos após sua síntese, Alfred Werner publica seu importante trabalho no qual apresenta a estrutura do cloreto de Peyrone, que pouco tempo depois seria conhecido

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

como cisplatina. Werner mostrou que a cisplatina era um composto planar que possuía dois isômeros: o cis-DDP e o trans - DDP* [28].

Embora a estrutura da cisplatina tenha sido elucidada em 1893, somente em 1965 a sua atividade biológica foi descoberta, por acaso, pelo físico Barnet Rosenberg e seus colaboradores. Em um experimento cujo objetivo era estudar o efeito do campo elétrico no crescimento da bactéria *Escherichia coli*, Rosenberg *et al.* verificaram que a divisão celular era inibida e, durante o processo, as células de *Escherichia coli*, como não podiam se dividir, cresciam formando filamentos alongados. A observação feita por Rosenberg *et al.* era que a eletrólise ocorrida no eletrodo de platina imerso em cloreto de amônia, liberava alguns compostos de platina que, como Rosenberg postulou, poderiam ser usados como agentes antitumorais [29,30].

Estudos posteriores demonstraram que a cisplatina era o composto de maior eficácia no tratamento de tumores. Experimentos realizados em camundongos mostraram que a cisplatina foi capaz de inibir completamente o crescimento dos tumores sarcoma 180 e leucemia L1210, que são modelos de tumores usados para ensaios farmacológicos [31].

O tratamento com a cisplatina em humanos começou na década de 70, após a aprovação da agência americana FDA[†], em 1978. A cisplatina foi usada inicialmente em pacientes terminais e posteriormente em tumores localizados, principalmente no sistema geniturinário, tendo sido lançado no mercado americano em 1979. [32,33].

4.1.2 Aspectos biológicos

A cisplatina é um fármaco potente amplamente utilizado em tratamentos quimioterápicos, dentre os quais podemos citar: cânceres de cabeça, pescoço, pulmões e sistema geniturinário [7]. A cisplatina teve um êxito especial no tratamento do câncer testicular, uma doença que possuía uma baixa taxa de recuperação e que era considerada praticamente letal [33]. Desde a descoberta de sua atividade biológica por

*Essas siglas são abreviações para os compostos cis - diaminodicloroplatina (II) e trans - diaminodicloroplatina (II), respectivamente.

[†]FDA é a abreviação para U. S. Food and Drug Administration, que é a agência americana reguladora de alimentos e medicamentos.

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

Rosenberg *et al.*, um esforço enorme foi feito para elucidar seu mecanismo de ação.

A Figura 4.1 mostra os isômeros cis - DDP e trans - DDP.

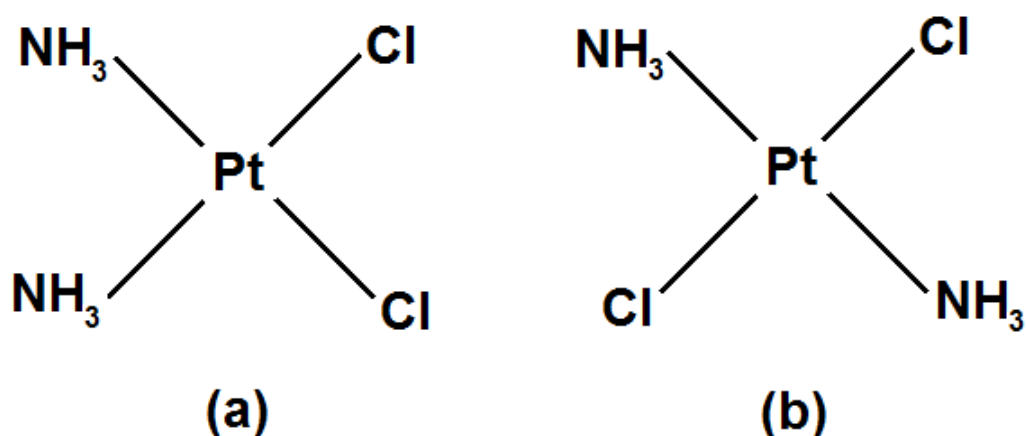


Figura 4.1: (a) O isômero cis-DDP e (b) o isômero trans-DDP.

É bem estabelecido na literatura [28,33,34] que o isômero trans - DDP não possui atividade antitumoral, ou seja, esse isômero não é capaz de suprimir a reprodução de células cancerosas[‡]. Diante disso, somente o isômero cis - DDP é o fármaco cisplatina propriamente dito.

A cisplatina é um composto planar cuja fórmula molecular é dada por: [Pt(NH₃)₂Cl₂]. A cisplatina é um fármaco inicialmente inerte e o composto somente atinge a sua fórmula ativa ao sofrer uma hidrólise. Em solução aquosa os dois íons cloreto se dissociam do átomo central de platina e duas moléculas de água ou dois íons hidróxido se juntam a molécula para transformar a cisplatina no seu estado ativo [35,36]. O estado ativo da cisplatina é dado pelas seguintes fórmulas moleculares: [Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ e [Pt(NH₃)₂(OH)₂] [28].

Embora a cisplatina possa se ligar covalentemente a várias biomoléculas[§], há um consenso na comunidade científica que o DNA é o principal alvo da cisplatina [34,37].

[‡]Esse isômero consegue se ligar a molécula de DNA mas é incapaz de gerar uma lesão a nível intramolecular capaz de suprimir a replicação do DNA.

[§]A cisplatina pode se ligar, além do DNA, com o RNA, a glutatona e com algumas proteínas.

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

Existem basicamente cinco maneiras nas quais a cisplatina pode se ligar ao DNA: (a) 1,2 - ligação cruzada intrafita GG (do termo em inglês, 1,2 - *GG intrastrand crosslink*) (b) 1,3 - ligação cruzada intrafita GNG (c) 1,2 - ligação cruzada intrafita AG (d) monoaduto, ligação cruzada DNA - proteína (do termo em inglês, *monoadduct, crosslink DNA - protein*) e (e) 1,2 - ligação cruzada interfita GG (do termo em inglês, 1,2 - *GG interstrand crosslink*). A Figura 4.2 exemplifica essas ligações.

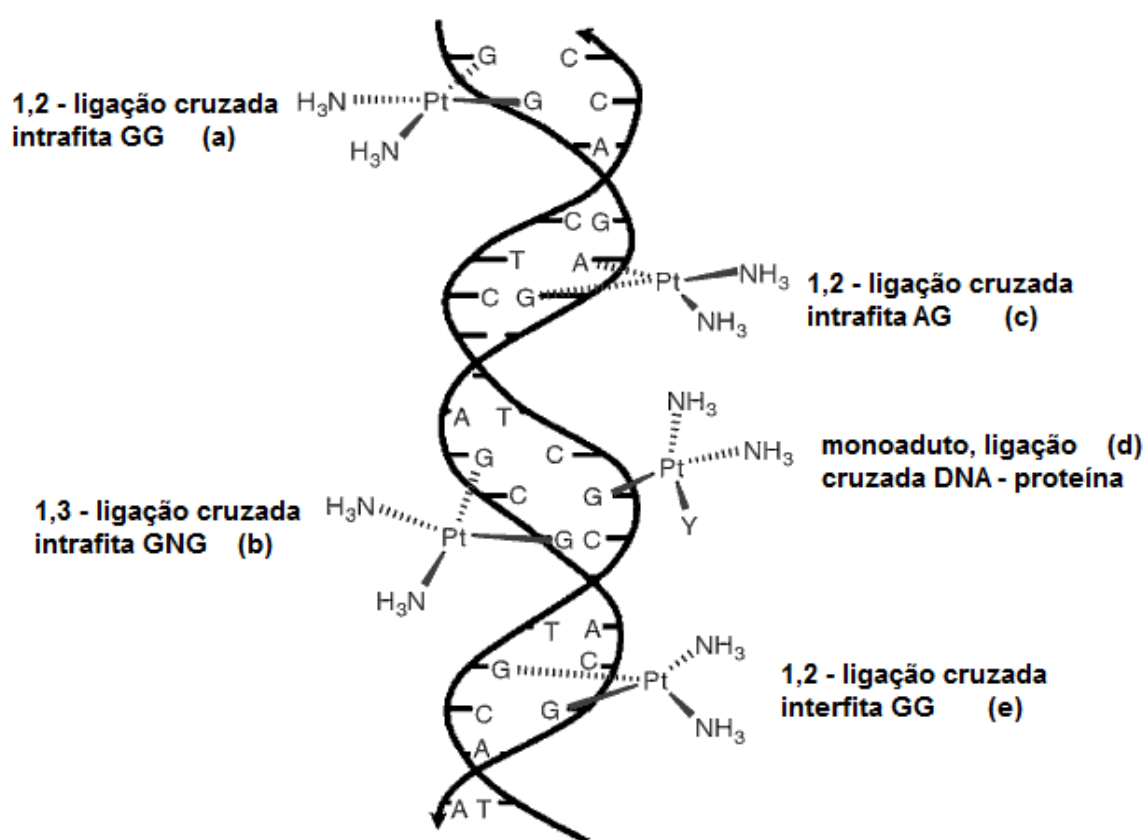


Figura 4.2: As ligações entre a cisplatina e o DNA: (a) 1,2 - ligação cruzada intrafita GG (b) 1,3 - ligação cruzada intrafita GNG (c) 1,2 - ligação cruzada intrafita AG (d) monoaduto, ligação cruzada DNA - proteína e (e) 1,2 - ligação cruzada interfita GG.

É importante observar que a cisplatina se liga, quase que exclusivamente, com as bases nitrogenadas adenina e guanina, que são semelhantes em sua estrutura química [33]. Entre essas duas bases nitrogenadas, há uma clara preferência da cisplatina em se ligar com a guanina [38–40]. De fato, não há nenhum registro na literatura da ligação

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

da cisplatina com as bases nitrogenadas timina e citosina. A Figura 4.3 mostra as ligações entre a cisplatina e as bases nitrogenadas adenina e guanina, respectivamente.

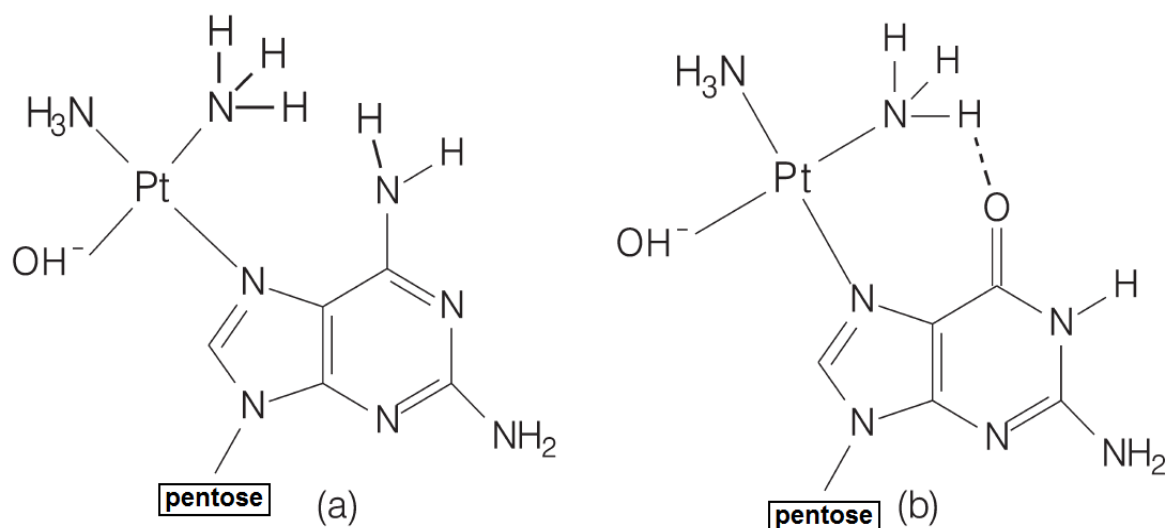


Figura 4.3: A interação da cisplatina com as bases nitrogenadas (a) adenina e (b) guanina.

Como também pode ser visto na Figura 4.3, a ligação principal[¶] entre a cisplatina e as bases nitrogenadas se dá através do átomo central de platina e o átomo de nitrogênio localizado na posição N7. Note que a ligação entre a cisplatina e a guanina é mais estável, pois existe a formação de uma ponte de hidrogênio entre o nitrogênio da molécula NH₃ com o oxigênio exocíclico [28].

Utilizando - se as técnicas de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de raio - X e eletroforese, vários autores reportam na literatura que as principais ligações entre a cisplatina e o DNA são: 1,2 - ligação cruzada intrafita GG e a 1,2 - ligação cruzada intrafita AG [33,37,41–43]. Essas ligações são responsáveis por aproximadamente 90% dos adutos formados entre a cisplatina e o DNA [37,43]. Devido a geometria do isômero trans - DDP, este não é capaz de formar nenhum dos adutos supracitados e, diante disso, acredita - se que esses adutos sejam os responsáveis pela citotoxicidade da cisplatina [33].

[¶]O termo ligação principal aqui só faz sentido na ligação entre a cisplatina e a guanina, uma vez que a ligação entre a cisplatina e a adenina se dá somente através da ligação entre o átomo central de platina e o nitrogênio localizado na posição N7.

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

As ligações 1,2 - ligação cruzada intrafita GG e a 1,2 - ligação cruzada intrafita AG, causam fortes perturbações estruturais na molécula de DNA, entre as quais podemos citar: dobras na molécula, desenrolamento parcial na estrutura de dupla hélice e loops [41,44–46]. Essas mudanças estruturais afetam o papel biológico do DNA e, segundo alguns estudos, isso leva a inibição da replicação [42,47], da transcrição [42,48] e a inibição de enzimas que fazem o reparo do DNA [42,49].

4.1.3 Aspectos clínicos

A Figura 4.4 mostra um esquema do “caminho” seguido pela cisplatina, após ser administrada aos pacientes.

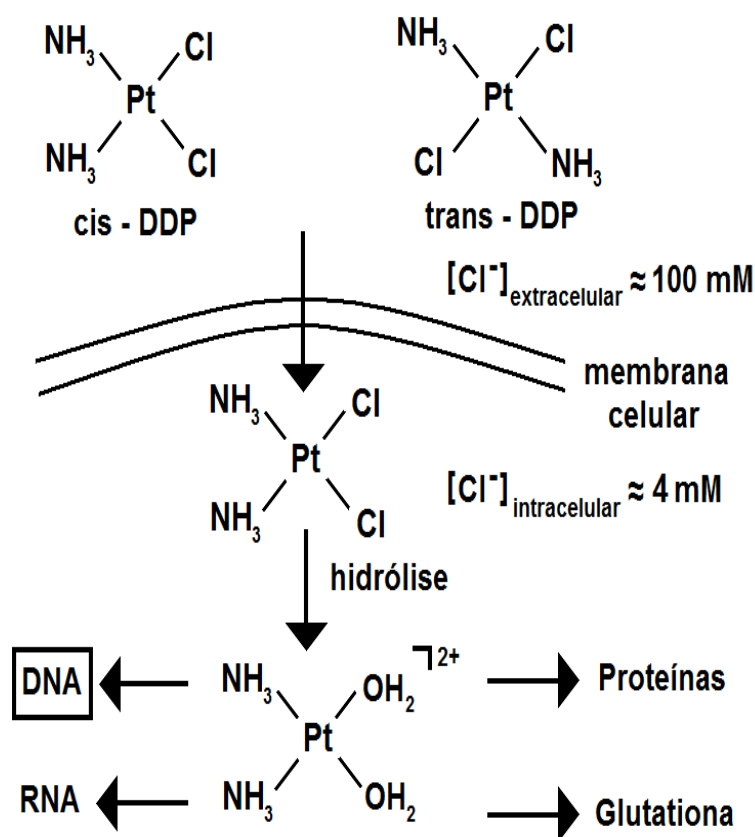


Figura 4.4: “Caminho” seguido pelas moléculas do fármaco, após ser administrado por via intravenosa.

A cisplatina é administrada aos pacientes com câncer por via intravenosa e, enquanto o fármaco está na corrente sanguínea, onde a concentração de íons cloreto é

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

alta ($\sim 100\text{mM}$) não há alteração nas moléculas do fármaco. Somente após atravessar a membrana celular, já dentro do citoplasma, onde a concentração de íons cloreto é mais baixa ($\sim 4\text{mM}$), é que ocorre a dissociação dos íons cloreto nas moléculas do fármaco, levando a cisplatina a sua forma ativa [33,40]. Como dito anteriormente, a cisplatina pode se ligar a várias biomoléculas, mas apenas $\sim 1\%$ do total de cisplatina administrada inicialmente que se liga ao DNA, é responsável pela citotoxicidade do composto [33].

Infelizmente, a cisplatina, como outros quimioterápicos, gera vários efeitos colaterais, dentre os quais podemos citar: problemas renais [50] e gastrointestinais [51].

Hoje em dia, são estudadas novas técnicas de administração do fármaco que diminuam seus efeitos colaterais e que não prejudique sua ação antineoplásica. Estas técnicas incluem a utilização de protetores químicos [52] bem como a diluição do fármaco em solução salina hipertônica [53]. Além disso, novos fármacos vem sendo desenvolvidos para substituir a cisplatina devido a sua toxicidade e a resistência celular ao fármaco [54].

4.2 Preparação das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho consistem em uma solução aquosa de PBS (Phosphate Buffer Saline) com uma concentração de $\text{NaCl} = 140\text{mM}$, além das microesferas de poliestireno com um diâmetro de $3,0\ \mu\text{m}$ e o DNA. Utilizando o protocolo desenvolvido por Shivashankar *et al.* [8], uma ponta do DNA é adsorvida na lamínula do porta - amostra e a outra ponta é adsorvida à microesfera de poliestireno. Utilizando a pinça óptica para aprisionar a microesfera é possível então, realizar os estiramentos da molécula de DNA.

4.2.1 Construção do porta - amostras

O nosso porta - amostra consiste de uma lamínula (Corning) com uma espessura de aproximadamente $0,15\ \text{mm}$, uma outra lamínula que serve como uma tampa, além de um anel de borracha do tipo *O - ring* com um diâmetro de $0,7\ \text{cm}$.

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

Utilizando - se um aquecedor, derretemos parafina para colar o *O - ring* na lamínula da Corning. A solução contendo o conjunto DNA - microesferas é então colocada no interior do *O - ring* e a outra lamínula é colocada acima do *O - ring* servindo de tampa.

4.2.2 Preparação da solução DNA - microesferas

Em um microtubo, do tipo eppendorf, previamente limpo (E1) adicionamos 1,5 mL de PBS pH 5.5. Em um outro microtubo, do mesmo tipo, também previamente limpo (E2), colocamos 136 μL de PBS pH 5.5. No microtubo E1, colocamos 1 μL da solução estoque de microesferas de poliestireno com 3,0 μm de diâmetro (Polysciences, Cat. # 17134 - 15). Com o auxílio de um agitador, a solução é então homogeneizada. Retiramos 180 μL da solução contida no microtubo (E1), e colocamos no microtubo (E2), mais uma vez homogeneizando a solução.

A solução estoque de λ - DNA (Promega Corp., Cat # D1501, C = 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) é então colocada em um banho térmico a 55°C durante 10 minutos. Retiramos 5 μL dessa solução estoque e a adicionamos no microtubo (E2). A solução contida no microtubo (E2) é então homogeneizada cuidadosamente e, em seguida, é deixada em repouso por 20 minutos. Finalmente, todo o conteúdo do microtubo (E2) é colocado no porta - amostra utilizando - se uma micropipeta.

O porta - amostra é então tampado utilizando - se uma outra lamínula de vidro e aguardamos aproximadamente 18 horas para que as moléculas de DNA adsorvam na lamínula de vidro e nas microesferas.

A solução aquosa de DNA - microesferas obtida ao final do procedimento possui uma concentração de $C_{DNA} = 5,51 \mu\text{g}/\text{mL}$, o que corresponde a uma concentração de pares de bases de $C_{bp} = 8,9 \mu\text{M}$.

Ao térmico das 18 horas de incubação, retiramos cuidadosamente a tampa do porta - amostras e utilizando a micropipeta, fazemos a retirada de todo o PBS pH 5.5 substituindo - o pelo PBS pH 7.4. Essa troca é necessária para se obter o pH intracelular, no qual o DNA se encontra *in vivo*.

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

4.3 Procedimento experimental

Nesta seção descreveremos detalhadamente o procedimento experimental utilizado para a obtenção, a partir da curva força x extensão, das propriedades mecânicas da molécula de DNA.

4.3.1 Encontrando um bom conjunto DNA - microesferas

O primeiro passo, após a preparação da amostra, para que o nosso experimento seja bem sucedido é a procura de um bom conjunto DNA - microesferas para a realização do experimento. A Figura 4.5 mostra as possíveis configurações para o DNA, as microesferas de poliestireno além do conjunto DNA - microesferas em nossa amostra.

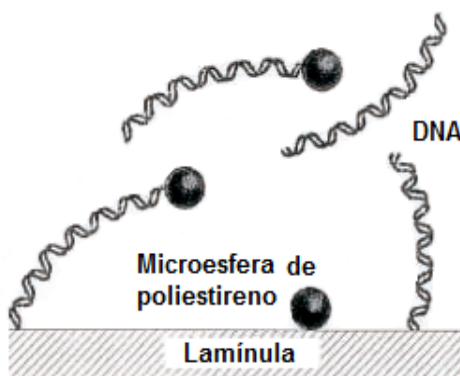


Figura 4.5: Possíveis configurações para o DNA, as microesferas de poliestireno e do conjunto DNA - microesferas em nossa amostra.

É possível encontrar em nossa amostra várias configurações, dentre as quais podemos citar: DNA isolado, DNA aderido à lamínula, microesferas de poliestireno aderidas à lamínula, DNA com uma ponta aderida à microesfera mas com a outra ponta solta, além da situação que realmente nos interessa que é uma ponta do DNA adsorvida na microesfera de poliestireno e a outra ponta adsorvida na lamínula de vidro^{||}.

^{||}De fato, ao utilizarmos o protocolo de Shivashankar *et al.* para a preparação das amostras,

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

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

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

(ii) Após um certo tempo, a microesfera escapa do poço de potencial da pinça e esse é um forte indício que há DNA colado tanto na microesfera quanto na lamínula. É importante destacar que não é possível enxergar o DNA via microscopia óptica e, dessa forma, a procura pelo DNA é dita indireta.

Mesmo após a configuração desejada ser encontrada, é importante tomar alguns cuidados antes da realização dos estiramentos: verificar se não há mais de um DNA colado à microesfera e se o DNA está adsorvido à microesfera pela sua ponta e não pelo meio da molécula. Isso pode ser feito esticando o DNA em dois sentidos opostos ($+x$ e $-x$, por exemplo) e verificando que o tempo que a microesfera demora para escapar do poço de potencial da pinça óptica seja aproximadamente o mesmo nos dois sentidos. Obviamente, isso não garante que haja apenas um único DNA colado à microesfera nem que o DNA esteja adsorvido à microesfera pela sua ponta, mas é um forte indício.

4.3.2 Procedimento experimental para a realização dos estiramentos

Uma vez encontrado um bom conjunto DNA - microesfera, estamos aptos a realizar os estiramentos. Inicialmente, deixamos o conjunto DNA - microesfera fora da pinça óptica para que este encontre sua configuração de equilíbrio. Uma vez obtida a posição de equilíbrio da microesfera, a pinça óptica é utilizada então para capturá - la.

O motor piezoelétrico que está acoplado ao estágio do microscópio é iniciado e a filmagem do experimento é iniciada simultaneamente. A velocidade na qual o estágio

obtemos em torno de 5% a 10% de DNA adsorvido tanto na lamínula quanto na microesfera, que é a configuração necessária para a realização dos experimentos.

**Estritamente falando, é possível que mesmo nessa situação exista DNA colado a microesfera, mas a configuração que realmente nos interessa não é encontrada nesse caso.

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

se desloca^{††} é constante e, em nossos experimentos, seu valor foi de $v = 0,750 \mu\text{m/s}$.

A Figura 4.6 mostra um esquema dos estiramentos da molécula de DNA.

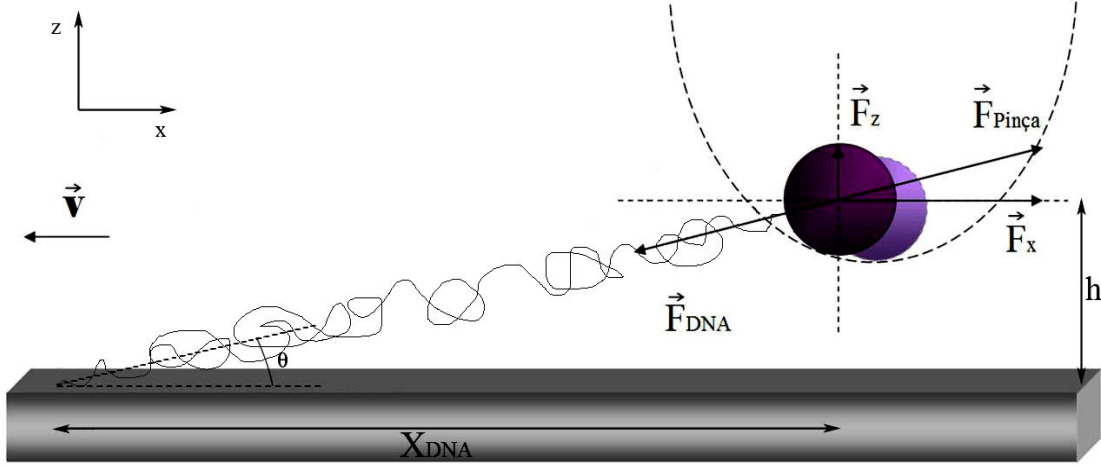


Figura 4.6: Esquema da realização dos estiramentos da molécula de DNA. Como a velocidade na qual o estágio do microscópio se desloca é pequena, o estiramento se dá em um regime quase - estático, de forma que podemos considerar a força de Stokes aproximadamente zero.

A altura h da microesfera é mantida fixa em $3,5 \mu\text{m}$ enquanto o estágio do microscópio se desloca com velocidade constante. Como essa velocidade é muito baixa, podemos desprezar a força de Stokes que atua sobre a microesfera e considerar que o experimento é realizado em um regime quase - estático, de forma que a força que o DNA exerce sobre a microesfera é, em módulo, igual a força que a pinça óptica exerce sobre a mesma. A molécula de DNA é esticada até que ela escape do poço de potencial da pinça óptica. Quando isso acontece, esperamos novamente o DNA retornar a sua posição de equilíbrio e todo o procedimento discutido acima é repetido. Isso é feito para que no final do procedimento possamos tomar as médias dos valores dos parâmetros de interesse, afim de melhorar a precisão do experimento.

Para encontrar a força que o DNA exerce sobre a microesfera, todo o experimento é filmado com um câmera CCD (detalhes podem ser encontrados na Figura 2.4)

^{††}O porta - amostras contendo a solução fica dentro do estágio do microscópio e, diante disso, a velocidade na qual o estágio do microscópio se desloca é igual a velocidade na qual o porta - amostra se desloca.

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

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

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

A força que o DNA exerce sobre a microesfera^{‡‡}, em função do tempo, é dada por

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

onde κ é a constante de força da pinça óptica.

A Figura 4.7 mostra a curva típica obtida com esse procedimento, além do ajuste feito utilizando - se o modelo WLC [9]. Desse ajuste, obtivemos o comprimento de contorno L e o comprimento de persistência A da molécula de DNA.

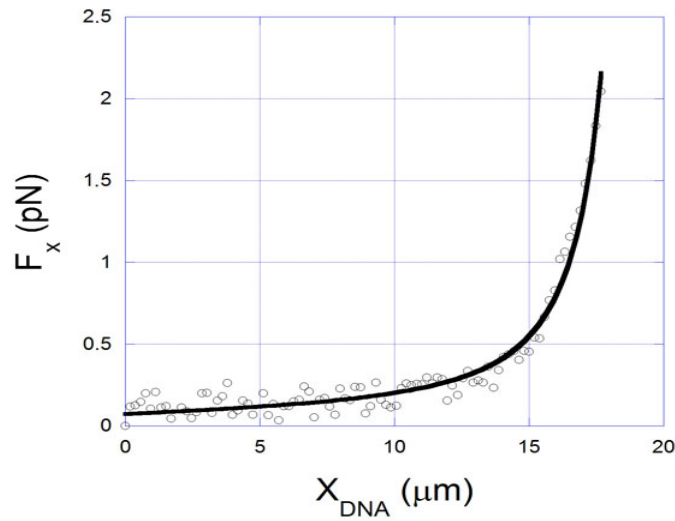


Figura 4.7: Curva típica da componente x da força x extensão do DNA. O ajuste é feito utilizando - se a equação 4.3.

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

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

No entanto, como estamos realizando o experimento na direção x , é mais conveniente utilizar a componente x da equação 3.32. Observe na Figura 4.6, que a extensão do DNA, z , é dada por $z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}$ e $F_x = F \cos \theta = F(x_{DNA}/z)$. A altura h é fixa durante todo o experimento e seu valor é $3,5 \mu\text{m}$. Substituindo - se na equação 3.32, obtemos a expressão final da componente x da força, dada por

$$F_x = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}. \quad (4.3)$$

Para a molécula de λ - DNA pura, obtivemos com o procedimento descrito acima os valores do comprimento de contorno e de persistência, respectivamente, iguais a: $L = (16,5 \pm 1) \mu\text{m}$ e $A = (50 \pm 3) \text{ nm}$, obtidos com uma média de 7 estiramentos com uma mesma molécula de λ - DNA. Nossos resultados possuem grande semelhança com os dados encontrados na literatura [55,56] e, portanto, o procedimento pode ser usado para estudar a variação das propriedades mecânicas da molécula de DNA ao interagir com a cisplatina.

4.3.3 Adição do fármaco na amostra

Uma vez realizado todos os estiramentos com a molécula pura de λ - DNA, era necessário incluir o fármaco na amostra. A Figura 4.8 ilustra esse procedimento.

A cisplatina utilizada em nossos experimentos foi produzida pela *Sigma - Aldrich* e as alíquotas contendo o fármaco foram preparadas de forma a fornecer uma faixa de concentração que variava desde $10 \mu\text{M}$ até $100 \mu\text{M}$. Uma outra alíquota foi preparada para se obter uma concentração específica de 2 mM .

As alíquotas contendo o fármaco eram inseridas na amostra utilizando - se a micropipeta e levando esta diretamente até a amostra, de forma que a concentração do fármaco podia ser livremente modificada.

A mesma alíquota era inserida e retirada algumas vezes da amostra para garantir que a concentração do fármaco na amostra fosse praticamente a mesma daquela

4. Uso da pinça óptica e da videomicroscopia na caracterização da interação DNA - cisplatina

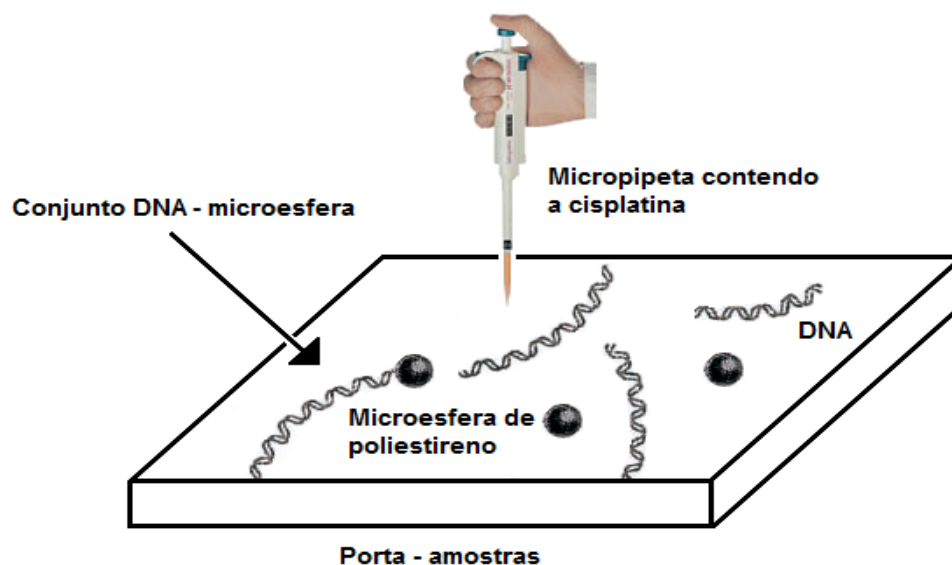


Figura 4.8: Ilustração do procedimento usado para a troca das alíquotas contendo a cisplatina.

previamente preparada no microtubo.

É importante ressaltar que esse procedimento de adição e troca do fármaco é extremamente importante, uma vez que permite realizar o experimento completo com a mesma molécula de DNA, para várias concentrações do fármaco.

Capítulo 5

Resultados e discussão

Nesse capítulo apresentaremos detalhadamente os resultados obtidos para a interação da cisplatina com o DNA. Além disso, vamos discutir o modelo proposto para explicar o comportamento do comprimento de persistência em função da concentração de cisplatina e algumas das propriedades mecânicas dos complexos DNA - cisplatina, dentre as quais podemos citar: o raio de giro e a distância máxima ponta - à - ponta dos complexos DNA - cisplatina.

5.1 Cinética da interação DNA - cisplatina

Inicialmente, a fim de caracterizar a escala de tempo que o complexo de DNA - cisplatina levava para atingir o equilíbrio químico, nós estudamos a cinética desta interação. A partir desses experimentos, foi possível fazer um estudo das mudanças das propriedades mecânicas do complexo DNA - cisplatina em função do tempo de difusão da droga na amostra.

Como explicado na seção 4.3.2, inicialmente era feito o estiramento da molécula de DNA pura, a fim de calibrar o sistema e garantir que o mesmo fornecia resultados confiáveis. A mesma molécula era esticada 7 vezes, para verificar a reprodutibilidade dos resultados e, portanto, os resultados encontrados são as médias para cada um desses estiramentos. É importante destacar que as médias são feitas para os resultados encontrados para os 7 estiramentos realizados na mesma molécula de DNA, ou seja, não estamos recorrendo a média sobre várias moléculas de DNA.

5. Resultados e discussão

Uma vez finalizado os estiramentos da molécula pura, a solução de PBS era substituída por uma outra solução de PBS contendo o fármaco a uma concentração C_T . Os detalhes dessa substituição podem ser encontrados na seção 4.3.3.

Os estiramentos eram então, repetidos sequencialmente após a espera de um certo intervalo de tempo escolhido previamente.

A Figura 5.1 mostra o comportamento do comprimento de persistência do complexo DNA - cisplatina em função do tempo para uma concentração fixa do fármaco na amostra, $C_T = 2$ mM.

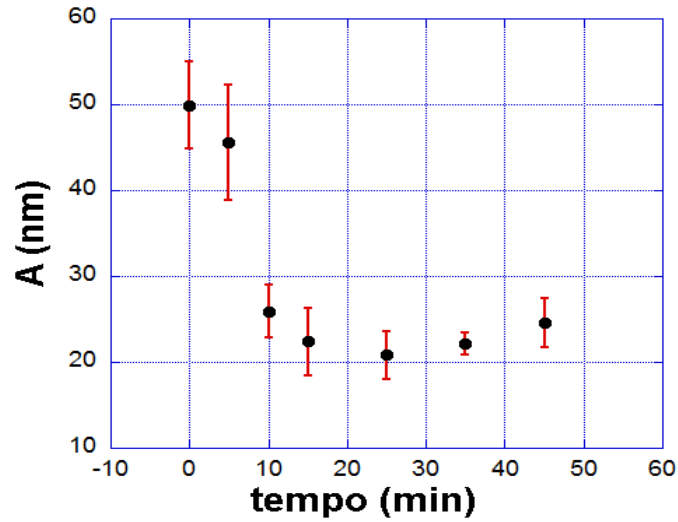


Figura 5.1: Comportamento do comprimento de persistência A em função do tempo de difusão da droga, para uma concentração fixa de fármaco na amostra, $C_T = 2$ mM. Observe que o valor de A decresce em função do tempo, indicando que a flexibilidade dos complexos aumenta à medida que o equilíbrio químico é atingido.

Observe que o comprimento de persistência diminui em função do tempo de difusão da droga, indicando que a flexibilidade dos complexos aumenta à medida que o equilíbrio químico é atingido, com mais fármaco se ligando à molécula de DNA. Esses resultados estão de acordo com alguns resultados reportados na literatura, realizados com microscopia de força atômica [46] e microscopia de fluorescência [57], no qual a compactação da molécula de DNA pela cisplatina é verificada. Como discutido por esses autores, a compactação do DNA é devido aos adutos e as ligações cruzadas que são formadas entre os diferentes pares de bases do DNA, introduzindo loops que reduzem

5. Resultados e discussão

a distância ponta - à - ponta dos complexos em equilíbrio.

Em nosso caso, no qual os experimentos são realizados com forças muito pequenas, esses adutos e ligações cruzadas não podem ser rompidos enquanto o DNA é esticado e, portanto, nós observamos um decréscimo no valor do “comprimento de contorno aparente” medido ajustando a curva de força x extensão com a equação 4.3. Devemos ressaltar, entretanto, que o resultado obtido nesse procedimento não fornece o valor real do comprimento de contorno dos complexos, uma vez que essa grandeza é definida como sendo o comprimento total ao longo da cadeia polimérica, que não pode ser obtido diretamente dos nossos experimentos, devido aos loops que são introduzidos ao longo da molécula de DNA pela cisplatina. Portanto, para caracterizar o tamanho dos complexos, nós medimos a distância máxima ponta - à - ponta, $R_{ee}(max)$, isto é, a extensão máxima dos complexos DNA - cisplatina imediatamente antes da microesfera escapar do poço de potencial da pinça óptica. Mesmo que essa grandeza apresente uma pequena variação entre um estiramento e outro, devido ao movimento browniano da microesfera, sua média, obtida com uma série de estiramentos, é bem caracterizada. Uma vantagem em caracterizar o tamanho dos complexos dessa maneira, ao invés de utilizar o comprimento de contorno, é que essa grandeza pode ser medida diretamente, isto é, ela é independente de qualquer modelo ou ajuste utilizado.

A Figura 5.2 mostra o comportamento da grandeza $R_{ee}(max)$, para o mesmo complexo DNA - cisplatina mostrado na Figura 5.1.

É possível observar na Figura 5.2 que, assim como o comprimento de persistência, A , a extensão máxima, $R_{ee}(max)$, decresce a medida que o equilíbrio químico é atingindo, indicando que a molécula de DNA está realmente sendo compactada pela ação da cisplatina.

Uma outra grandeza importante que pode ser usada para caracterizar o tamanho dos complexos DNA - cisplatina é o raio de giro*, que pode ser calculado diretamente dos nossos dados. De fato, esse é o melhor parâmetro para descrever a compactação da molécula de DNA, uma vez que ele fornece uma informação direta sobre o tamanho dos complexos DNA - cisplatina. Para polímeros semiflexíveis no regime entrópico com

*O raio de giro, R_g , é uma espécie de medida efetiva do raio da esfera que representa o volume esférico ocupado pelo polímero em solução.

5. Resultados e discussão

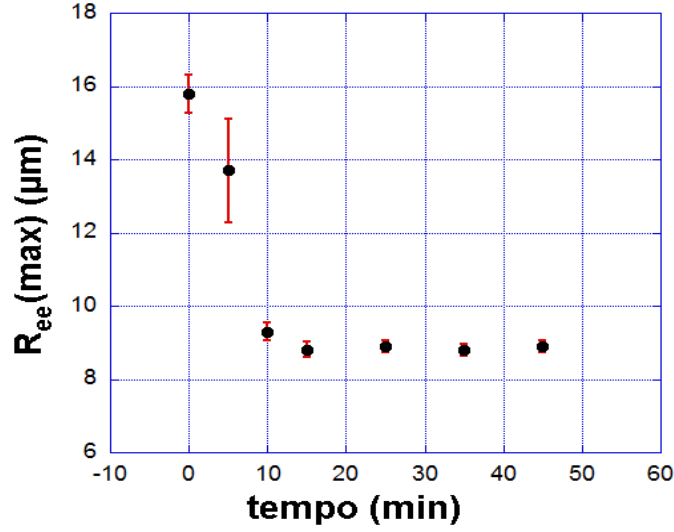


Figura 5.2: Extensão máxima, $R_{ee}(max)$, em função do tempo de difusão do fármaco. Observe que, assim como o comprimento de persistência, A , a extensão máxima, $R_{ee}(max)$, decresce a medida que o equilíbrio químico é atingindo, indicando que a molécula de DNA está realmente sendo compactada pela ação da cisplatina.

$L \gg A$, que é o caso do λ - DNA, o raio de giro, R_g é dado por [27]

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{3}AL \left(1 - \frac{3A}{L} + \dots \right)}, \quad (5.1)$$

onde A é o comprimento de persistência e L é o comprimento de contorno.

Portanto, utilizando - se os valores do comprimento de persistência encontrados na Figura 5.1 e $L = 16,5 \mu m$ [†], podemos obter diretamente o raio de giro em função do tempo de difusão do fármaco. A suposição de que o comprimento de contorno permanece aproximadamente constante é bastante razoável, uma vez que os adutos e as ligações cruzadas introduzidas pela cisplatina não modifica significativamente a distância entre os pares de bases consecutivas ao longo da cadeia polimérica [46].

Alternativamente, o tamanho dos complexos também pode ser caracterizado pela distância de equilíbrio ponta - à - ponta do polímero, $R_{ee}(0)$, quando nenhuma força é aplicada. Essa grandeza pode também ser calculada a partir dos nossos dados. Para o caso onde $L \gg A$, $R_{ee}(0)$ é dado por [27]

[†]Valor inicial do comprimento de contorno, antes da adição do fármaco.

5. Resultados e discussão

$$R_{ee}(0) = \sqrt{2AL \left(1 - \frac{A}{L} + \dots\right)}, \quad (5.2)$$

onde A é o comprimento de persistência e L é o comprimento de contorno.

É possível notar, através das equações 5.1 e 5.2 que o comprimento de persistência, A , desempenha um papel fundamental para a caracterização do tamanho dos complexos DNA - cisplatina.

A Figura 5.3 mostra o comportamento das grandezas R_g e $R_{ee}(0)$ para os dados obtidos na Figura 5.1.

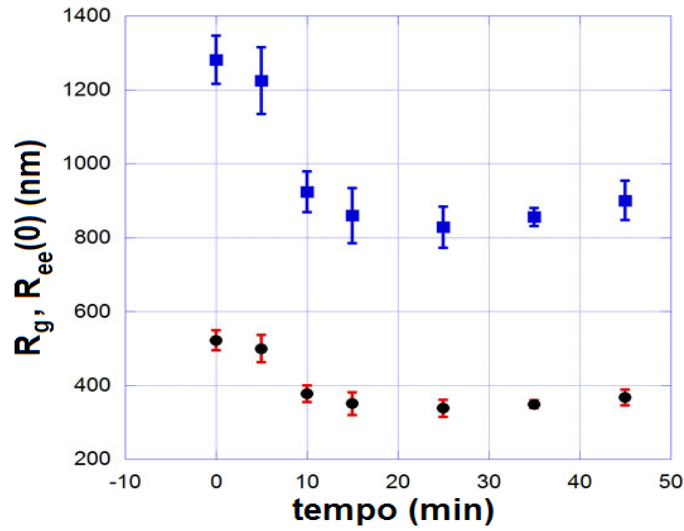


Figura 5.3: Comportamento do raio de giro (círculos), R_g , e da distância de equilíbrio ponta - à - ponta do polímero (quadrados), $R_{ee}(0)$, para os mesmos complexos DNA - cisplatina da Figura 5.1. Observe que ambas decrescem a medida que o equilíbrio químico é atingido, como esperado.

O valor de equilíbrio obtido para o raio de giro ($\sim 350\text{nm}$), concorda bem com o tamanho típico dos complexos compactados de DNA - cisplatina medidos por Katsuda *et al.* utilizando microscopia de fluorescência [57].

5.2 Propriedades mecânicas do DNA em função da concentração de cisplatina

Uma vez caracterizada a escala de tempo típica para os complexos DNA - cisplatina alcançarem o equilíbrio químico, as mudanças nas propriedades mecânicas em função da concentração de fármaco podem ser determinadas, nas condições de equilíbrio. Um modelo foi proposto, a partir do qual detalhes físico - químicos da interação podem ser deduzidos utilizando - se apenas os experimentos de estiramento, eliminando - se assim a necessidade da utilização de outros métodos complementares, como por exemplo, diálise do equilíbrio[‡] ou outras técnicas ópticas.

A Figura 5.4 mostra o comportamento do comprimento de persistência, A , em função da concentração de cisplatina na amostra, C_T .

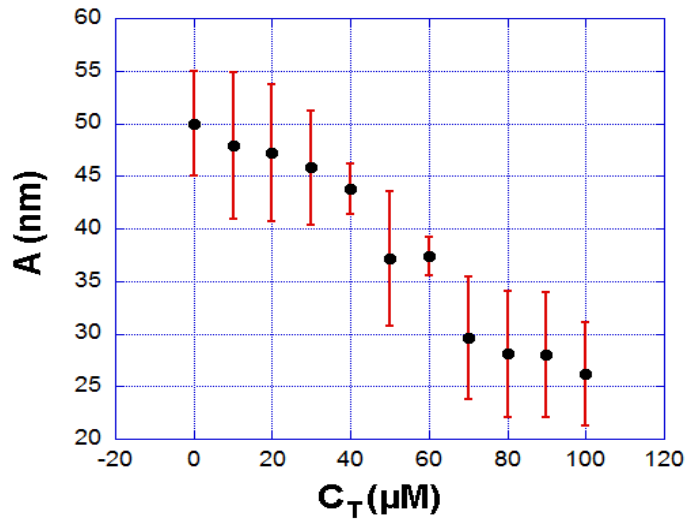


Figura 5.4: Comportamento do comprimento de persistência, A , em função da concentração de cisplatina na amostra, C_T . O formato sigmoidal da curva sugere um mecanismo de ligação cooperativo entre a cisplatina e o DNA.

Observe que o comprimento de persistência decai monotonicamente com a concentração de fármaco na amostra, corroborando com o fato de que a cisplatina aumenta a flexibilidade dos complexos DNA - cisplatina. É importante enfatizar que todos os

[‡]A diálise de equilíbrio utiliza uma membrana semipermeável que permite que íons atravessem e se liguem a biomoléculas. Conhecendo - se a concentração inicial de íons, é possível determinar a quantidade de íons ligados, após o equilíbrio iônico ser atingido.

5. Resultados e discussão

dados apresentados na Figura 5.4 foram obtidos com a mesma molécula de DNA, mudando - se apenas a concentração de fármaco na amostra, como descrito anteriormente. Nesse experimento, nós esperamos entre 10 - 15 minutos após a mudança da concentração do fármaco na amostra, antes de iniciar o próximo experimento de estiramento. Esse intervalo de tempo foi escolhido em virtude do tempo necessário para os complexos DNA - cisplatina alcançarem o platô mostrado na Figura 5.1. Nenhuma histerese foi observada nas curvas de forças quando os complexos de DNA - cisplatina eram esticados e relaxados, o que fortalece o argumento que os complexos estavam em equilíbrio [16].

O formato sigmoidal da curva na Figura 5.4 sugere um mecanismo de ligação cooperativo entre a cisplatina e o DNA. A cooperatividade desempenha um papel importante nas interações do DNA com vários tipos de fármacos [58,59] e proteínas [60]. Em nosso caso, essa cooperatividade surge a partir das mudanças nas propriedades mecânicas do DNA induzidas pela cisplatina. Intuitivamente, uma cooperatividade positiva deve ser esperada na interação DNA - cisplatina, uma vez que as ligações cruzadas e os loops induzidos pela cisplatina ao longo do DNA aproximam diferentes segmentos que compõem a fita dupla do DNA, a medida que a concentração do fármaco aumenta e, portanto, aumenta a probabilidade de ligação com mais moléculas de cisplatina, formando cada vez mais ligações cruzadas e loops, como pode ser visto na Figura 5.5.

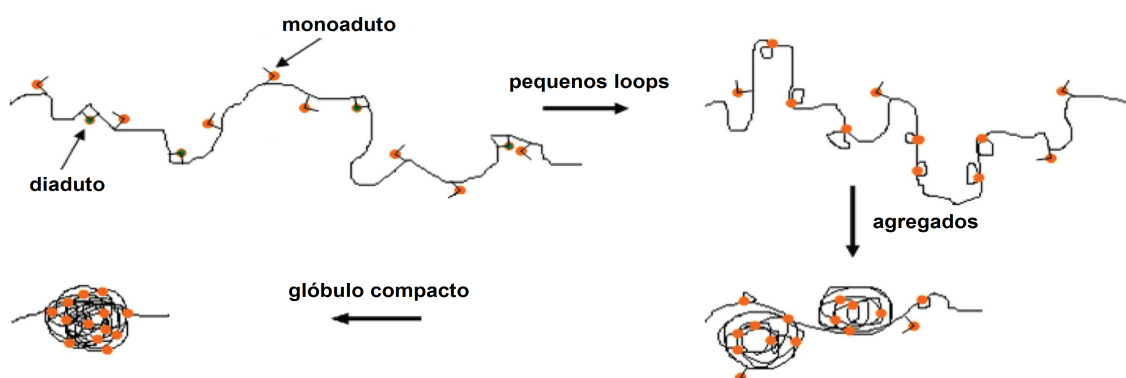


Figura 5.5: Ilustração da compactação da molécula de DNA induzida pela cisplatina. Adaptado de [46].

5. Resultados e discussão

É importante ressaltar que esse trabalho é o primeiro na literatura que verificou experimentalmente e quantificou esse grau de cooperatividade para a cisplatina. Como dito anteriormente, nós desenvolvemos um modelo quantitativo simples para entender essa ligação cooperativa, determinando alguns parâmetros físico - químicos de interesse, dentre os quais podemos citar: a constante de ligação aparente e o grau de cooperatividade. O modelo proposto é descrito abaixo.

O comprimento de persistência efetivo, A_{eff} , de um complexo DNA - ligante em equilíbrio químico com uma certa quantidade de ligante (a uma concentração C_T), pode ser calculado conhecendo - se o comprimento de persistência do DNA puro, A_0 , e o comprimento de persistência do complexo DNA - ligante saturado, A_1 , através da relação [61,62]

$$\frac{1}{A_{eff}} = \frac{1-r}{A_0} + \frac{r}{A_1}, \quad (5.3)$$

onde, $r = C_b/C_{bp}$ é a razão entre a concentração de fármaco ligado, C_b , e a concentração de pares de bases, C_{bp} . Observe que $0 \leq r \leq 1$. Uma vez que A_0 e A_1 são os valores assintóticos de A_{eff} quando $C_T \rightarrow 0$ e $C_T \rightarrow \infty$, seus valores são estimados ajustando - se uma função sigmóide aos dados experimentais da Figura 5.4.

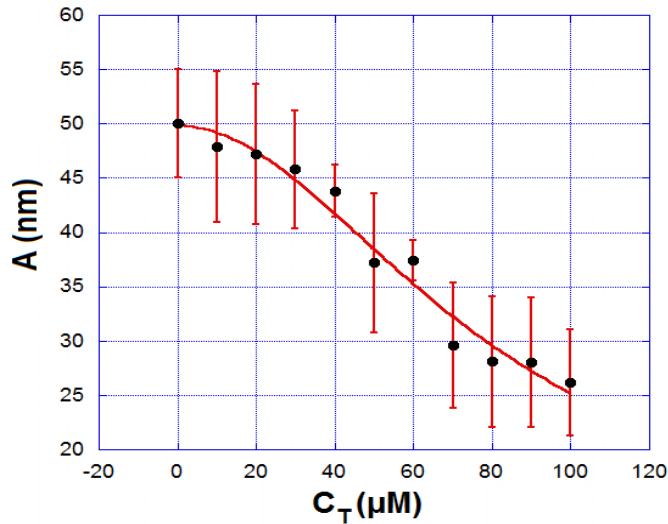


Figura 5.6: Ajuste sigmoidal realizado sobre os dados experimentais da Figura 5.4, para a obtenção dos valores de A_0 e A_1 .

5. Resultados e discussão

A Figura 5.6 mostra o ajuste sigmoidal feito sobre dados experimentais da Figura 5.4. Os resultados obtidos com o ajuste sigmoidal foram: $A_0 = 50,5 \pm 3$ nm e $A_1 = 16,8 \pm 11$ nm. O valor obtido para A_0 corresponde ao comprimento de persistência para o DNA puro, como esperado. Por outro lado, o valor de A_1 está em bom acordo com aquele obtido por Hou *et al.* (14,9nm) [46].

Observe também que a concentração de fármaco ligado, C_b , está relacionada com a concentração total de fármaco, C_T [§], através da relação

$$C_T = C_b + C_f , \quad (5.4)$$

onde C_f é a concentração de fármaco livre na amostra, ou seja, a concentração de fármaco que não se ligou ao DNA.

Utilizando - se as equações 5.3 e 5.4, é possível deduzir o comportamento de r em função da concentração livre de fármaco, C_f . Primeiramente, isolamos r na equação 5.3, de onde obtemos a seguinte equação

$$r = \frac{A_1(A_0 - A_{eff})}{A_{eff}(A_0 - A_1)} . \quad (5.5)$$

Substituindo - se na equação 5.5 os valores de A_{eff} para cada valor de C_T , obtidos a partir da Figura 5.4, determinamos os valores de r para cada valor de C_T . Além disso, utilizando - se a equação 5.4 com $C_b = rC_{bp}$, podemos escrever a seguinte equação

$$C_T = rC_{bp} + C_f , \quad (5.6)$$

de onde é possível determinar o valor de C_f para cada valor de C_T , uma vez que os valores de r são conhecidos para cada valor de C_T e C_{bp} é uma constante previamente conhecida. Finalmente, o comportamento de r em função de C_f é mostrado na Figura 5.7 (círculos).

Para prosseguir com a análise, assumimos o mecanismo de Hill para a interação [27]. A equação de Hill (deduzida na seção 3.4.2), que leva em conta a cooperatividade,

[§]Observe que C_T é a quantidade total de fármaco que é adicionado a amostra contendo o DNA.

5. Resultados e discussão

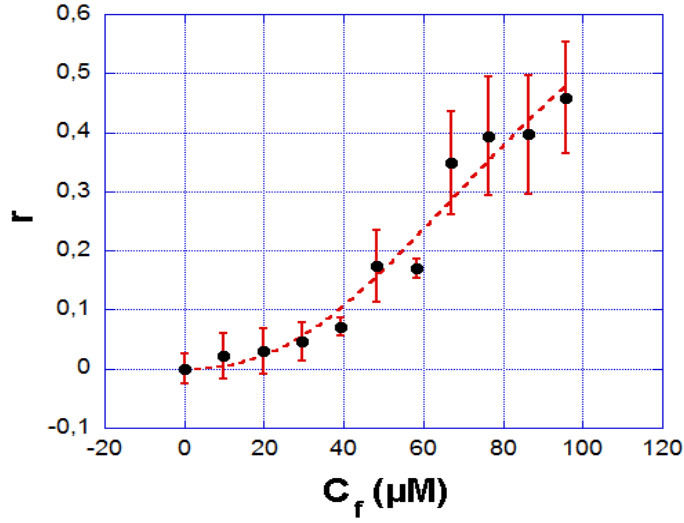


Figura 5.7: Fração de cisplatina ligada ($r = C_b/C_{bp}$) em função da concentração de fármaco livre em solução (C_f). *Linha tracejada*: ajuste realizado utilizando - se a equação 5.7 (equação de Hill). Deste ajuste obtivemos os valores dos parâmetros ajustáveis, $K_A = (2,2 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-n}$ e $n = 2,3 \pm 0,3$.

relaciona a fração de ligante, r , com a concentração de ligante livre na amostra, C_f , através da relação

$$r = \frac{K_A C_f^n}{1 + K_A C_f^n}, \quad (5.7)$$

onde K_A é a constante de ligação aparente e n é o coeficiente Hill, um parâmetro usualmente utilizado para medir o grau de cooperatividade em reações químicas. Por exemplo, se $n > 1$, a interação é positivamente cooperativa, isto é, uma molécula ligada aumenta a afinidade do DNA para a molécula ligante subsequente. Por outro lado, se $n < 1$, a interação é negativamente cooperativa, isto é, uma molécula ligada diminui a afinidade do DNA para a molécula ligante subsequente. Se $n = 1$, a interação é não cooperativa e a afinidade é independente do número de moléculas ligadas (modelo de Michaelis - Menten).

A equação de Hill (equação 5.7), foi utilizada para realizar o ajuste aos dados da Figura 5.7 (linha tracejada), com dois parâmetros ajustáveis: K_A e n . É possível notar que o modelo proposto se ajusta bem aos dados experimentais. Os valores obtidos com o ajuste foram: $K_A = (2,2 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-n}$ e $n = 2,3 \pm 0,3$. O resultado obtido

5. Resultados e discussão

para K_A está em bom acordo com aquele obtido por Chen *et al.* ($8,4 \times 10^8$) [63], cujo cálculo foi realizado utilizando - se pequenos fragmentos de DNA (13 pares de bases). Nesse trabalho, entretanto, existe a falta de cooperatividade, uma vez que as ligações cruzadas mais distantes e os loops não podem ocorrer em pequenos fragmentos de DNA e, portanto, a constante de ligação aparente obtida por Chen *et al.* deve estar subestimada. Nós não encontramos na literatura nenhuma medida ou cálculo para o parâmetro n , a fim de comparar com o valor obtido com o nosso ajuste. Contudo, o fato de termos obtido um valor $n > 1$ para o ajuste, indica que a cisplatina se liga ao DNA através de uma interação positivamente cooperativa, corroborando com a discussão anterior na qual as ligações cruzadas e loops introduzidos na molécula de DNA pela ação da cisplatina aumentam a probabilidade de formação de um número maior de complexos DNA - cisplatina, resultando na compactação da molécula de DNA.

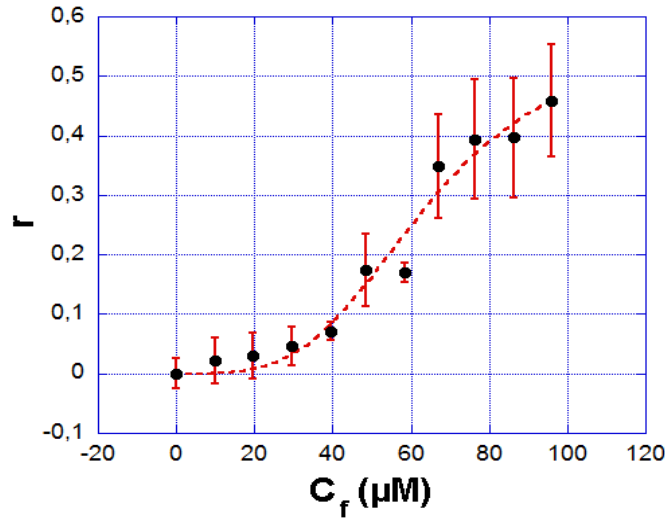


Figura 5.8: Fração de cisplatina ligada ($r = C_b/C_{bp}$) em função da concentração de fármaco livre em solução (C_f). *Linha tracejada*: ajuste realizado utilizando - se a equação 5.8. Deste ajuste obtivemos os valores dos parâmetros ajustáveis, $K_i = (1,5 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n = 3,6 \pm 1,0$ e $r_{max} = 0,56 \pm 0,12$.

Podemos ir um pouco além com a nossa análise, ao acrescentarmos mais um parâmetro ajustável à equação 5.7, a fim de obtermos r_{max} , que é o valor máximo de r , correspondendo à situação na qual a molécula de DNA encontra - se saturada. Esta modificação na equação 5.7, foi motivada pelo fato de que aproximadamente 90% dos

5. Resultados e discussão

adutos formados entre a cisplatina e o DNA ocupam dois pares de bases [37,43], o que faz com que o valor de r_{max} seja menor do que 1. A nova equação pode ser escrita como

$$r = \frac{r_{max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}, \quad (5.8)$$

onde r_{max} é o valor máximo de r , K_i é a constante de associação intrínseca, n é o coeficiente de Hill e C_f é a concentração de ligante livre na amostra.

A equação 5.8 foi utilizada para realizar o ajuste aos dados da Figura 5.8 (linha tracejada), agora com três parâmetros ajustáveis: K_i , n e r_{max} . Novamente, podemos perceber que o modelo proposto se ajusta bem aos dados experimentais. Os valores obtidos com o ajuste foram: $K_i = (1,5 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n = 3,6 \pm 1,0$ e $r_{max} = 0,56 \pm 0,12$. Podemos notar que, neste caso, o valor da constante de ligação aparente, K_A , dado por $K_A = (K_i)^n$, seria maior do que aquele encontrado na análise anterior, onde consideramos a aproximação $r_{max} \sim 1$. O valor obtido para r_{max} (0,56) confirma os dados estruturais obtidos por Takahara *et al.*, que mostram que aproximadamente 90% dos adutos formados entre a cisplatina e o DNA ocupam dois pares de bases [43].

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas

Neste trabalho, utilizando o modelo Worm Like - Chain (Cadeia Vermiforme) elaborado por Marko e Siggia [9], foi possível estudar as propriedades mecânicas dos complexos DNA - cisplatina, tais como: comprimento de persistência, A , o raio de giro, R_g , e a distância máxima ponta - à - ponta do polímero, $R_{ee}(max)$, em função de alguns parâmetros de interesse, dentre os quais podemos citar: tempo de difusão do fármaco e a concentração do fármaco na amostra. Mostramos que dados físico - químicos da interação DNA - cisplatina podem ser obtidos realizando - se apenas experimentos de estiramento. Além disso, mostramos ao utilizar a equação de Hill para ajustar os dados da Figura 5.7, que a ligação entre a cisplatina e a molécula de DNA é positivamente cooperativa ($n > 1$), o que está provavelmente relacionado com a formação de estruturas, tais como, ligações cruzadas e loops ao longo dos complexos DNA - cisplatina. As ideias apresentadas nesse trabalho podem fornecer uma nova visão na análise dos dados das ligações entre a molécula de DNA e outros fármacos.

Uma das perspectivas deste trabalho é a realização dos experimentos *in vivo*, utilizando a recém - inaugurada estrutura do nosso laboratório de cultura de células, para verificar possíveis correlações entre os efeitos da cisplatina no DNA e no comportamento de células vivas. Além disso, pretendemos caracterizar as interações do DNA com outros fármacos utilizados em tratamentos de câncer, utilizando a pinça óptica e a videomicroscopia. O primeiro candidato é o composto $PtKBU$, que foi sintetizado pelo professor Dr. Marcelo Ribeiro Leite de Oliveira do departamento de Química da

6. Conclusões e perspectivas

UFV. Tal caracterização pode fornecer informações úteis sobre o mecanismo de ação de fármacos e melhorar a eficácia dos tratamentos médicos atuais.

Apêndice A: Cálculo de $\langle r_{ee}^2 \rangle$ para um polímero nos limites rígido e flexível.

Seja $\vec{r}(0)$ o vetor posição que localiza a primeira extremidade do polímero e $\vec{r}(L)$ o vetor posição que localiza a outra extremidade. Com esse vetores, estamos colocando a primeira extremidade em $s = 0$, e conseqüentemente, a outra extremidade estará em $s = L$, o comprimento de contorno do polímero.

O módulo do vetor $\vec{r}_{ee}$ fornece a distância entre as duas extremidades do polímero. Esse vetor é dado por

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}(L) - \vec{r}(0) , \quad (\text{A.1})$$

e assim

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \langle [\vec{r}(L) - \vec{r}(0)]^2 \rangle . \quad (\text{A.2})$$

Mas, já sabemos que

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} , \quad (\text{A.3})$$

logo

$$\int_0^s d\vec{r} = \int_0^s \hat{t}(s') ds' , \quad (\text{A.4})$$

o que fornece

Apêndice A: Cálculo de $\langle r_{ee}^2 \rangle$ para um polímero nos limites rígido e flexível.

$$\vec{r}(s) = \vec{r}(0) + \int_0^s \hat{t}(s') ds' , \quad (\text{A.5})$$

Utilizando a equação A.2, obtemos

$$\begin{aligned} \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= \left\langle \left[\int_0^L \hat{t}(s') ds' \right] \cdot \left[\int_0^L \hat{t}(s'') ds'' \right] \right\rangle = \\ &= \int_0^L ds'' \int_0^L ds' \langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle . \end{aligned} \quad (\text{A.6})$$

Sabemos que

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \exp \left(-\frac{s}{A} \right) , \quad (\text{A.7})$$

e fazendo apenas uma mudança da origem do sistema, temos que

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle = \exp \left(-\frac{|s' - s''|}{A} \right) . \quad (\text{A.8})$$

Substituindo A.8 em A.6, podemos dividir a integral em duas partes iguais, de forma que

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = 2 \int_0^L \exp \left(\frac{-s''}{A} \right) ds'' \int_0^{s''} \exp \left(\frac{s'}{A} \right) ds' . \quad (\text{A.9})$$

Resolvendo essa integral, obtemos

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = 2AL - 2A^2 \left[1 - \exp \left(\frac{-L}{A} \right) \right] . \quad (\text{A.10})$$

Fazendo a separação para os limites flexível e rígido, temos

(i) Para $L \gg A$ (limite flexível):

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong 2AL , \quad (\text{A.11})$$

(ii) Para $L \ll A$ (limite rígido)*:

*Nesse limite expandimos a exponencial até segunda ordem.

Apêndice A: Cálculo de $\langle r_{ee}^2 \rangle$ para um polímero nos limites rígido e flexível.

$$\langle r_{ee}^2 \rangle \cong L^2 , \tag{A.12}$$

que são os resultados apresentados na seção 3.3.3.

Apêndice B: Cálculo do valor médio de $|t_{\perp}|^2$ (modelo WLC)

Nosso ponto de partida será a equação 3.27. A energia de cada modo normal é dada por

$$E_i = \frac{1}{2}k_B T \left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2 . \quad (\text{B.1})$$

A função de partição do sistema é dada por

$$\begin{aligned} Z &= \int \exp \left(-\frac{E_i}{k_B T} \right) d|\tilde{t}_i(q)| = \\ &= \int \exp \left[-\frac{1}{2} \left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2 \right] d|\tilde{t}_i(q)| = \\ &= \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{Aq^2 k_B T + F}} . \end{aligned} \quad (\text{B.2})$$

Dessa forma, podemos calcular o valor médio de $|\tilde{t}_i(q)|^2$, que por definição, é dado por

$$\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{1}{Z} \int |\tilde{t}_i(q)|^2 \exp \left[-\frac{1}{2} \left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2 \right] d|\tilde{t}_i(q)| . \quad (\text{B.3})$$

Esta é uma integral do tipo gaussiana que possui solução conhecida. Substituindo a função de partição Z no denominador pela equação B.3, chegamos a expressão

Apêndice B: Cálculo do valor médio de $|t_{\perp}|^2$ (modelo WLC)

$$\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{A q^2 k_B T + F} \quad (\text{B.4})$$

Por último, podemos calcular o valor médio de $|t_{\perp}|^2$ integrando - se o valor médio de $|\tilde{t}_i(q)|^2$ sobre todos os modos normais e multiplicando o resultado final por um fator 2, que corresponde às duas componentes (x e y) de $\vec{t}_{\perp}$. Dessa maneira

$$\langle |t_{\perp}|^2 \rangle = 2 \int \frac{dq}{2\pi} \langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{1}{\pi} \int dq \left(\frac{k_B T}{A q^2 k_B T + F} \right) \quad (\text{B.5})$$

Fazendo uma mudança de variável (chame $x^2 = A k_B T q^2 / F$), é possível identificar o resultado da integral como sendo a função arco-tangente, e nos limites de integração ($-\infty$ a $+\infty$), o resultado final é

$$\langle |t_{\perp}|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}, \quad (\text{B.6})$$

que é a equação 3.28.

Apêndice C: Artigos publicados

Neste apêndice apresentamos os artigos publicados durante o período de mestrado do autor desta dissertação (março de 2010 a fevereiro de 2012).

- Revista *Applied Physics Letters*

F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha,
“DNA-cisplatin binding mechanism peculiarities studied with single molecule stretching experiments”. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 083701 (2012).

- Revista *Integrative Biology*

F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha,
“DNA-cisplatin interaction studied with single molecule stretching experiments”.
Integ. Biol. **4**, 568-574 (2012).



DNA-cisplatin binding mechanism peculiarities studied with single molecule stretching experiments

F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos, and M. S. Rocha

Citation: *Appl. Phys. Lett.* **100**, 083701 (2012); doi: 10.1063/1.3689774

View online: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3689774>

View Table of Contents: <http://apl.aip.org/resource/1/APPLAB/v100/i8>

Published by the [American Institute of Physics](http://www.aip.org).

Related Articles

Absolute calibration of optical tweezers including aberrations

Appl. Phys. Lett. **100**, 131115 (2012)

Three dimensional optical twistors-driven helically stacked multi-layered microrotors

Appl. Phys. Lett. **100**, 121101 (2012)

Robust control approach to force estimation in a constant position optical tweezers

Rev. Sci. Instrum. **82**, 115108 (2011)

A method to track rotational motion for use in single-molecule biophysics

Rev. Sci. Instrum. **82**, 103707 (2011)

Dual-trap optical tweezers with real-time force clamp control

Rev. Sci. Instrum. **82**, 083102 (2011)

Additional information on *Appl. Phys. Lett.*

Journal Homepage: <http://apl.aip.org/>

Journal Information: http://apl.aip.org/about/about_the_journal

Top downloads: http://apl.aip.org/features/most_downloaded

Information for Authors: <http://apl.aip.org/authors>

ADVERTISEMENT

INSTRUMENTS FOR ADVANCED SCIENCE	
	Gas Analysis dynamic measurement of reaction gas streams catalysis and thermal analysis molecular beam studies dissolved species probes fermentation, environmental and ecological studies
Surface Science UHV TPD SIMS end point detection in ion beam etch elemental imaging - surface mapping	Plasma Diagnostics plasma source characterisation etch and deposition process reaction kinetic studies analysis of neutral and radical species
Vacuum Analysis partial pressure measurement and control of process gases reactive sputter process control vacuum diagnostics vacuum coating process monitoring	
contact Hiden Analytical for further details: info@hiden.co.uk www.HidenAnalytical.com CLICK TO VIEW OUR PRODUCT CATALOGUE 	

DNA-cisplatin binding mechanism peculiarities studied with single molecule stretching experiments

F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos, and M. S. Rocha^{a)}

Laboratório de Física Biológica, Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

(Received 11 November 2011; accepted 8 February 2012; published online 24 February 2012)

We propose a method to determine the DNA-cisplatin binding mechanism peculiarities by monitoring the mechanical properties of these complexes. To accomplish this task, we have performed single molecule stretching experiments by using optical tweezers, from which the persistence and contour lengths of the complexes can be promptly measured. The persistence length of the complexes as a function of the drug total concentration in the sample was used to deduce the binding data, from which we show that cisplatin binds cooperatively to the DNA molecule, a point which so far has not been stressed in binding equilibrium studies of this ligand.

© 2012 American Institute of Physics. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.3689774>]

DNA interactions with ligands such as drugs or proteins are important to many areas of knowledge, from the comprehension of basic intracellular processes to the application in the treatment of human diseases. Cisplatin [Pt(NH₃)₂Cl₂] and its analogues carboplatin and oxaliplatin are antitumor platinum-based compounds usually used in cancer chemotherapy, especially to treat head, neck, testicular, ovarian, and non-small cell lung cancers.¹ In aqueous solution, the two chloride ions dissociate and the compound incorporates two water molecules, reaching its active state, which can bind to DNA.² Some aspects of the DNA-cisplatin interaction are currently well established, such as the mechanism of action of the compound as an anticancer drug, which consists in damaging the DNA molecule with adducts that form inter-strand and intrastrand crosslinks.³ These crosslinks hinder the DNA replication by introducing strong structural perturbations on the molecule such as bendings, partial unwinding, and loops.^{3–6}

In this work, we show that the mechanical properties of DNA-cisplatin complexes can be used to infer that cisplatin binds cooperatively to DNA, allowing us to estimate the values of important chemical parameters such as the apparent binding constant and the degree of cooperativity. To accomplish this task, we have performed DNA stretching experiments by using optical tweezers. From these measurements, we determine how the mechanical properties of the DNA are modified by the action of cisplatin as a function of the drug concentration in the sample, thus deducing the binding mechanism and determining the above cited parameters.

The optical tweezers setup, the experimental procedure, and the sample preparation are essentially the same which were previously detailed in our Ref. 7. The DNA-drug complexes are prepared in a phosphate buffered saline (PBS) solution with pH = 7.4 and [NaCl] = 140 mM. The optical tweezers is calibrated by using two independent methods: Stokes force calibration and by analyzing the Brownian fluctuations of the trapped bead.^{7,8} The DNA base-pair concentration used in all experiments was $C_{bp} = 8.9 \mu\text{M}$. In essence,

we use the optical tweezers to trap a polystyrene bead attached to the DNA while moving the microscope stage by using a piezoelectric actuator, thus determining the experimental force curve. The pulling velocities used in this procedure are within the range of 250–750 nm/s. Next, we use the wormlike chain (WLC) model⁹ to obtain the persistence and contour lengths of the DNA molecules and DNA-drug complexes. For the bare λ -DNA molecule, we find the average values $A = 50 \pm 3 \text{ nm}$ and $L = 16.5 \pm 1 \mu\text{m}$, corresponding to well-known values reported in the literature.⁷ The method, therefore, can be used to study the variation of these parameters for DNA-cisplatin complexes as a function of drug total concentration in the sample. We have adjusted the laser power to obtain maximum stretching forces on the order of ~ 1 to 2 pN, since we are interested in determining the mechanical properties changes in the entropic regime. Working with forces as low as possible has some advantages. First, in this force regime, no hysteresis is found when stretching the DNA-cisplatin complexes within a broad range of pulling velocities, as can occur for high forces.⁶ Second, we do not disturb significantly the chemical equilibrium between the DNA and the drug.^{7,10} Finally, although the DNA is tightly bound to the histone proteins inside the crowded cell's environment, there are theoretical and experimental evidences suggesting that the net forces acting on the DNA are on the order of a few piconewtons.¹¹

In all experiments, we start stretching a bare DNA molecule to verify if the system is well calibrated and returning reliable results. We then repeat this stretching experiment seven times using the same DNA molecule to verify the reproducibility of the results, therefore getting the average values and the corresponding error bars of the mechanical properties. Next, we remove the buffer solution of the sample by using a micropipette, introducing another buffer solution containing the drug at a chosen concentration C_T . We wait ~ 10 – 15 min after changing the concentration before starting the next stretching experiment. This time interval was chosen because it is approximately the time necessary for the DNA-cisplatin complexes to achieve the chemical equilibrium, with stationary mechanical properties, as can be seen in Fig. 1. In this figure, we have plotted the behavior of

^{a)}Electronic mail: marcos.rocha@ufv.br. Telephone: 55-31-38993399. Fax: 55-31-38992483.

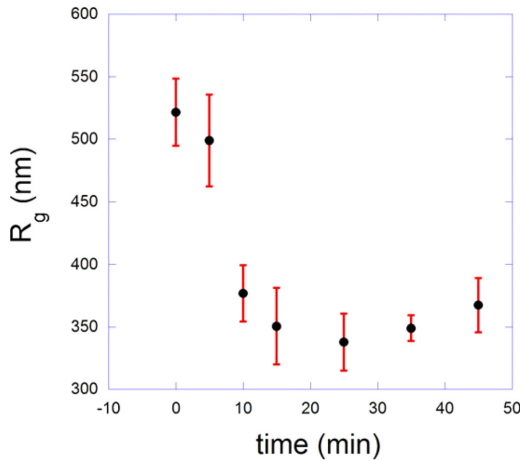


FIG. 1. (Color online) Behavior of the radius of gyration R_g of DNA-cisplatin complexes for a drug total concentration $C_T = 2$ mM. Observe that R_g decreases as the complex approaches to the chemical equilibrium, indicating that the DNA molecule is being compacted by the action of cisplatin.

the radius of gyration as a function of time for a fixed drug concentration (2 mM). The radius of gyration R_g of a semi-flexible chain can be calculated knowing the persistence length A and the contour length L (which is not changed by the action of cisplatin⁴) by $R_g \approx \sqrt{AL(1/3 - A/L)}$ for $L \gg A$, which is the case of λ -DNA.¹² Thus, the stationary behavior of this parameter after ~ 10 – 15 min implies that A has reached its stationary equilibrium value. In addition, we have not observed any hysteresis in the force curves when stretching and relaxing the DNA-cisplatin complexes, which strengthens the argument that the complexes are in equilibrium.⁶ A result similar to that shown in Fig. 1 was also obtained for $70 \mu\text{m}$ (not shown). These results are in agreement with previous works performed with atomic force microscopy⁴ and fluorescence microscopy,¹³ which have shown that cisplatin can induce DNA compaction by means of bridging distant DNA segments along its contour and, therefore, drastically reducing its overall sizes as measured by R_g .

Figure 2 shows the behavior of the persistence length A as a function of drug total concentration in the sample C_T . Observe that the persistence length decreases monotonically with the drug concentration in the sample, indicating again that cisplatin increases the flexibility of the complexes. We emphasize that all the data presented in Fig. 2 were obtained with the same DNA-cisplatin complex, changing the concentration in the sample as described earlier. The *inset* in Fig. 2 shows the fraction of bound cisplatin $r = C_b/C_{bp}$ (the ratio between the bound ligand concentration C_b and the DNA base-pair concentration C_{bp}) as a function of the free (not bound) ligand concentration in solution C_f . This binding data can be determined from the persistence length as follows.

The effective persistence length A_{eff} of a DNA-ligand complex in chemical equilibrium with a certain amount of ligand (at a total concentration C_T) can be calculated by

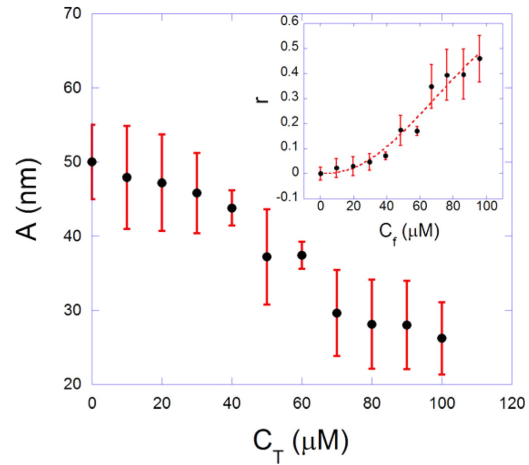


FIG. 2. (Color online) Persistence length A as a function of drug total concentration in the sample C_T . Observe that A decreases monotonically with the drug concentration in the sample. *Inset*: Fraction of bound cisplatin $r = C_b/C_{bp}$ as a function of the free drug concentration in solution C_f , determined from the persistence length. The dashed line is a fitting to the proposed model, which combines Eqs. (1)–(3). From this fitting, we found the adjustable parameters $K_A = (2.2 \pm 0.1) \times 10^9$ and $n = 2.3 \pm 0.3$.

knowing the persistence lengths of a bare DNA (A_0) and of a saturated DNA-ligand complex (A_1) with the relation^{14,15}

$$\frac{1}{A_{eff}} = \frac{1-r}{A_0} + \frac{r}{A_1}. \quad (1)$$

The values of A_0 and A_1 can be estimated numerically from our experimental data, since these are the asymptotical values of A as $C_T \rightarrow 0$ and $C_T \rightarrow \infty$, respectively. Therefore, using the data of Fig. 2, we find $A_0 = 50.5 \pm 3$ nm and $A_1 = 16.8 \pm 11$ nm. The result obtained for A_0 with this analysis is the value of the persistence length of a bare DNA molecule, as expected. On the other hand, the result obtained for A_1 is in good agreement with the value reported by Hou *et al.* for DNA-cisplatin saturated complexes (14.9 nm).⁴

Observe also that the total, bound, and free drug concentrations are linked by the relation

$$C_T = C_b + C_f. \quad (2)$$

By using Eqs. (1) and (2), we can deduce the behavior of r as a function of C_f . First, r is found for each value of C_T directly from Eq. (1), since we know A_{eff} for each value of C_T from the data of Fig. 2. In addition, by using Eq. (2) with $C_b = rC_{bp}$, we can also determine C_f for each value of C_T . The behavior of r as a function of C_f is plotted in the *inset* of Fig. 2 (circles). The partitioning of the ligand between the solution and the DNA molecule is, therefore, estimated based on pure mechanical measurements, in contrast with more traditional methods such as equilibrium dialysis or optical techniques.

To continue the analysis any further, we assume a Hill mechanism for the interaction, as suggested by the sigmoidal form of the two curves presented in Fig. 2.¹² The Hill

equation, which takes cooperativity into account, relates the bound ligand fraction r with the free ligand concentration C_f by

$$r = \frac{K_A C_f^n}{1 + K_A C_f^n}, \quad (3)$$

where K_A is the apparent association binding constant and n is the Hill coefficient, a parameter usually used to measure the degree of cooperativity in chemical reactions. If $n > 1$, the interaction is positively cooperative, i.e., a bound ligand molecule increases the affinity of DNA for subsequent ligand binding. If $n < 1$, otherwise, the interaction is negatively cooperative and a bound ligand molecule decreases the affinity of DNA for subsequent ligand binding. If $n = 1$, the interaction is non-cooperative and the affinity is independent of the number of bound ligand molecules.

The Hill equation was used to fit the data of $r \times C_f$ (dashed line in the inset of Fig. 2), with two adjustable parameters: K_A and n . Observe that the proposed model fits well to the experimental data. The returned values of the parameters are $K_A = (2.2 \pm 0.1) \times 10^9$ and $n = 2.3 \pm 0.3$. The result obtained for K_A is in good agreement with the result reported by Chen *et al.* (8.4×10^8),¹⁶ who have calculated this association constant for small DNA fragments (13 base pairs). In their work, however, cooperativity is absent since the long-distance crosslinks and loops cannot occur in very small DNA fragments, and, therefore, their association constant may be underestimated. We have not found in the literature a measurement or calculation of the parameter n to compare with our result. Nevertheless, the fact that we have obtained $n > 1$ from the fitting process indicates that cisplatin binds to the DNA with positive cooperativity.

Cooperativity plays an important role in the DNA interactions with many types of drugs¹⁷ and proteins.¹⁸ In the present case, it arises from the changes on the mechanical properties of the DNA molecule induced by cisplatin. Intuitively, this positive cooperativity could be expected in DNA-cisplatin interaction, since the long-distance crosslinks and loops induced in the DNA by the drug approximate different strand segments as the drug concentration is increased, there-

fore increasing the probability of cisplatin binding, forming even more crosslinks and loops. A nearly similar binding mechanism was also observed for the bacterial nucleoid-associated protein H-NS.¹⁹

In conclusion, we have proposed a method to analyze cooperativity by monitoring the changes on the mechanical properties of DNA-ligand complexes. This method can be extended to other types of ligands following the ideas presented here. The only requirement is that the persistence length of the complexes must change as the drug binds to DNA, which can limit the practical application of the method to ligands that induce considerable conformational changes on the DNA molecule.

This work was supported by the Brazilian agencies: FAPEMIG, CNPq, FUNARBE-UFV, and PRONEX-FACEPE. We also thank Professor O. N. Mesquita, who has lent the infrared laser used in this work.

- ¹S. G. Chaney, S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu, and M. Faldut, *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1551 (2004).
- ²A. L. Pinto and S. J. Lippard, *Biochim. Biophys. Acta.* **780**, 167 (1985).
- ³K. Stehlikova and H. Kostrhunova, *Nucleic Acids Res.* **30**, 2894 (2002).
- ⁴X.-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.* **37**, 1400 (2009).
- ⁵N.-K. Lee, J.-S. Park, A. Johnner, S. Obukhov, J.-Y. Hyon, K. J. Lee, and S.-C. Hong, *Phys. Rev. Lett.* **101**, 248101 (2008).
- ⁶R. Krautbauer, H. C. Schaumann, and H. E. Gaub, *Angew. Chem., Int. Ed.* **39**, 3912 (2000).
- ⁷M. S. Rocha, M. C. Ferreira, and O. N. Mesquita, *J. Chem. Phys.* **127**, 105108 (2007).
- ⁸K. C. Neuman and S. M. Block, *Rev. Sci. Instrum.* **75**, 2787 (2004).
- ⁹J. F. Marko and E. D. Siggia, *Macromolecules* **28**, 8759 (1995).
- ¹⁰I. D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nunez, I. Rouzina, and M. C. Williams, *Nat. Methods* **4**, 517 (2007).
- ¹¹R. Blossey and H. Schiessel, *FEBS J.* **28**, 3619 (2011).
- ¹²M. Daune, *Molecular Biophysics* (Oxford University Press, Oxford, 1999).
- ¹³Y. Katsuda, Y. Yoshikawa, T. Sato, Y. Saito, M. Chikuma, M. Suzuki, and K. Yoshikawa, *Chem. Phys. Lett.* **473**, 155 (2009).
- ¹⁴M. S. Rocha, *Phys. Biol.* **6**, 036013 (2009).
- ¹⁵I. Rouzina and V. A. Bloomfield, *Biophys. J.* **74**, 3152 (1998).
- ¹⁶Y. Z. Chen, Y.-L. Zhang, and E. W. Prohofsky, *Phys. Rev. E* **55**, 5843 (1997).
- ¹⁷Y. Qu, N. J. Scarsdale, M.-C. Tran, and N. P. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 19 (2003).
- ¹⁸J. Rudnick and R. Bruinsma, *Biophys. J.* **76**, 1725 (1999).
- ¹⁹R. T. Dame, M. C. Noom, and G. J. L. Wuite, *Nature* **444**, 387 (2006).

Cite this: *Integr. Biol.*, 2012, **4**, 568–574www.rsc.org/ibiology

PAPER

DNA–cisplatin interaction studied with single molecule stretching experiments

F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos and M. S. Rocha*

Received 16th December 2011, Accepted 23rd March 2012

DOI: 10.1039/c2ib00183g

By performing single molecule stretching experiments with optical tweezers, we have studied the changes in the mechanical properties of DNA–cisplatin complexes as a function of some variables of interest such as the drug diffusion time and concentration in the sample. We propose a model to explain the behavior of the persistence length as a function of the drug concentration, extracting the binding data from pure mechanical measurements. Such analysis has allowed us to show that cisplatin binds cooperatively to the DNA molecule. In addition, DNA compaction by the action of the drug was also observed under our experimental conditions by studying the kinetics of some mechanical properties such as the radius of gyration and the end-to-end distance, e.g. Crisafuli *et al.*, *Integr. Biol.*, 2011, xx, xxxx.

1 Introduction

DNA interactions with ligands such as drugs or proteins are important to many areas of knowledge. In fact, many intracellular processes such as cell division and gene expression depend on the DNA topology,¹ which in turn, depends on the mechanical properties of the DNA molecule. It is known that these properties can be strategically changed inside the cell by the action of enzymes such as the helicases and the topoisomerases, therefore allowing the occurrence of such processes. On the other hand, cancer chemotherapy is a field in which the details about DNA–drugs interactions are important. In fact, some drugs such as the anthracycline antibiotics and the platinum-based compounds exhibit a strong affinity to the DNA of cancer cells. When these drugs bind to DNA they can inhibit its replication, stopping the tumor growth. Gene therapy, for instance, is another field of medical sciences in which this knowledge is also important. In this kind of therapy, DNA

molecules are usually transported from outside to inside living cells in order to substitute defective genes, consequently correcting cell malfunctions. This transport can be accomplished easily if the DNA molecule is previously compacted by using cationic ligands, which electrostatically bind to the DNA molecule. These applications show the importance to study and understand the details behind DNA interactions with ligands.

Cisplatin [Pt(NH₃)₂Cl₂] and its analogues carboplatin and oxaliplatin are antitumor platinum-based compounds usually used in cancer chemotherapy, especially to treat head, neck, testicular, ovarian and non-small cell lung cancers.² In aqueous solution, the two chloride ions dissociate and the compound incorporates two water molecules, reaching its active state, which can bind to DNA.³ Some aspects of the DNA–cisplatin interaction are currently well established, such as the mechanism of action of these compounds as anticancer drugs, which involves damaging the DNA molecule with adducts that form interstrand and intrastrand crosslinks.⁴ These crosslinks hinder the DNA replication by introducing strong structural perturbations on the molecule such as bendings, partial unwinding and loops.^{4–6} In this work we characterize the interaction of DNA molecules with the drug cisplatin by performing single molecule stretching experiments with optical tweezers. From these measurements,

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

Insight, innovation, integration

This paper presents a kinetic and equilibrium study of the DNA–cisplatin interaction. The central result is the innovative deduction of the binding data from pure mechanical measurements. We have found that cisplatin interacts cooperatively with DNA, a point which so far has not been stressed in binding

equilibrium studies of this ligand. Finally, the ideas presented in this work can give insights into how to analyze the binding data of DNA with other kinds of ligands. The only prerequisite is that the particular ligand to be studied should modify at least one mechanical property of DNA when binding.

we determine how the mechanical properties of the DNA, such as the persistence length and the radius of gyration, are modified by the action of the drug as a function of some parameters of interest, like the drug diffusion time and the drug concentration in the sample. The persistence length of the complexes as a function of the drug total concentration in the sample was used to deduce the binding data, from which we show that cisplatin binds cooperatively to the DNA molecule, a point which so far has not been stressed in binding equilibrium studies of this ligand. Such a characterization can provide helpful information to understand new aspects about the mechanism of action of the drug and to help improve the efficacy of current medical treatments.

2 Experimental procedure

2.1 Experimental setup

Our optical tweezers use a 832 nm, 150 mW (maximum output power) diode laser (SDL, 5422-H1), operating in the usual TEM₀₀ mode. The beam is expanded to a ~ 1.0 cm diameter spot by using lenses and passed through a 100 $\times$, N.A. 1.4 Plan Apo Nikon oil immersion objective mounted on a Nikon Ti-S inverted microscope. A piezoelectric actuator (Newport NanoPZ) is used to move the microscope stage with controlled velocity. To visualize the sample and to film the experiments, we use a CCD digital camera (Jai, CM-140GE), which provides a spatial resolution of 20.7 pixels per μm . The ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) is used to analyze the captured movies, allowing one to calibrate the optical tweezers and to determine the force curves of the DNA molecules and DNA–drug complexes, as discussed in Sections 2.3 and 2.4.

2.2 Sample preparation

In this work the samples consist of λ -DNA molecules (Promega Corp.) in a Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 with [NaCl] = 140 mM solution. We attach one end of the molecule to a microscope coverslip, and the other end is attached to a 3.0 μm diameter polystyrene bead (Polysciences Inc.). To perform this task, we use the procedure described by Shivashankar *et al.*⁷ With this procedure, one obtains 5% to 10% of the DNA attached simultaneously both to the coverslip and to one bead, which is the condition that we need to perform the experiments. The sample is always prepared with bare DNA molecules (without any drug) and all the experiments are started by stretching a bare DNA molecule in order to verify if the system is well calibrated and returning reliable results. The sample chamber consists of an O-ring glued on the microscope coverslip containing the working solution, which can be changed by using a micropipette, so that the drug concentration in the sample can be freely modified. The DNA base-pair concentration used in all experiments was $C_{\text{bp}} = 8.9 \mu\text{M}$.

2.3 Optical tweezers calibration

To study the changes in the mechanical properties of the DNA molecules induced by cisplatin, we use optical tweezers to stretch the DNA–drug complexes, determining the force–extension curve. To perform these measurements, the optical tweezers must be previously calibrated, *i.e.*, the trap stiffness of the tweezers κ must be determined.

We have used two independent techniques to determine the tweezers' stiffness κ : (a) indirect Stokes force calibration and (b) by analyzing the position autocorrelation function of the trapped bead.

In the first method, we firstly capture a free bead (without attached DNA) in the sample with the optical tweezers. We then move the microscope stage with a controlled velocity by using the piezoelectric actuator, inducing a fluid flow on the bead, which displaces it from the bottom of the tweezers' potential well. Measuring this displacement (Δx) with conventional videomicroscopy, one can promptly determine κ by equaling the optical force on the bead ($F_{\text{opt}} = \kappa \Delta x$) to the Stokes force ($F_{\text{Sto}} = 6\pi\eta a v$), where η is the surrounding fluid viscosity, a is the radius of the bead and v is the velocity of the fluid flow. When this experiment is performed with a bead localized at a distance h from the coverslip which is comparable to its radius, the friction coefficient $\gamma = 6\pi\eta a$ from the Stokes formula must be corrected to take into account the wall effects, which was performed using Faxen's corrected expression,⁸

$$\gamma = 6\pi\eta a \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h} \right)^3 + \dots \right]^{-1}. \quad (1)$$

In the second method, we capture a ~ 3 second movie of a trapped bead with a high-speed camera (~ 500 frames per second, AVT Guppy F503B CMOS camera) and determine the coordinates x and y of its center as a function of time by using standard centroid-finding algorithms. The position autocorrelation function (PAF) $\langle x(t)x(0) \rangle$ of the bead can then be easily calculated from these data. The experimental PAF can be fitted to the theoretical expression⁹

$$\langle x(t)x(0) \rangle = \frac{k_{\text{B}}T}{\kappa} \exp\left(-\frac{t\kappa}{\gamma}\right), \quad (2)$$

where k_{B} is Boltzmann's constant and T is the absolute temperature. From this fitting, κ can be determined from the amplitude or from the characteristic time ($\tau = \gamma/\kappa$) of the PAF.

The stiffness of our tweezers is the same for bead motion in the x or y directions (due to the symmetry of the potential well in the xy plane), which are the directions parallel to the coverslip. The two presented methods can be used to measure this transverse trap stiffness, providing results that agree within 10%. In this work, we have adjusted the laser power to obtain $\kappa = 0.40 \pm 0.04 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$. With this trap stiffness, the maximum forces obtained when stretching the DNA are on the order of ~ 1 to 2 pN.

2.4 DNA stretching

To stretch the DNA molecule, we use the optical tweezers to trap the polystyrene bead attached to the DNA, while moving the microscope stage (and consequently the coverslip) in the x -direction by using the piezoelectric actuator. The pulling velocities used in this procedure are within the range of 250–750 nm s^{-1} . Such velocities are low enough to guarantee both that the DNA passes through equilibrium configurations and that the Stokes force on the bead is negligible. Therefore, the optical force is equal in modulus to the force exerted by the DNA molecule to pull the bead out of the potential well. To measure this force, we film the entire stretching experiment with the CCD camera and determine the position of the bead center as a function of time, $x(t)$. Therefore, knowing the initial

position $x(0)$ of the bead, which is the bottom of the potential well, we can easily calculate the change of the bead position as a function of time $\Delta x(t) = x(t) - x(0)$ and the force $F(t) = \kappa \Delta x(t)$. The projection of DNA extension in the x -direction (x_{DNA}) is calculated by using the velocity of the coverslip, and therefore one can determine the force–extension curve.

Finally, with the experimental force–extension curve, we use the WormLike Chain (WLC) model¹⁰ to obtain the persistence and contour lengths of the DNA molecules and DNA–drug complexes,

$$F_x = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \times \frac{x_{\text{DNA}}}{\sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}}, \quad (3)$$

where F_x is the x -component of the force, k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, A is the DNA persistence length (the correlation length of the polymer chain, which reflects the polymer global flexibility), L is the DNA contour length (the length of the polymer itself), x_{DNA} is the projection of the DNA molecule' end-to-end distance along the x -axis (parallel to the coverslip) and h is the height of the bead relative to the coverslip (distance between the center of the bead and the coverslip). The height is fixed in all experiments at $h = 3.5 \mu\text{m}$. The end-to-end distance z of the DNA molecule is related to x_{DNA} by $z = \sqrt{x_{\text{DNA}}^2 + h^2}$.

Fig. 1 shows a typical force–extension curve for a bare DNA molecule obtained with this procedure. The experimental points in this figure are represented by circles, and the solid line corresponds to a fitting to eqn (3). Observe that the WLC model fits well to our experimental data, which has allowed us to determine the mechanical parameters A and L with accuracy. For the bare λ -DNA molecule, in fact, we find the average values $A = 50 \pm 3 \text{ nm}$ and $L = 16.5 \pm 1 \mu\text{m}$. These results correspond to well-known values reported in the literature.^{11,12} The method therefore can be used to study the variation of these parameters for DNA–cisplatin complexes as a function of some parameters of interest.

As pointed before, we limit the output power of the laser beam so that the maximum stretching forces are on the order of $\sim 1\text{--}2 \text{ pN}$. There are some advantages of working in this regime. Firstly, eqn (3) is an approximate expression which works only in the entropic regime, where the forces applied to the DNA molecule are low enough. Therefore, it is expected that such an expression better describes experiments performed under low forces. Secondly, in this force regime, no hysteresis is found in the force curves when stretching and relaxing the DNA–cisplatin complexes within a broad range of pulling velocities, as can occur for high forces.¹³ Thirdly, we do not disturb significantly the chemical equilibrium between the DNA and the drug at this force regime.¹⁴ It is well established now that higher applied forces may change the chemical equilibrium between the DNA and the drug molecules in solution. In fact, recently Vladescu *et al.* have shown that important interaction

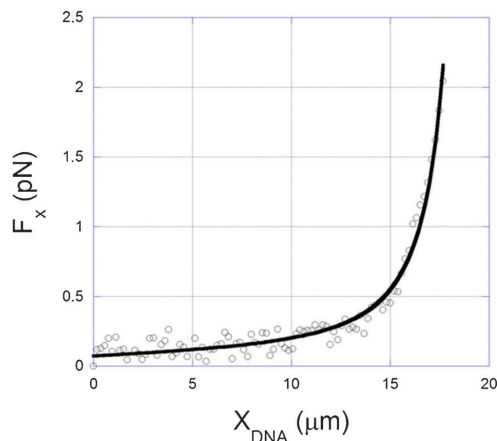


Fig. 1 Force–extension curve of a bare DNA molecule obtained with our experimental setup. Circles: experimental data; Solid line: a fitting to eqn (3).

parameters such as the intrinsic binding constant and the exclusion number depend strongly on the applied force on the DNA–drug complexes,¹⁴ and therefore it is expected that mechanical properties such as the persistence and the contour lengths of these complexes are also force-dependent, since they usually depend on the quantity of the drug bound to the DNA. Finally, although the DNA is tightly bound to the histone proteins inside the crowded cell's environment, there is theoretical and experimental evidence suggesting that the net forces acting on the DNA are on the order of a few piconewtons.¹⁵

3 Results and discussion

3.1 Kinetics of DNA–cisplatin interaction

In order to characterize the typical time scale for the DNA–cisplatin complexes to achieve the chemical equilibrium under our experimental conditions, we have firstly studied the kinetics of the DNA–cisplatin interaction. From these measurements, we have also monitored the changes in the mechanical properties of the DNA–drug complexes as a function of the diffusion time of the drug in the sample chamber.

We start stretching a bare DNA molecule to verify if the system is well calibrated and returning reliable results. We then repeat this stretching experiment seven times using the same DNA molecule to verify the reproducibility of the results, therefore getting the average values and the corresponding error bars of the mechanical properties. Next, we remove the PBS solution of the sample by using a micropipette, introducing a new PBS solution containing the drug at a chosen concentration C_T . During the entire procedure of drug concentration changing, which takes less than 1 minute, the bead is maintained trapped in the optical tweezers, therefore avoiding the loss of the DNA molecule. The stretching experiments are then repeated sequentially after waiting for arbitrarily chosen time intervals to study the changes in the mechanical properties of the complexes as a function of time, with a fixed drug concentration.

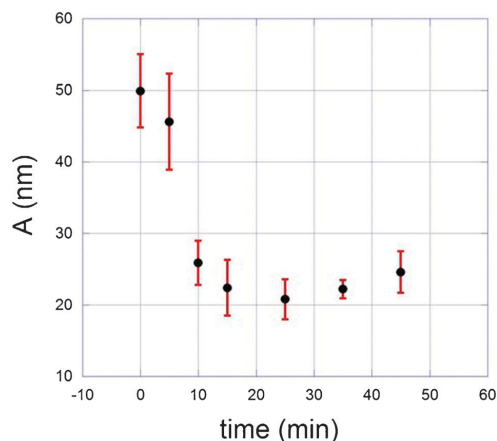


Fig. 2 Persistence length A as a function of the drug diffusion time in the sample, for $C_T = 2$ mM. Observe that A decreases as a function of time, indicating a considerable increase in the number of bendings present on the complex as the chemical equilibrium approaches, with more drug bound to the DNA molecule.

Fig. 2 shows the typical behavior of the persistence length of a DNA–cisplatin complex for a drug concentration $C_T = 2$ mM in the sample. Observe that the persistence length decreases as a function of time, indicating a considerable increase in the number of bendings present on the complex as the chemical equilibrium approaches, with more drug bound to the DNA molecule. This result is in agreement with previous experiments performed by atomic force microscopy⁵ and fluorescence microscopy,¹⁶ which have demonstrated DNA compaction by cisplatin. As discussed by these authors, DNA compaction due to the interaction with cisplatin is related to the adducts and crosslinks that are formed between different parts of the DNA molecule, introducing bendings and loops that reduce the equilibrium end-to-end distance of the molecule. Nevertheless, it is worth emphasizing that the persistence length that we measure and study in this work is the effective (apparent) one. As described in the WLC model, this quantity is the correlation length of the polymer chain, which depends on the loops induced by cisplatin. Albeit the measured persistence length decreases as the drug binds, this fact does not mean that the local rigidity is decreased, since the decrease in the effective persistence length is strongly correlated to the loops introduced by cisplatin. In fact, it is known that drug-induced crosslinks can increase the local rigidity of a DNA–ligand complex, and this local increase is reflected in an increase in the WLC persistence length for ligands that do not introduce loops in the DNA molecule, such as the psoralen molecule.¹⁷

In the case of our experiments, which are performed with very low stretching forces, the adducts and crosslinks induced by cisplatin cannot be broken while stretching the DNA, and therefore we observe a decrease in the “apparent contour length” measured by fitting the force–extension curve to eqn (3). Nevertheless, one should note that the results returned by the fitting process are not the real contour lengths of the complexes, since this quantity is defined as being the total length along the polymer chain, which

cannot be determined directly from our measurements because of the loops introduced.

Therefore, to characterize the linear size of the complexes, we measure the maximum average end-to-end distance $R_{ee}(\max)$, *i.e.* the average extension of the DNA–drug complex immediately before the bead is pulled out from the potential well of the tweezers. Even if this quantity presents a small variation from one stretching experiment to another (due to the Brownian fluctuations of the bead), its average value obtained from a series of repeated measurements is well characterized. An advantage in characterizing the linear size of the complexes by this quantity instead of the contour length, besides solving the problem discussed above, is that it can be measured directly from the experimental data, *i.e.*, it is independent of any model and/or fitting process.

Fig. 3 shows the corresponding $R_{ee}(\max)$ of the same DNA–cisplatin complexes shown in Fig. 2. Observe that $R_{ee}(\max)$ also decreases as the sample approaches the chemical equilibrium, indicating that the DNA molecule is really being compacted by the action of cisplatin. This type of kinetic experiment was also performed by us using lower drug concentrations such as $C_T \approx 70$ μ M (not shown), with similar results.

Another useful quantity that can be used to characterize the size of the complexes is the radius of gyration, which can be calculated directly from our data. In fact, it is the best parameter to describe DNA compaction since it gives directly a real idea about the sizes of the compacted DNA–cisplatin complexes. For semiflexible polymers in the entropic regime and with $L \gg A$, which is the case of λ -DNA, the radius of gyration R_g is given by¹⁸

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{3}AL\left(1 - \frac{3A}{L} + \dots\right)}. \quad (4)$$

Therefore, using the values of the persistence length from Fig. 2 and $L = 16.5$ μ m (the initial contour length, before adding the drug), one can promptly calculate the radius of

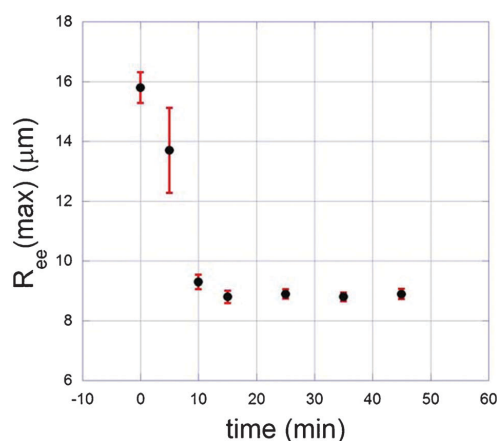


Fig. 3 Maximum average extension $R_{ee}(\max)$ for the same DNA–drug complexes of Fig. 2. Observe that $R_{ee}(\max)$ also decreases as the sample approaches to the chemical equilibrium, indicating that the DNA molecule is really being compacted by the action of cisplatin.

gyration as a function of time. The assumption that the contour length remains approximately constant is reasonable, since the adducts and crosslinks introduced by the cisplatin do not modify significantly the distance between consecutive base-pairs along the polymer chain.⁵

Alternatively, the size of the complexes can also be characterized by the equilibrium end-to-end distance $R_{ee}(0)$ of the polymer, when no force is applied at all. This quantity can also be calculated from our data. For $L \gg A$, it is given by¹⁸

$$R_{ee}(0) = \sqrt{2AL \left(1 - \frac{A}{L} + \dots \right)}. \quad (5)$$

From the last two equations, it is easy to note that the persistence length plays a fundamental role in determining the equilibrium size of the DNA–drug complexes. Fig. 4 shows the behavior of R_g and $R_{ee}(0)$ for the data of Fig. 2. The equilibrium value of the radius of gyration obtained here (~ 350 nm) agrees well with the typical sizes of compacted DNA–cisplatin complexes measured by Yoshikawa *et al.* with fluorescence microscopy.¹⁶

3.2 Mechanical properties as a function of drug concentration

Once we have determined the typical time scale for the DNA–cisplatin complexes to achieve the chemical equilibrium, the changes in the mechanical properties of these complexes as a function of drug concentration can be studied under the equilibrium conditions. We have developed a model from which the binding data of the ligand can be deduced from these pure mechanical measurements, eliminating the need to use other methods such as equilibrium dialysis or optical techniques in addition to the stretching experiments to perform a complete characterization of DNA–cisplatin complexes.

Fig. 5 shows the behavior of the persistence length A as a function of drug total concentration in the sample, C_T . Observe that the persistence length decreases monotonically with the drug concentration in the sample, corroborating to the fact that

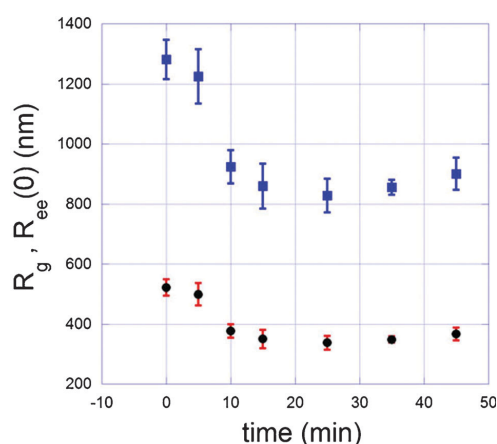


Fig. 4 Behavior of the radius of gyration R_g (circles) and equilibrium end-to-end distance $R_{ee}(0)$ (squares) for the same complexes shown in Fig. 2. Observe that both quantities decrease as the sample approaches to the chemical equilibrium, as expected.

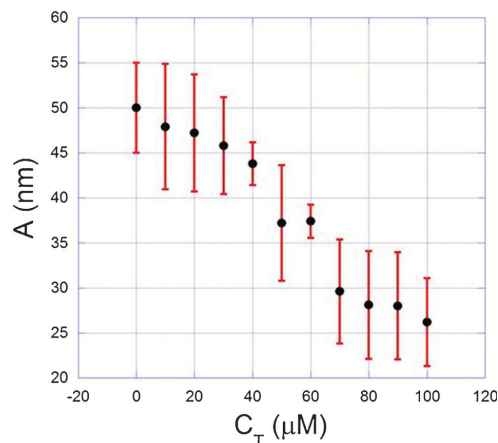


Fig. 5 Persistence length A as a function of drug total concentration in the sample C_T . Observe that A decreases monotonically with the drug concentration in the sample. The sigmoidal shape of the curve suggests a cooperative binding mechanism between cisplatin and DNA.

cisplatin compacts the complexes. We emphasize that all the data presented in Fig. 5 were obtained with the same DNA–cisplatin complex, changing the concentration in the sample as described earlier. In this experiment, we wait for 10–15 minutes after changing the concentration before starting the next stretching experiment. This time interval was chosen because it is approximately the time necessary for the complex to achieve the plateau shown in Fig. 2, with stationary mechanical properties. This experiment was also performed by us by waiting for 20–25 minutes after changing the drug concentration in the sample (not shown), with nearly similar results. In addition, as stated earlier, we have not observed any hysteresis in the force curves when stretching and relaxing the DNA–cisplatin complexes, which strengthens the argument that the complexes are in equilibrium.¹³ Finally, to guarantee that the results presented in Fig. 5 were not an artifact due to a particular DNA–cisplatin complex, we have repeated the entire experiment using other samples prepared equally, and the results obtained were the same within the experimental error bars.

The sigmoidal shape of the curve presented in Fig. 5 suggests a cooperative binding mechanism between cisplatin and DNA. Cooperativity plays an important role in the DNA interactions with many types of drugs^{19,20} and proteins.^{21,22} In the present case, it arises from the changes in the mechanical properties of the DNA molecule induced by cisplatin. Intuitively, a positive cooperativity could be expected in DNA–cisplatin interaction, since the long-distance crosslinks and loops induced in the DNA by the drug approximate different strand segments as the drug concentration is increased, therefore increasing the probability of cisplatin binding, forming even more crosslinks and loops. A nearly similar mechanism was recently observed for the H–NS binding protein by Dame *et al.*, who have shown that the cooperative behavior in this case arises as an intrinsic property of DNA bridging due to duplex proximity.²² Nevertheless, to our knowledge, our work is the first one which has experimentally verified and quantified this degree of cooperativity for the cisplatin. As stated earlier, we have developed a simple

quantitative model to understand this cooperative binding, also estimating important chemical parameters such as the apparent binding constant and the degree of cooperativity. The analysis can be performed as follows.

The effective persistence length A_{eff} of a DNA–ligand complex in chemical equilibrium with a certain amount of ligand (at a concentration C_T) can be calculated by knowing the persistence lengths of a bare DNA molecule (A_0) and of a saturated DNA–ligand complex (A_1) with the relation^{23,24}

$$\frac{1}{A_{\text{eff}}} = \frac{1-r}{A_0} + \frac{r}{A_1}, \quad (6)$$

where $r = C_b/C_{\text{bp}}$ is the ratio between the bound ligand concentration C_b and the DNA base-pair concentration C_{bp} .

The values of A_0 and A_1 can be estimated numerically from our experimental data, since these are the asymptotical values of A_{eff} as $C_T \rightarrow 0$ and $C_T \rightarrow \infty$, respectively. Therefore, using the data of Fig. 5, we find $A_0 = 50.5 \pm 3$ nm and $A_1 = 16.8 \pm 11$ nm. The result obtained for A_0 with this analysis is the value of the persistence length of a bare DNA molecule, as expected. On the other hand the result obtained for A_1 is in good agreement with the value reported by Hou *et al.* for DNA–cisplatin saturated complexes (14.9 nm).⁵

Observe also that the bound ligand concentration C_b is related to the total ligand concentration C_T (which is the quantity of the ligand added to the sample) by

$$C_T = C_b + C_f, \quad (7)$$

where C_f is the free (not bound to DNA) ligand concentration.

By using eqn (6) and (7), we can deduce the behavior of r as a function of C_f . Firstly, r is found for each value of C_T directly from eqn (6), since we know A_{eff} for each value of C_T from the data of Fig. 5. In addition, by using eqn (7) with $C_b = rC_{\text{bp}}$, we can also determine C_f for each value of C_T . Finally, the behavior of r as a function of C_f is plotted in Fig. 6 (circles).

To continue the analysis any further, we assume a Hill mechanism for the interaction.¹⁸ The Hill equation, which takes cooperativity into account, relates the bound ligand fraction r with the free ligand concentration C_f in solution,¹⁸

$$r = \frac{r_{\text{max}}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}, \quad (8)$$

where r_{max} is the maximum value of r , corresponding to a saturated complex, K_i is the intrinsic association binding constant and n is the Hill coefficient, a parameter usually used to measure the degree of cooperativity in chemical reactions. If $n > 1$, the interaction is positively cooperative, *i.e.*, a bound ligand molecule increases the affinity of DNA for subsequent ligand binding. If $n < 1$, otherwise, the interaction is negatively cooperative and a bound ligand molecule decreases the affinity of DNA for subsequent ligand binding. If $n = 1$, the interaction is non-cooperative and the affinity is independent of the number of bound ligand molecules.

The Hill equation can be used to fit the data of Fig. 6. As a first-order approximation, one can consider the ligand molecules small enough such that $r_{\text{max}} \approx 1$, *i.e.*, each ligand molecule occupies one DNA base-pair. This approach, albeit less realistic, has the advantage of reducing the number of adjustable parameters

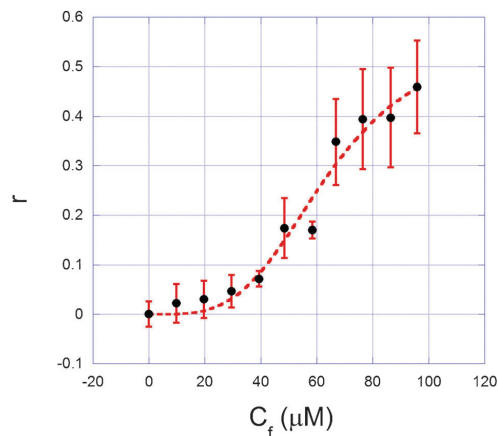


Fig. 6 Fraction of bound cisplatin ($r = C_b/C_{\text{bp}}$) as a function of the free drug concentration in solution (C_f), determined experimentally. Dashed line: a fitting to the proposed model, which combines eqn (6), (7) and (8). From this fitting, we found the adjustable parameters $K_i = (1.5 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n = 3.6 \pm 1.0$ and $r_{\text{max}} = 0.56 \pm 0.12$.

to only two: K_i and n . Nevertheless, the fit shown in Fig. 6 (dashed line) was performed with eqn (8) considering r_{max} as an adjustable parameter, motivated by the fact that approximately 90% of the bound cisplatin molecules occupy two base pairs.^{25,26} Observe that the proposed model fits well to the experimental data. The results obtained in this case are $K_i = (1.5 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $n = 3.6 \pm 1.0$ and $r_{\text{max}} = 0.56 \pm 0.12$.

We have not found in the literature a measurement or calculation of the parameter n to compare with our result. Nevertheless, the fact that we have obtained $n > 1$ from the fitting process indicates that cisplatin binds to the DNA with positive cooperativity, corroborating with the previous discussion that the crosslinks and loops introduced in the DNA molecule by the action of cisplatin increase the probability to form even more of these structures, resulting in DNA compaction. In addition, the result found for r_{max} (0.56) confirms the structural data of Takahara *et al.*²⁶ which show that about 90% of the bound cisplatin molecules occupy two base pairs.

4 Conclusion

We have studied the changes in the mechanical properties of DNA–cisplatin complexes as a function of some parameters of interest such as the drug diffusion time and concentration in the sample by performing single molecule stretching experiments. We have shown that the binding data of DNA–cisplatin complexes can be extracted from pure mechanical measurements. In addition, a positively cooperative binding was found, which is probably related to the formation of structures such as crosslinks and loops on the complexes. The ideas presented in this work can give insights into how to analyze the binding data of DNA with other kinds of ligands. The only pre-requisite is that the particular ligand to be studied should modify at least one mechanical property of DNA when binding, thus allowing one to investigate the binding data by monitoring the changes in one or more of these properties.

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), Fundação Arthur Bernardes—Universidade Federal de Viçosa (FUNARBE-UFV) and Núcleo de Excelência em Física Biológica—Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (PRONEX-FACEPE). We also thank Prof. O. N. Mesquita, who have loaned us the infrared laser used in this work.

References

- 1 A. Bates and A. Maxwell, *DNA Topology*, Oxford University Press, Oxford, 2005.
- 2 S. G. Chaney, S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu and M. Faldut, Protein interactions with platinum–DNA adducts: from structure to function, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1551–1559.
- 3 A. L. Pinto and S. J. Lippard, Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **780**, 167–180.
- 4 K. Stehlikova and H. Kostrhunova, DNA bending and unwinding due to the major 1,2-GG intrastrand cross-link formed by antitumor cis-diamminedichloroplatinum(II) are flanking-base independent, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 2894–2898.
- 5 X.-M. Hou, X.-H. Zhang, K.-J. Wei, C. Ji, S.-X. Dou, W.-C. Wang, M. Li and P.-Y. Wang, Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules, *Nucleic Acids Res.*, 2009, **37**, 1400–1410.
- 6 N.-K. Lee, J.-S. Park, A. Johner, S. Obukhov, J.-Y. Hyon, K. J. Lee and S.-C. Hong, Elasticity of cisplatin-bound DNA reveals the degree of cisplatin binding, *Phys. Rev. Lett.*, 2008, **101**, 248101.
- 7 G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky and A. Libchaber, RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: the role of ATP hydrolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 7916–7921.
- 8 H. Faxen, The resistance against the movement of a rigid sphere in viscous fluids, which is embedded between two parallel layered barriers, *Ann. Phys. (Leipzig)*, 1922, **68**, 89.
- 9 N. B. Viana, R. T. S. Freire and O. N. Mesquita, Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere, *Phys. Rev. E: Stat. Phys., Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, 2002, **65**(4), 041921.
- 10 J. F. Marko and E. D. Siggia, Stretching DNA, *Macromolecules*, 1995, **28**, 8759.
- 11 M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles and S. M. Block, Stretching DNA with optical tweezers, *Biophys. J.*, 1997, **72**(3), 1335–1346.
- 12 T. Strick, J. F. Allemand, V. Croquette and D. Bensimon, Twisting and stretching single DNA molecules, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2000, **74**, 115–140.
- 13 R. Krautbauer, H. C. Schaumann and H. E. Gaub, Cisplatin changes the mechanics of single DNA molecules, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 3912–3915.
- 14 I. D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nunez, I. Rouzina and M. C. Williams, Quantifying force-dependent and zero-force DNA intercalation by single-molecule stretching, *Nat. Methods*, 2007, **4**, 517–522.
- 15 R. Blossey and H. Schiessel, The dynamics of the nucleosome: thermal effects, external forces and ATP, *FEBS J.*, 2011, **28**, 3619–3632.
- 16 Y. Katsuda, Y. Yoshikawa, T. Sato, Y. Saito, M. Chikuma, M. Suzuki and K. Yoshikawa, Cisplatin and its analogues induce a significant change in the high-order structure of long duplex DNA, *Chem. Phys. Lett.*, 2009, **473**, 155–159.
- 17 M. S. Rocha, A. D. Lúcio, S. S. Alexandre, R. W. Nunes and O. N. Mesquita, DNA-psoralen: Single-molecule experiments and first principles calculations, *Appl. Phys. Lett.*, 2009, **95**, 253703.
- 18 M. Daune, *Molecular Biophysics*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
- 19 Y. Qu, N. J. Scarsdale, M.-C. Tran and N. P. Farrell, Cooperative effects in long-range 1,4 DNA–DNA interstrand cross-links formed by polynuclear platinum complexes: an unexpected syn orientation of adenine bases outside the binding sites, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2003, **8**, 19–28.
- 20 M. Trieb, C. Rauch, F. R. Wibowo, B. Wellenzohn and K. R. Liedl, Cooperative effects on the formation of intercalation sites, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 4696–4703.
- 21 J. Rudnick and R. Bruinsma, DNA–protein cooperative binding through variable-range elastic coupling, *Biophys. J.*, 1999, **76**, 1725–1733.
- 22 R. T. Dame, M. C. Noom and G. J. L. Wuite, Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation, *Nature*, 2006, **444**, 387–390.
- 23 M. S. Rocha, Modeling the entropic structural transition of DNA complexes formed with intercalating drugs, *Phys. Biol.*, 2009, **6**, 036013.
- 24 I. Rouzina and V. A. Bloomfield, DNA bending by small, mobile multivalent cations, *Biophys. J.*, 1998, **74**, 3152–3164.
- 25 D. B. Zamble and S. J. Lippard, Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy, *Trends Biochem. Sci.*, 1995, **20**(10), 435–439.
- 26 P. M. Takahara, C. A. Frederick and S. J. Lippard, Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12309–12321.

Referências Bibliográficas

- [1] A. Ashkin, “*Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*”, Phys. Rev. Lett. **24** (4), 156 (1970).
- [2] A. Ashkin and J. M. Dziedzic, “*Optical trapping and manipulation of viruses and bacterias*”, Science **235** (4795), 1517-1520 (1987).
- [3] A. Ashkin, “*Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*”, Biophys. J. **61** (2), 569-582 (1992).
- [4] A. Ashkin, “*Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 4853-4860 (1997).
- [5] D. G. Grier, “*A revolution in optical manipulation*”, Nature **424** (6950), 810-816 (2003).
- [6] F. Ritort, “*Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications*”, J. Phys.-Condens. Matter **18**, R531-R583 (2006).
- [7] S. G. Chaney, S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu and M. Faldu “*Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function*”, J. Inorg. Biochem. **98**, 1551-1559 (2004).
- [8] G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky and A. Libchaber, “*RecA polymerization on double-stranded DNA by using single - molecule manipulation: the role of ATP hydrolysis*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 7916-7921 (1999).
- [9] J. F. Marko and E. D. Siggia, “*Stretching DNA*”, Macromolecules **28** (26), 8759-8770 (1995).

Referências Bibliográficas

- [10] M. S. Rocha, “*Pinças ópticas: experimento e teoria*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2004).
- [11] M. S. Rocha, “*Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicações no estudo das interações DNA-fármacos*”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2008).
- [12] A. Mazolli, P. A. M. Neto and H. M. Nussenzveig, “*Theory of trapping forces in optical tweezers*”, Proc. R. Soc. Lon. A **459** (2040), 3021-3041 (2003).
- [13] P. A. M. Neto and H. M. Nussenzveig, “*Theory of optical tweezers*”, Europhys. Lett. **50** (5), 702-708 (2000).
- [14] H. Faxen, “*The resistance against the movement of a rigour sphere in viscous fluids, which is embedded between two parallel layered barries*”, Ann. Phys. **68** (10), 89-119 (1922).
- [15] N. B. Vianna, “*Pinças ópticas e aplicações*”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (2002).
- [16] R. Krautbauer, H. C.-Schaumann, and H. E. Gaub, “*Cisplatin changes the mechanics of single DNA molecules*” Angew. Chem. Int. Ed. **39** (21), 3912-3915 (2000).
- [17] I. D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nuñez, I. Rouzina and M. C. Williams “*Quantifying force-dependent and zero force DNA intercalation by single - molecule stretching*” Nat. Methods **4**, 517-522 (2007).
- [18] R. Dahm, “*Friedrich Miescher and the discovery of DNA*”, Developmental Biology **278**, 274-288 (2005).
- [19] J. D. Watson and F. H. C. Crick, “*Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleid acid*”, Nature **171** (4356), 737-738 (1953).
- [20] J. D. Watson and F. H. C. Crick, “*Genetical implication of the structure of deoxyribonucleic acid*”, Nature **171** (4361), 964-967 (1953).

Referências Bibliográficas

- [21] D. L. Nelson and M. M. Cox, “*Lehninger Principles of Biochemistry*”, 3^a Ed., W. H. Freeman & Company, (2000).
- [22] A. J. F. Griffiths, S. R. Wessler, R. C. Lewontin and S. B. Carroll, “*Introdução à Genética*”, 9^a Ed., Guanabara Koogan, (2009).
- [23] J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine and R. Losick , “*Molecular Biology of the Gene*”, 5^a Ed., Person Education, (2004).
- [24] D. H. Boal, “*Mechanics of the Cell*”, Cambrigde University Press, (2002).
- [25] L. D. Landau and E. M. Lifshitz, “*Theory of elasticity*”, 2^a Ed., Pergamon Press, (1970).
- [26] A. V. Hill, “*The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves*”, J. Physiol. **40**, 4-7 (1910).
- [27] M. Daune, “*Molecular Biophysics: Structures in motion*”, Ed., Oxford University Press, (1999).
- [28] S. J. Lippard “*New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]*”, Science **218** (4577), 1075-1082 (1982).
- [29] B. Rosenberg, L. Van Camp and T. Krigas “*Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from platinum electrode*”, Nature **205** (4972), 698-699 (1965).
- [30] B. Rosenberg, L. Van Camp, E. B. Grimley, and A. J. Thomson “*The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum (IV) complexes*”, J. Biol. Chem. **242** (6), 1347-1352 (1967).
- [31] B. Rosenberg and L. Van Camp “*The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds*”, Cancer Res. **30**, 1799-1802 (1970).
- [32] B. Desoize and C. Madoulet “*Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment*”, Crit. Rev. in Oncol./Hemat. **42**, 317-325 (2002).

Referências Bibliográficas

- [33] S. M. Cohen and S. J. Lippard “*Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy*”, Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. **67**, 93-130 (2001).
- [34] B. Rosenberg “*Fundamental studies with cisplatin*”, Cancer **55**, 2303-2316 (1985).
- [35] A. L. Pinto and S. J. Lippard “*Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA*”, Bioschim. Biophys. Acta. **780**, 167-180 (1985).
- [36] S. L. Bruhn, J. H. Toney and S. J. Lippard “*Biological processing of DNA modified by platinum compounds*”, Prog. Inorg. Chem. **38**, 477-516 (1990).
- [37] D. B. Zamble and S. J. Lippard “*Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy*”, Tren. in Biochem. Sci. **20** (10), 435-439 (1995).
- [38] A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. J. den Hartog, P. H. M. Lohman and J. Reedijk “*Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation*”, Biochemistry **24**, 707-713 (1985).
- [39] A. M. J. Fichtinger-Schepman, A. T. van Oosterom, P. H. M. Lohman and F. Berends “*Cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-diamminedichloroplatinum(II)*”, Cancer Res. **47**, 3000-3004 (1987).
- [40] M. Kartalou and J. M. Essigmann “*Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins*”, Mutat. Res. **478**, 1-21 (2001).
- [41] K. Stehlikova, H. Kostrhunova, J. Kasparkova and V. Brabec “*DNA bending and unwinding due to the major 1,2 - GG intrastrand cross-link formed by antitumor cis-diamminedichloroplatinum (II) are flanking-base independent*”, Nucl. Acids Res. **30** (13), 2894-2898 (2002).

Referências Bibliográficas

- [42] Z. Suo, S. J. Lippard and K. A. Johnson “*Single d(GpG)/cis-diammineplatinum(II) adduct-induced inhibition of DNA polymerization*”, Biochemistry **38**, 715-726 (1999).
- [43] P. M. Takahara, C. A. Frederick and S. J. Lippard “*Crystal structure of the anti-cancer drug cisplatin bound to duplex DNA*”, J. Am. Chem. Soc. **118**, 12309-12321 (1996).
- [44] J. A. Rice, D. M. Crothers, A. L. Pinto and S. J. Lippard “*The major adduct of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA bends the duplex by $\approx 40^\circ$ toward the major groove*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 4158-4161 (1988).
- [45] N.-K. Lee, J.-S. Park, A. Johner, S. Obukhov, J.-Y. Hyon, K. J. Lee and S.-C. Hong “*Elasticity of cisplatin-bound DNA reveals the degree of cisplatin binding*”, Phys. Rev. Lett. **101**, 248101 (2008).
- [46] X.-M. Hou, X.-H. Zhang, K.-J. Wei, C. Ji, S.-X. Dou, W.-C. Wang, M. Li and P.-Y. Wang “*Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules*”, Nucleic Acids Res. **37** (5), 1400-1410 (2009).
- [47] K. M. Comess, J. N. Burstyn, J. M. Essigmann and S. J. Lippard “*Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts*”, Biochemistry **31**, 3975-3990 (1992).
- [48] Y. Corda, C. Job, M.-F. Anin, M. Leng and D. Job “*Transcription by eucaryotic and procaryotic RNA polymerases of DNA modified at a d(GG) or a d(AG) site by the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II)*”, Biochemistry **30**, 222-230 (1991).
- [49] J. D. Page, I. Husain, A. Sancar and S. G. Chaney “*Effect of the diamminocyclohexane carrier ligand on platinum adduct formation, repair, and lethality*”, Biochemistry **29**, 1016-1024 (1990).

Referências Bibliográficas

- [50] N. E. Madias and J. T. Harrington “*Platinum Nephrotoxicity*”, Amer. J. Med. **65**, 307-314 (1978).
- [51] J. Lokich and N. Anderson “*Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature*”, Ann. Oncol. **9** (1), 13-21 (1998).
- [52] J. Gopabandhu, V. Ajit, T. D. Nand and R. Poduri “*Use of chemoprotectants in chemotherapy and radiation therapy: the challenges of selecting an appropriate agent*”, Integr. Cancer Ther. **9** (3), 253-258 (2010).
- [53] D. R. Gandara, M. W. DeGregorio, H. Wold, B. J. Wilbur, M. Kohler, H. J. Lawrence, A. B. Deisseroth and C. B. George “*High - dose cisplatin in hypertonic saline: reduced toxicity of a modified dose schedule and correlation with plasma pharmacokinetics. A northern california oncology group pilot study in non - small - cell lung cancer* ”, J. Clin. Oncol. **4** (12), 1787-1793 (1986).
- [54] A. I. Matesanz, J. M. Pérez, P. Navarro, J. M. Moreno, E. Colacio and P. Souza “*Synthesis and characterization of novel palladium(II) complexes of bis(thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II) - benzyl bis(thiosemicarbazone)*”, J. Inorg. Biochem. **76**, 29-37 (1999).
- [55] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles and S. M. Block “*Stretching DNA with optical tweezers*”, Biophys. J. **72** (3), 1335-1346 (1997).
- [56] T. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette and D. Bensimon “*Twisting and stretching single DNA molecules*”, Prog. in Biophys. and Mol. Biol. **74**, 115-140 (2000).
- [57] Y. Katsuda, Y. Yoshikawa, T. Sato, Y. Saito, M. Chikuma, M. Suzuki and K. Yoshikawa “*Cisplatin and its analogues induce a significant change in the higher-order structure of long duplex DNA*”, Chem. Phys. Lett. **473**, 155-159 (2009).
- [58] Y. Qu, N. J. Scarsdale, M.-C. Tran and N. P. Farrell “*Cooperative effects in long-range 1,4 DNA-DNA interstrand cross-links formed by polynuclear platinum complexes: an unexpected syn orientation of adenine bases outside the binding sites*”, J. Biol. Inorg. Chem. **8**, 19-28 (2003).

Referências Bibliográficas

- [59] M. Trieb, C. Rauch, F. R. Wibowo, B. Wellenzohn and K. R. Liedl “*Cooperative effects on the formation of intercalation sites*”, Nucleic Acids Res. **32** (15), 4696-4703 (2004).
- [60] J. Rudnick and R. Bruinsma “*DNA - protein cooperative binding through variable - range elastic coupling*”, Biophys. J. **76**, 1725-1733 (1999).
- [61] M. S. Rocha “*Modeling the entropic structural transition of DNA complexes formed with intercalating drugs*”, Phys. Biol. **6**, 036013 (2009).
- [62] I. Rouzina and V. A. Bloomfield “*DNA bending by small, mobile multivalent cations*”, Biophys. J. **74**, 3152-3164 (1998).
- [63] Y. Z. Chen, Y.-L Zhang and E. W. Prohofsky “*Binding stability of a cross-linked drug: calculation of an anticancer drug cisplatin-DNA complex*”, Phys. Rev. E **55** (5), 5843-5848 (1997).