

RAYANE MARIA DE OLIVEIRA

A CAFEÍNA COMO CATALISADOR DE FÁRMACOS À BASE DE
PLATINA: UM ESTUDO DE ESPECTROSCOPIA DE FORÇA DE
MOLÉCULA ÚNICA

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

Orientador: Márcio Santos Rocha

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2022

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

T

O48c
2022
Oliveira, Rayane Maria de, 1995-
A cafeína como catalisador de fármacos à base de platina:
um estudo de espectroscopia de força de molécula única /
Rayane Maria de Oliveira. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (69 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Física, 2022.

Referências bibliográficas: f. 63-69.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.703>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Pinças óptica. 2. DNA. 3. Catalisadores do grupo da
platina. 4. Espectroscopia de força dinâmica. I. Rocha, Márcio
Santos, 1978-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 22. ed. 535.2

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

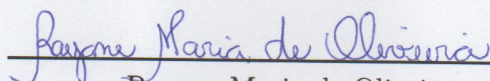
RAYANE MARIA DE OLIVEIRA

A CAFEÍNA COMO CATALISADOR DE FÁRMACOS À BASE DE
PLATINA: UM ESTUDO DE ESPECTROSCOPIA DE FORÇA DE
MOLECULA ÚNICA

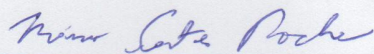
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de agosto de 2022.

Assentimento:



Rayane Maria de Oliveira
Autora



Márcio Santos Rocha
Orientador

Dedico à minha família, com todo amor e gratidão.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, em primeiro lugar pela força e pela coragem que cada dia me proporcionou e por estar sempre presente em minha vida.

Aos meus preciosos pais, que acompanharam cada dia dessa trajetória, o incentivo constante do meu pai Jânio e a dedicação incondicional da minha mãe Tânia.

À minha amada família, meus irmãos: Leandro, Evandro, Nunes, Douglas, Raquel e Kellys; sobrinhos: Antony, Benício e o bebê; cunhadas e cunhado. Vocês sempre me incentivaram a não desistir, meu muito obrigada.

Aos meus amigos (as) que me acompanharam nessa jornada com momentos inesquecíveis, em especial a Esther, Isabela, Bia, Kelly, Karol, Lâna e Iago que estavam de perto nesta etapa.

Além do Tiago, Ulisses e Juliano, a colaboração de vocês foi fundamental para a concretização deste sonho.

Ao amigos do DPF, das corridas, da graduação, e da vida, vocês sempre serão lembrados.

Ao meu orientado Márcio Santos Rocha, que dedicou muito do seu tempo me orientando. Obrigada pelos ensinamentos, atenção, e dedicação ao longo da realização desta dissertação.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"Somos quem podemos ser
Sonhos que podemos ter (E teremos!)"
(Engenheiros do Hawaii)

Resumo

OLIVEIRA, Rayane Maria de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **A cafeína como catalisador de fármacos à base de platina: um estudo de espectroscopia de força de molécula única.** Orientador: Márcio Santos Rocha.

Embora muitos avanços tenham ocorrido ao longo dos anos nas quimioterapias, os efeitos colaterais, muitas vezes relacionados à falta de seletividade dos fármacos, continuam sendo um grande problema clínico. Assim, uma compreensão da interação dos medicamentos com a molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) pode ajudar a modular a resposta a tratamento de tumores. É bem relatado na literatura que a cafeína, o alcaloide mais consumido em todo o mundo, potencializa os efeitos anticancerígenos do fármaco cisplatina ao inibir o reparo do DNA pela maquinaria celular. Aqui, realizamos ensaios de espectroscopia de força em molécula única, com pinças ópticas, para mostrar que a cafeína aumenta a toxicidade não apenas da cisplatina, mas também de vários fármacos à base de platina (transplatina, carboplatina e oxaliplatina) já em nível molecular, usando amostras contendo apenas DNA de fita dupla, fármacos de platina e o alcaloide em um tampão fosfato simples, ou seja, completamente fora do ambiente complexo encontrado dentro das células vivas reais. De fato, ao extrair parâmetros mecânicos, como comprimento de contorno e persistência desses complexos, nossos resultados mostram que a cafeína atua como um catalisador alostérico que aumenta a constante de associação efetiva entre a molécula de DNA e os fármacos de platina em torno de $\sim 7,5\times$ (para carboplatina) até $\sim 24-29\times$ (para os outros três fármacos). Além disto, a presença de cafeína suprimiu qualquer cooperatividade que ocorre nas reações de ligação de alguns dos fármacos de platina (cisplatina e carboplatina) com a molécula de DNA quando o alcaloide está ausente. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que tal propriedade da cafeína foi demonstrada em nível molecular fora do ambiente celular. Além disso, também mostramos que tal propriedade parece ser geral para fármacos à base de platina porque as mesmas conclusões foram alcançadas para quatro exemplos clássicos desses compostos: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e transplatina. Portanto, o presente trabalho fornece novas informações sobre o mecanismo de ação envolvendo a combinação de compostos para aplicações quimioterápicas.

Palavras-chave: DNA. Pinça óptica. Fármacos de platina. Espectroscopia de força.

Abstract

OLIVEIRA, Rayane Maria de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Caffeine as a catalyst for platinum-based drugs: a single-molecule force spectroscopy study.** Adviser: Márcio Santos Rocha.

Although many advances have occurred over the years in chemotherapies, side effects often related to the lack of selectivity of drugs remain a major clinical problem. Thus, an understanding of the drugs interaction with the DNA molecule (deoxyribonucleic acid) can help modulate the tumor response. It is well reported in the literature that caffeine, the most consumed alkaloid worldwide, potentiates the anticancer effects of the drug cisplatin by inhibiting DNA repair by the cellular machinery. Single-molecule force spectroscopy assays were performed with optical tweezers to show that caffeine increases the toxicity not only of cisplatin but also of several platinum-based drugs (transplatin, carboplatin and oxaliplatin), at the molecular level, using samples containing only double-stranded DNA, platinum drugs and the alkaloid in a single phosphate buffer, in the other words, completely outside the complex environment found inside real living cells. Indeed, by extracting mechanical parameters such as persistence and contour lengths of these complexes, our results show that caffeine acts as an allosteric catalyst that increases the effective association constant between the DNA molecule and the platinum drugs around $\sim 7,5\times$ (for carboplatin) to $\sim 24-29\times$ (for the other three drugs). Furthermore, the presence of caffeine suppressed any cooperativity that occurs in the binding reactions of some of the platinum drugs (cisplatin and carboplatin) with the DNA molecule when the alkaloid is absent. This is the first time such a property of caffeine has been demonstrated at a molecular level outside the cellular environment. In addition, we also show that this property appears to be general for platinum-based drugs because the same conclusions were reached for four classic examples of these compounds: cisplatin, carboplatin, oxaliplatin and transplatin. Therefore, the present work provides new information on the mechanism of action involving the combination of compounds for chemotherapy applications.

Keywords: DNA. Optical Tweezers. Platinum drugs. Force spectroscopy.

Lista de figuras

Figura 2.1 – Imagem a esquerda ilustra a bactéria <i>E. coli</i> normal e da direita quando ocorre o processo de filamentação [1].	16
Figura 2.2 – Estrutura química planar da cisplatina inerte sofrendo o processo de hidrolisação para sua forma ativa em meio aquoso.	17
Figura 2.3 – Uma das possíveis ligações da platina com a molécula de DNA.	17
Figura 2.4 – Estrutura química planar da carboplatina inerte sofrendo hidrolisação para sua forma ativa em meio aquoso.	18
Figura 2.5 – Estrutura química planar da oxaliplatina inerte sofrendo hidrolisação para sua forma ativa em meio aquoso.	19
Figura 2.6 – Estrutura química planar da transplatina inerte sofrendo hidrolisação para sua forma ativa em meio aquoso.	19
Figura 3.1 – Estrutura química da molécula de cafeína.	20
Figura 4.1 – Representação dos regimes da pinça óptica.	23
Figura 4.2 – Ilustração da pressão de radiação. O raio (1) aplica uma força $\vec{F}_{(1)}$ sobre a microesfera, enquanto o raio (2) aplica uma força $\vec{F}_{(2)}$. A força resultante gerada pela soma do feixe total age empurrando a microesfera no sentido de incidência do feixe.	24
Figura 4.3 – Ilustração da ação da força de gradiente sobre uma microesfera. Na figura do lado esquerdo, a microesfera está abaixo da região focal do laser. A seta preta é a força resultante que empurra a microesfera para cima e para esquerda para alcançar o foco do laser. Na figura do lado direito, a microesfera está acima da região focal e a força resultante aponta para baixo, levando a microesfera para a região focal do laser gaussiano.	25
Figura 4.4 – Aprisionamento da microesfera na região focal do laser gaussiano, devido ao equilíbrio entre as forças que surgem dos raios refletidos e refratados sobre a microesfera.	26
Figura 4.5 – A radiação incidente passa pela amostra que absorve em determinados comprimentos de onda, elevando seus elétrons de um nível de energia menor para o maior. O gráfico de absorbância em função do comprimento de onda apresenta um pico característico para cada amostra que absorve em determinado comprimento de onda.	27
Figura 5.1 – (a) e (b): Ligação de hidrogênio entre as bases das duas fitas gerando a estrutura da dupla hélice do DNA (c) [2].	29

Figura 5.2 – Sentido para a formação complementar das duas fitas do DNA, em que um grupo de fosfato conecta o carbono 3' de um açúcar ao carbono 5' do próximo açúcar [3].	30
Figura 5.3 – Comparação entre diferentes formas do DNA. A-DNA(rosa), B-DNA (lilás) e Z-DNA (azul) [4].	31
Figura 5.4 – Curva arbitrária em laranja.	33
Figura 6.1 – Principais tipos de interações possíveis entre pequenos ligantes e a molécula de DNA.	35
Figura 7.1 – Moléculas de oxigênio (círculo vermelho) interagindo com a hemoglobina. Lado esquerdo ilustra o estado $r = 0$ e o lado direito o estado de saturação $r = r_{max}$ [5].	39
Figura 8.1 – Esquema do aparato experimental utilizado nas medidas [6].	43
Figura 8.2 – Ilustração do porta-amostra utilizado nos experimentos, onde as duas pontas do λ -DNA estão presas, uma na lamínula previamente tratada e a outra na microesfera recoberta por estreptavidina [6].	44
Figura 8.3 – Estiramento da molécula de DNA num regime quase-estático [6].	45
Figura 10.1–Curvas de força-extensão representativas para um determinado complexo de DNA formado com (a) cisplatina, (b) carboplatina, (c) oxaliplatina e (d) transplatina, obtidas para as concentrações de cafeína e os compostos de platina indicadas nas legendas. As linhas contínuas são ajustes à equação de Marko-Siggia, de onde os parâmetros mecânicos (persistência e comprimentos de contorno) foram determinados.	49
Figura 10.2–Dados de comprimento de persistência obtidos para complexos de DNA cisplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), sendo o DNA previamente tratado com cafeína a 2 mM. O inset mostra uma comparação desses dados com os equivalentes obtidos sem o uso de cafeína na amostra (quadrados abertos), originalmente obtidos na referência [7]. As linhas sólidas são ajustes ao modelo <i>quenched-disorder</i> para o comprimento de persistência, a partir do qual se pode obter o parâmetros de ligação da interação em cada situação.	50
Figura 10.3–Gráfico dos dados de comprimento de persistência (A) obtidos para complexos DNA-carboplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), tendo o DNA sido previamente tratado com cafeína a 2mM. O inset mostra uma comparação de tais dados com o equivalente obtido sem o uso de cafeína na amostra (quadrados abertos), originalmente obtido na referência [8]. As linhas sólidas são ajustes ao modelo <i>quenched-disorder</i> para o comprimento de persistência, de onde se pode obter os parâmetros de ligação da interação em cada situação.	52

- Figura 10.4—Gráfico dos dados de comprimento de persistência (A) obtidos para complexos DNA-oxaliplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), tendo o DNA sido previamente tratado com cafeína a 2 mM. O inset mostra uma comparação de tais dados com o equivalente obtido sem o uso de cafeína na amostra (quadrados abertos), originalmente obtido na referência [9]. As linhas sólidas são ajustes ao modelo quenched-disorder para o comprimento de persistência, de onde se pode obter os parâmetros de ligação da interação em cada situação. 53
- Figura 10.5—Gráfico dos dados de comprimento de persistência obtidos para complexos DNA-transplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), tendo o DNA sido previamente tratado com cafeína a 2 mM. O inset mostra uma comparação de tais dados com o equivalente obtido sem o uso de cafeína na amostra (quadrados abertos), originalmente obtido na referência [10]. As linhas sólidas são ajustes ao modelo *quenched-disorder* para o comprimento de persistência, de onde se pode obter os parâmetros de ligação da interação em cada situação. 54
- Figura 10.6—Gráfico dos dados de comprimento do contorno (normalizado pelo comprimento médio do contorno dos complexos DNA-cafeína obtidos sem qualquer droga de platina na amostra) dos mesmos complexos de DNA formados com os quatro fármacos à base de platina estudados aqui, com cafeína fixada em 2 mM na amostra. Observe que tal parâmetro mecânico permanece constante à medida que os fármacos se ligam à dupla hélice do DNA para cisplatina, carboplatina e oxaliplatina e apresenta uma ligeira diminuição seguida de um aumento subsequente para a transplatina. 54
- Figura 10.7—(a) Comprimento de contorno em função das concentrações da oxaliplatina (losango azul), carboplatina (círculo preto), cisplatina (quadrado vermelho), em PBS= 150 mM, dados obtidos originalmente das referências [7–9] . (b) Comprimento de contorno em função das concentrações de transplatina em em PBS= 150 mM, dados obtidos originalmente da referência [10]. 55
- Figura 10.8—(a) Absorbância para várias concentrações diferentes de cafeína em função do comprimento de onda de absorção, mantendo a concentração de cisplatina fixada em 500 μ M. (b) valores de absorbância em 297 nm para várias concentrações diferentes de cafeína, obtidos a partir dos dados do painel 10.8a. A linha sólida vermelha é um ajuste ao modelo proposto, que permite estimar a constante de ligação de equilíbrio entre os dois compostos. 56

Figura 10.9—(a) Absorbância para várias concentrações diferentes de cisplatina em função do comprimento de onda de excitação, mantendo a concentração de cafeína fixada em 2 mM. (b) valores de absorbância a 290 nm para várias concentrações diferentes de cisplatina, obtidos a partir dos dados 10.9a. A linha vermelha é um ajuste ao modelo proposto, que permite estimar a constante de ligação de equilíbrio entre os dois compostos. 58

Lista de tabelas

Tabela 5.1 – Principais diferenças entre os três tipos de DNA (A, B e Z) que podem ser encontrados em sistemas biológicos [4, 11, 12].	31
Tabela 10.1–Parâmetros de ligação obtidos dos ajustes do modelo para os quatro fármacos de platina testados que interagem com DNA sob 2 mM de cafeína. Os resultados equivalentes para a situação sem cafeína, obtidos em trabalhos anteriores [7–10], também são mostrados para fins de comparação. K é a constante de ligação da associação de equilíbrio e n é o expoente de Hill, que mede a cooperatividade das reações de ligação.	51

Sumário

I	Introdução	14
II	Compostos de platinas	16
III	A molécula de cafeína	20
IV	Técnicas experimentais	21
4.1	Pinça Óptica	21
4.1.1	Teoria da pinça óptica	21
4.1.1.1	Regimes da pinça óptica	22
4.1.1.2	Regime da óptica geométrica	24
4.1.1.3	Modelo do dipolo elétrico	26
4.2	Espectrofotômetro UV-VIS	27
V	Ácido desoxirribonucleico (DNA)	29
5.1	Estrutura do DNA	29
5.2	Propriedades mecânicas dos polímeros	31
5.2.1	Modelo de Kratky-Porod	33
5.2.2	Modelo Worm Like-Chain (WLC)	34
VI	Interações DNA-ligantes	35
6.1	Equilíbrio químico nas interações DNA-ligantes	36
VII	Modelo de Hill e cooperatividade	39
VIII	Rotina experimental	43
8.1	Montagem experimental	43
8.2	Preparação da amostra	44
8.3	Procedimento experimental	45
IX	Modelo <i>quenched-disorder</i>	47
X	Resultados	49
10.1	Resultados obtidos da pinça óptica	49
10.2	Resultados obtidos da espectroscopia UV-VIS	56
XI	Discussões	59
XII	Conclusões	61
XIII	Artigo publicado	62
	Referências	63

I Introdução

Depois do desenvolvimento da radiação eletromagnética monocromática, coerente, direcional e de alta intensidade conhecida como laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) em 1960, foi possível criar armadilhas para aprisionar partículas dielétricas em escala micrométrica. O aprisionamento foi desenvolvido pelo físico Arthur Ashkin, o qual foi laureado com o prêmio Nobel de Física em 2018, por sua invenção conhecida como pinça óptica [13].

Nos últimos anos, esta técnica vem sendo utilizada em várias áreas para compreender propriedades de materiais, além de sistemas biológicos. O uso desta ferramenta permite a compreensão de propriedades mecânicas da molécula de DNA, que é o polímero semi-flexível base para a nossa existência, ao avaliar a interação desta estrutura com diferentes tipos de compostos.

Estudos anteriores mostram como os fármacos de platinas interagem com a molécula de DNA, seu principal alvo no ambiente intracelular, formando micro-loops e cross-links quando dois sítios das platinas estão disponíveis para ligação. Nas referências [7–10], encontramos estudos para a interação de quatro compostos de platinas com o DNA, sendo eles a cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e transplatina, usando a técnica de pinça óptica para compreender sobre a físico-química das interações. Esses fármacos foram desenvolvidos para tratamento de vários tipos de cânceres, pois quando se ligam à molécula de DNA, impedem processos de replicação e de transcrição, bloqueando a sintetização de novas moléculas essenciais para a divisão celular. Porém, em alguns tratamentos cancerígenos, eles possuem efeitos colaterais associados ao seu uso, além de potencia para o desenvolvimento de resistência pelas células.

Uma forma de melhorar a eficiência destes medicamentos nas quimioterapias é utilizar uma segunda molécula para modular a atividade dos compostos. É relatado na literatura que o alcalóide mais consumido no mundo, a cafeína, possui a capacidade de aumentar a eficácia da cisplatina em nível celular [14, 15]. Neste trabalho, queremos compreender o real papel da maquinaria celular neste processo, estudando a interação diretamente das moléculas de platinas e cafeína com a molécula de DNA, compreendendo a físico-química da interação do complexo. Como comparação realizamos a análise para os quatro fármacos já estudados pela técnica de pinça óptica sem a cafeína.

Como resultado concluímos que o alcalóide pode promover o efeito de eficácia fora do ambiente complexo celular, pois este aumenta a constante de ligação de equilíbrio efetiva medida entre as interações do DNA com os quatro fármacos de platinas estudados; além de alterar o comportamento de cooperativo para a cisplatina e carboplatina. Em geral, concluímos que a cafeína é um alcalóide que age como um catalisador alostérico no sistema estudado. Mais estudos em nível microscópicos precisam ser realizados para

compreender melhor as ligações envolvidas, mas deixamos nossa contribuição em nível de moléculas únicas que fornece um grande salto para a compreensão de como um medicamento pode ser modulado para melhorar a eficiência em novos tratamentos envolvendo a quimioterapia.

Em resumo, nos capítulos 2 e 3, fazemos uma revisão das moléculas estudadas neste trabalho.

No capítulo 4, abordamos o princípio de funcionamento e uma breve abordagem da técnica de pinça óptica e UV-VIS.

Nos capítulos 5, 6 e 5, discutimos sobre a estrutura, modelos e interações do polímero essencial para nossa vida, DNA.

Nos capítulos 8 e 9 apresentamos a rotina experimental e o modelo para extrair informações dos dados obtidos.

E finalmente nos capítulos 10, 11 e 12 apresentamos os resultados e conclusões deste trabalho.

Por fim, no capítulo 13 mostramos o artigo publicado sobre os resultados aqui apresentados.

II Compostos de platinas

Nos últimos anos cada vez mais pesquisas estão sendo voltadas para a busca da cura do câncer, uma doença que é causada pela multiplicação descontrolada de células anormais. Uma área dessas pesquisas busca compreender como medicamentos utilizados em quimioterapia funcionam ao serem administrados durante os tratamentos, e quais são seus principais mecanismos de ação. De início utilizavam-se apenas compostos orgânicos para tratamentos, como o taxol e vimblastina [16, 17], mas nas últimas quatro ou cinco décadas, com a demonstração da atividade anticancerígena dos complexos contendo platina por Rosenberg e colaboradores, ampliou-se a possibilidade da cura de vários tipos de tumores com compostos inorgânicos.

O físico Barnet Rosenberg ao estudar os efeitos do campo elétrico em uma cultura de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) na Universidade do Estado de Michigan, nos Estados Unidos, observou que o processo de divisão celular era inibido quando o campo elétrico era aplicado sobre a cultura, e as células da *E. coli* cresciam formando filamentos alongados, como mostrado na Figura 2.1. Este fenômeno foi explicado pela dissociação da platina do eletrodo no meio de cultura que continha sais de amônio, formando um complexo de metal que ao ser exposto à luz causavam a filamentação das bactérias. Portanto, com a inibição da divisão celular, os complexos a base de platina começaram a ser desenvolvidos para parar a multiplicação descontrolada de células cancerígenas, sendo amplamente aplicados em vários tipos de tratamentos [1].

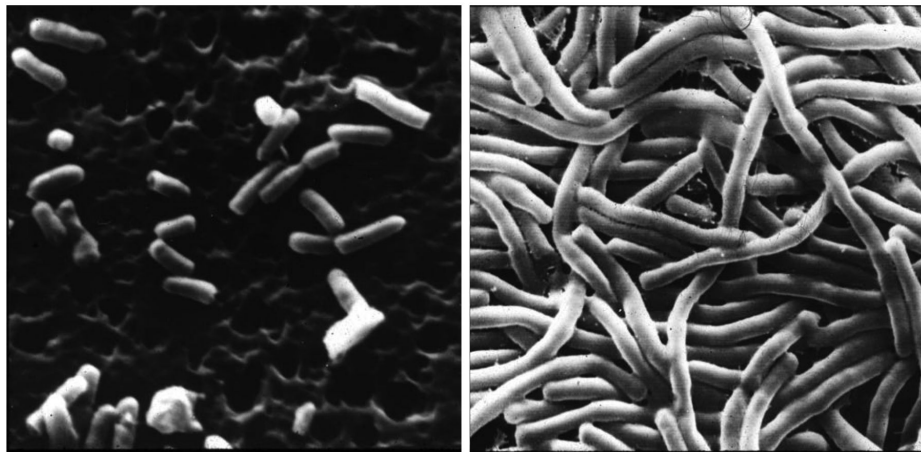


Figura 2.1 – Imagem a esquerda ilustra a bactéria *E. coli* normal e da direita quando ocorre o processo de filamentação [1].

Neste trabalho estudamos quatro compostos de platina: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e o isômero trans da cisplatina, a transplatina. O mais comumente utilizado em tratamentos clínicos é a cisplatina (cis-[diamindicloroplatina(II)], cis-[PtCl₂(NH₃)₂]),

que primeiramente foi testados em pacientes terminais e, posteriormente, em câncer como de pulmão, cabeça, esôfago, estômago, linfomas, melanoma, osteossarcoma, de mama e cérvix, sobretudo em associação com outros medicamentos, em vários esquemas terapêuticos. A Figura 2.2 representa a estrutura química planar da molécula de cisplatina, que sofre um processo de hidrolisação em meio aquoso. Neste processo, os dois íons de cloro (Cl) se dissociam, liberando dois sítios para a ligação com moléculas de água, chegando ao seu estado bivalente ativo (2+).

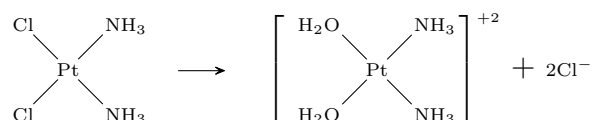


Figura 2.2 – Estrutura química planar da cisplatina inerte sofrendo o processo de hidrolisação para sua forma ativa em meio aquoso.

Ao sofrer a hidrolisação no meio intracelular, estudos mostram que o principal alvo da cisplatina é a molécula de DNA, que se liga preferencialmente através de um dos átomos de nitrogênio da guanina ou adenina. A ligação mais estável é com o nitrogênio da guanina, em razão da possibilidade de formação de ligação de hidrogênio do grupo NH_3 conforme a Figura 2.3.

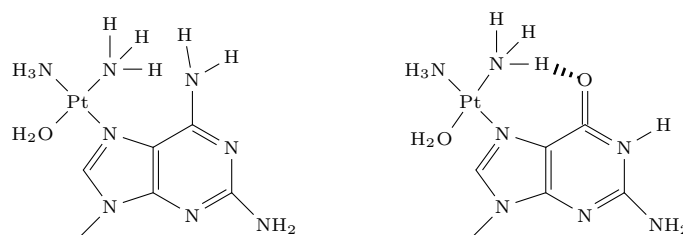


Figura 2.3 – Uma das possíveis ligações da platina com a molécula de DNA.

Quando ligada à molécula de DNA, a cisplatina pode formar vários tipos de adutos, como o monofuncionais que acontecem quando cada átomo de platina faz uma ligação com o DNA, e os bifuncionais onde cada platina se liga em duas posições no DNA, podendo formar a ligação intrafita (que o ocorre na mesma fita do DNA) e interfitas (que se liga em fitas diferentes); além da intermolecular que ocorre quando uma ligação da platina é feita com o DNA e a outra com biomoléculas como proteínas e aminoácidos.

Os adutos formados levam a alterações na estrutura da dupla hélice, como a distorção, por exemplo, que impedem processos de replicação e de transcrição do DNA, bloqueando a sintetização de novas moléculas essenciais para a divisão celular. Qualquer agente que interfira nesses processos podem ser citotóxicos, sugeridos como composto que poderia causar a morte das células cancerosas [18–20].

No entanto, o uso da cisplatina em tratamentos quimioterápicos sofre resistência celular, possui baixa solubilidade em água e espectro de atividade estreito; além de graves efeitos colaterais como nefrotoxicidade e ototoxicidade. Com o objetivo de

se obter medicamentos mais eficazes, vários outros complexos derivados de platina foram desenvolvidos, como a carboplatina (cis-diammine(cyclobutane-1,1-dicarboxylate-O,O')platinum(II), $C_6H_{12}N_2O_4Pt$, [21]), que possui uma atividade antineoplásica e formação de adutos semelhantes aos da cisplatina, porém também interage com a base citosina do DNA, realizando mudanças conformacionais da estrutura da molécula de DNA [22]. A Figura 2.4 representa o processo de hidrolisação que a carboplatina sofre para chegar ao seu estado ativo com cátions bivalentes em meio aquoso. Observe que o segmento ativo é exatamente igual a molécula de cisplatina ativa que interage com a dupla hélice do DNA.

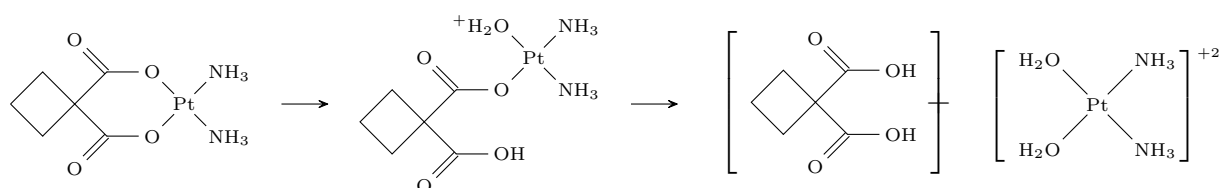


Figura 2.4 – Estrutura química planar da carboplatina inerte sofrendo hidrolisação para sua forma ativa em meio aquoso.

O uso da carboplatina em tratamentos cancerígenos apresenta praticamente o mesmo espectro de atividades da cisplatina, como tratamento de pulmão, ovário, cabeça e pescoço [23–25], porém com efeitos colaterais reduzidos. No entanto, apesar de ser melhor tolerado, a eficiência é menor para cânceres específicos e não atua em células que são resistentes ao tratamentos da cisplatina [26–28].

A oxaliplatina (trans-1,2diaminocicloexanooxalatoplatina(II), $C_8H_{14}N_2O_4Pt$) foi desenvolvida com o intuito de gerar menores efeitos colaterais do que a cisplatina e a carboplatina, com seu uso clínico aprovado no final da década de 80. Ela possui um espectro de atividade maior para algumas linhas de células cancerosas que antes eram resistentes ao tratamento com cisplatina e carboplatina, além de possuir uma nefrotoxicidade quase desprezível [29].

A Figura 2.5 ilustra a estrutura química planar da molécula de oxaliplatina sofrendo o processo de hidrólise, onde o composto incorpora duas moléculas de água, atingindo seu estado ativo bivalente.

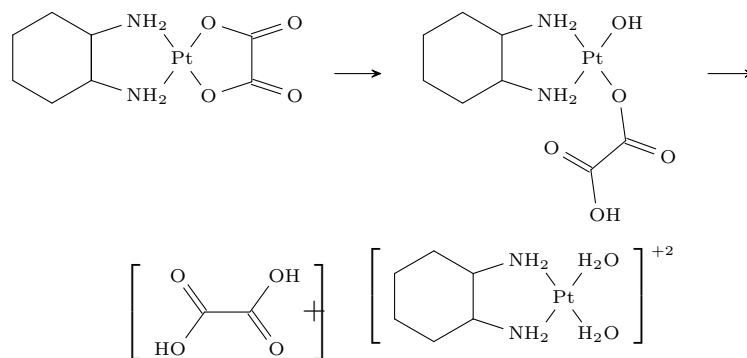


Figura 2.5 – Estrutura química planar da oxaliplatina inerte sofrendo hidrolisação para sua forma ativa em meio aquoso.

É importante salientar que enquanto o composto sintetizado de isômero cis mostrou-se ativo nos tratamentos, o seu correspondente isômero trans-cis-[PtCl₂(NH₃)₂] se mostrou inativo. Porém, atualmente já existem na literatura trabalhos relatando atividade dos complexos trans. A Figura 2.6 representa a estrutura química planar na forma inativa da transplatina que em meio aquoso sofre a hidrolisação para alcançar seu estado ativo.

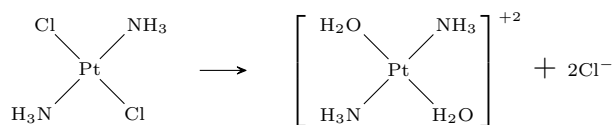


Figura 2.6 – Estrutura química planar da transplatina inerte sofrendo hidrolisação para sua forma ativa em meio aquoso.

III A molécula de cafeína

Uma estratégia para melhorar a eficiência das quimioterapias é utilizar uma segunda molécula além do agente anti-cancerígeno para modular a atividade deste último, melhorando seus efeitos sobre o DNA. É amplamente relatado na literatura que a cafeína aumenta os efeitos anticancerígenos da cisplatina ao inibir o reparo do DNA pela maquinaria celular [14, 30–32]. Muitos resultados específicos sobre esse fato foram obtidos em experimentos realizados em nível celular. Por exemplo, foi demonstrado que a cafeína aumenta a atividade antiproliferativa e a apoptose causada pela cisplatina em células cultivadas. Assim, o alcalóide mais consumido em todo o mundo diminui a viabilidade celular quando combinado com a cisplatina [14, 15]. Este efeito não foi encontrado quando a cafeína foi testada isoladamente em ensaios de cultura de célula, o que nos indica que a eficiência é resultado da combinação da cafeína e cisplatina [15].

A Figura III representa a estrutura química da cafeína (1,3,7-trimethylxanthine), que é encontrada em fontes naturais no nosso dia-a-dia como em chá, chocolate e café, além da cafeína sintética adicionada aos produtos para melhorar a suas propriedades estimulantes.

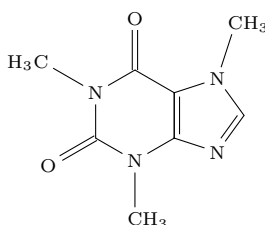


Figura 3.1 – Estrutura química da molécula de cafeína.

Neste trabalho buscamos entender o real papel da cafeína nas interações envolvidas entre os complexos formados (cafeína, compostos de platina e DNA) em uma amostra com solução salina tamponada com fosfato (PBS) com $[Na] = 150$ mM utilizando à técnica de moléculas únicas; fora da complexa maquinaria celular.

IV Técnicas experimentais

4.1 Pinça Óptica

Com o intuito de descrever melhor nosso universo, os cientistas buscam a cada dia respostas para diferentes fenômenos, desde escalas microscópicas até macroscópicas. No entanto, para que isto aconteça, nos últimos anos, várias técnicas e ferramentas foram desenvolvidas para manipular e observar os objetos de estudos, sem causar danos aos mesmos.

Para compreender melhor a técnica utilizada neste trabalho, uma breve revisão histórica se faz necessária. Tudo começou quando filósofos da Grécia antiga queriam responder "O que é a luz?". Porém, foi com Isaac Newton e Christian Huygens que o estudo da luz e suas propriedades ganhou impulso. Dependendo do experimento, ora ela se comporta como onda, ora como partícula.

Johanes Kepler foi o primeiro a propor que a luz possui a capacidade de gerar uma força em um objeto, o que foi confirmado por James Clerk Maxwell ao demonstrar teoricamente a pressão de radiação gerada pela luz [33]. Assim, o que faltava era observar este fenômeno. Muitos experimentos foram realizados para tentar detectar a pressão de radiação, porém a baixa intensidade e os espalhamentos causados pela luz dificultava a visualização deste efeito.

Isso mudou na década de 1960, quando o laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) surgiu no mercado. As características específicas da luz emitida pelo laser (monocromática, coerente, colimada e com grande intensidade), possibilitou que Arthur Ashkin aprisionasse uma partícula com sua armadilha óptica, que era composta por duas fontes de feixes de laser ou a combinação de um feixe de laser e a força gravitacional para alcançar a estabilidade da armadilha [13]. Em seu artigo, publicado em 1986, Ashkin et al. mostraram suas primeiras pinças ópticas de feixe único, onde a estabilidade da armadilha era devido à força do gradiente e de espalhamento. Por desenvolver a técnica de pinça óptica, Arthur Ashkin foi laureado em 2018 com o Nobel de Física [34]. Esta então se tornou uma magnífica ferramenta de micromanipulação de objetos (como moléculas únicas), que hoje em dia é eficaz em várias áreas de pesquisa, como física, biologia celular, biofísica, etc.

4.1.1 Teoria da pinça óptica

Um laser fortemente focalizado consegue aprisionar e manipular partículas em escala de micrômetros. Devido à competição entre forças que surgem da interação luz-partícula, estas forças dependem da potência e da velocidade de propagação da luz no

meio de incidência.

A força total que um feixe de luz exerce sobre uma partícula é dada por: $F = \frac{\partial p}{\partial t}$. Sabendo que o momento linear de um fóton incidente é $\vec{p} = \hbar\vec{k}$, esta relação pode ser reescrita em módulo como:

$$F = \frac{\partial(\hbar k)}{\partial t} \quad (4.1)$$

onde \vec{k} é o vetor de onda e \hbar é a constante de Planck. O vetor de onda é diretamente proporcional a frequência angular da luz incidente, w , e inversamente proporcional a velocidade da luz c . Logo,

$$F = \frac{\partial}{\partial t} \left(\hbar \frac{w}{c} \right) \quad (4.2)$$

Usando o fato de que a energia do fóton é dada por $E = \hbar w$, em um feixe de luz formado por N fótons, a energia total é $E_{\text{total}} = N\hbar w = NE$. Assim, a força total que um feixe de luz exerce sobre uma partícula fica

$$F = \frac{\partial p}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{E_{\text{total}}}{c} \right) = \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{N\hbar w}{c} \right) = \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{NE}{c} \right) = \frac{1}{c} \frac{\partial(NE)}{\partial t} = \frac{P_{\text{total}}}{c}, \quad (4.3)$$

onde P_{total} é a potência total do feixe incidente. Em um experimento típico de manipulação de células, vírus, bactérias e moléculas como o DNA, a potência utilizada no laser é da ordem de alguns miliwatts, gerando uma força de pico-Newtons, como mostrado na Equação 4.4.

$$F \approx \frac{1 \times 10^{-3} \text{ W}}{3 \times 10^8 \text{ m/s}} \approx 10^{-11} \text{ N} = 10 \text{ pN} \quad (4.4)$$

Este laser, ao atingir a partícula sofrerá reflexão, dando origem a pressão de radiação. Para um único raio refletido, temos que

$$F \propto \frac{P_{\text{raio}}}{v} \quad (4.5)$$

onde $v = \frac{c}{n_m}$, sendo P_{raio} a potência de um único raio e n_m o índice de refração do meio de incidência.

4.1.1.1 Regimes da pinça óptica

Podemos estudar a manipulação das partículas em dois regimes: o primeiro onde o tamanho da partícula aprisionada é muito menor que o comprimento de onda da luz e pode ser considerada um dipolo elétrico, chamado regime de Rayleigh, e o segundo quando o tamanho da partícula aprisionada é muito maior do que o comprimento de onda do feixe de radiação utilizado, regime da ótica geométrica, que pode ser descrito

pelo modelo clássico de refração e reflexão de raios ópticos [13,35] . Nas seções seguintes, mostraremos como um feixe de laser altamente focalizado consegue aprisionar partículas nos dois regimes citados acima.

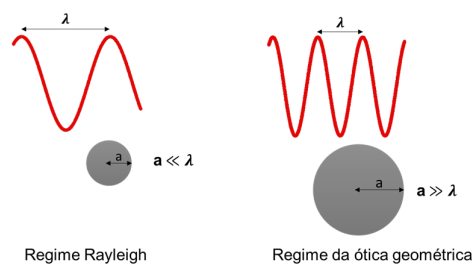


Figura 4.1 – Representação dos regimes da pinça óptica.

4.1.1.2 Regime da óptica geométrica

Quando o comprimento de onda do laser incidente é muito menor que a partícula aprisionada podemos usar o modelo clássico de refração e reflexão de raios ópticos para descrever o efeito das forças de espalhamento e gradiente sobre as partículas aprisionadas.

Nos experimentos de pinça óptica, o laser utilizado possui um perfil gaussiano que passa por uma lente de alta abertura numérica para que forças de gradientes superem as forças de espalhamento, levando a partícula para a região focal. Este perfil gaussiano contribui para que as forças resultantes possam ser direcionadas à região de interesse. Demonstraremos a seguir, qualitativamente e com mais detalhes, as características destas forças.

A Figura 4.2 apresenta dois raios saindo da extremidade do laser gaussiano que passa pela lente e reflete sobre a microesfera, representada em cinza, com índice de refração diferente. Considerando a microesfera como partícula, esses raios exercem uma força (F) sobre a microesfera que empurrará para o sentido de incidência do feixe. Portanto, quando vários raios fazem o mesmo papel temos a origem da pressão de radiação.

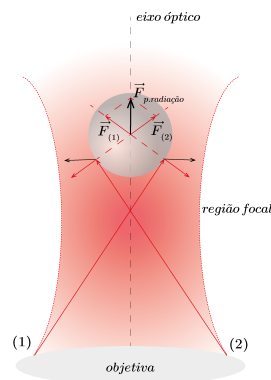


Figura 4.2 – Ilustração da pressão de radiação. O raio (1) aplica uma força $\vec{F}_{(1)}$ sobre a microesfera, enquanto o raio (2) aplica uma força $\vec{F}_{(2)}$. A força resultante gerada pela soma do feixe total age empurrando a microesfera no sentido de incidência do feixe.

À medida que os fótons percorrem o caminho do laser, eles carregam momento que mudam ao interagir com a partícula aprisionada. Isso acontece pois os fótons sofrem uma refração quando atingem a superfície da microesfera. Essa refração resulta em uma mudança na direção do fóton e, portanto, uma alteração no momento do fóton. Como resultado da terceira lei de Newton, a força exercida sobre o fóton devido à variação do seu momento é de igual magnitude a força exercida sobre a microesfera e dá origem a força de gradiente. A Figura 4.3 esquematiza a ação da força de gradiente em uma microesfera que está fora da região focal do laser.

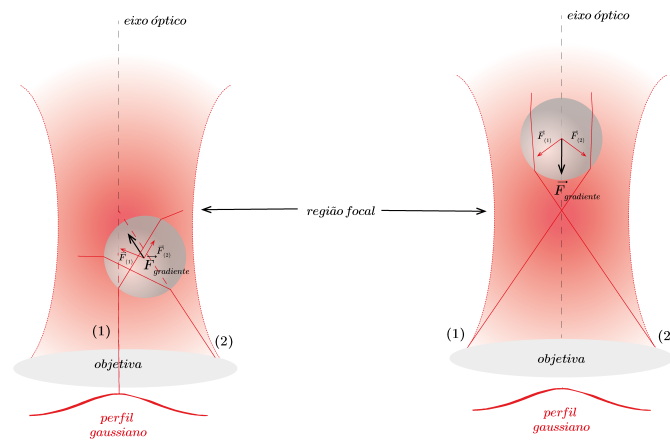


Figura 4.3 – Ilustração da ação da força de gradiente sobre uma microesfera. Na figura do lado esquerdo, a microesfera está abaixo da região focal do laser. A seta preta é a força resultante que empurra a microesfera para cima e para esquerda para alcançar o foco do laser. Na figura do lado direito, a microesfera está acima da região focal e a força resultante aponta para baixo, levando a microesfera para a região focal do laser gaussiano.

Na Figura 4.3 ao lado esquerdo, a microesfera está situada em uma região abaixo do foco, e representamos dois raios incidentes, um central e um na extremidade do laser. Como já mencionado, ao atravessar a superfície, o fóton sofre uma variação do seu momento, e como consequência da conservação do momento linear do raio-microesfera, uma força resultante surgirá apontando para a região focal do laser, empurrando a microesfera para esquerda e para cima. Na Figura 4.3, ao lado direito, a microesfera está localizada acima do foco. Pelo mesmo princípio de conservação do momento linear total do sistema raio-microesfera, temos uma força resultante que empurrará a microesfera para região mais intensa do laser gaussiano.

Uma vez que a microesfera é centralizada devido às forças de gradiente, todos os raios de fótons refratados serão simétricos em torno dela, levando um momento líquido igual a zero. Sem uma mudança no momento, não haverá forças sobre a partícula e ela permanecerá nessa posição, como mostrado na Figura 4.4.

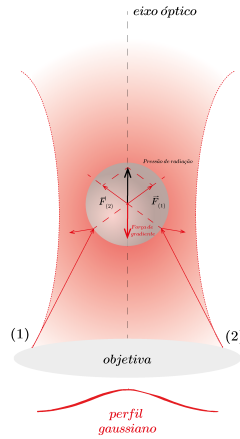


Figura 4.4 – Aprisionamento da microesfera na região focal do laser gaussiano, devido ao equilíbrio entre as forças que surgem dos raios refletidos e refratados sobre a microesfera.

4.1.1.3 Modelo do dipolo elétrico

Podemos descrever a interação dos fótons com a partícula com o modelo de dipolo elétrico, uma vez que o comprimento de onda dos feixes incidentes é suficientemente maior que o diâmetro da partícula, considerando a partícula como um dipolo pontual no campo eletromagnético do laser [35].

Usando a equação de Lorentz que descreve a força que a partícula sofre em um campo magnético, temos:

$$\mathbf{F} = (\mathbf{p} \cdot \nabla) \mathbf{E} + \frac{d\mathbf{p}}{dt} \times \mathbf{B} \quad (4.6)$$

onde \mathbf{F} é a força, \mathbf{p} é o momento de dipolo, e \mathbf{B} , \mathbf{E} são os campos magnéticos e elétricos, respectivamente. Assumindo que a partícula aprisionada é composta por um meio linear, podemos usar a polarizabilidade, α , para eliminar a polarização dipolar da equação 4.6. Neste caso $\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E}$, de forma que,

$$\mathbf{F} = \alpha \left[(\mathbf{E} \cdot \nabla) \mathbf{E} + \frac{d\mathbf{E}}{dt} \times \mathbf{B} \right]. \quad (4.7)$$

Manipulando 4.7,

$$\mathbf{F} = \alpha \left[\frac{1}{2} \nabla E^2 + \frac{d}{dt} (\mathbf{E} \times \mathbf{B}) \right]. \quad (4.8)$$

Em um experimento de pinça óptica a potência do laser é considerada constante, pois as frequências de amostragem são menores que a frequência do feixe de laser [36]. Isto implicará no descarte do último termo da Equação 4.8, que representa o fluxo de potência através de um campo elétrico, conhecido como a derivada temporal do vetor de Poynting. Assim, com a potência constante, a força de Lorentz sobre o dipolo elétrico fica

$$\mathbf{F} = \alpha \frac{1}{2} \nabla E^2. \quad (4.9)$$

Aqui podemos ver claramente o papel da força de gradiente: o termo E^2 representa a intensidade eletromagnética dos fótons que atuam sobre a partícula, a função gradiente mostra que a força está apontando na direção do ponto de maior intensidade do campo, que corresponde a parte da região focal do laser gaussiano. Desse modo, a força que atua sobre a partícula irá atraí-la para esta posição.

4.2 Espectrofotômetro UV-VIS

Utilizamos uma técnica suporte para melhor compreensão dos nossos resultados, a espectrofotometria ultravioleta visível. Ela foi desenvolvida depois que a interação da radiação eletromagnética com a matéria despertou o interesse da comunidade científica. Historicamente, a espectroscopia teve origem quando Isaac Newton estudou a dispersão da luz visível através de um prisma. Mais tarde o conceito foi expandido para qualquer interação, com a energia em função da frequência ou comprimento de onda [37].

Podemos classificar a interação da radiação com a matéria através da absorção e emissão. Na espectroscopia UV-VIS estes fenômenos ocorrem na faixa da luz visível, com comprimento de onda de 400 nm a 800 nm, e no ultravioleta, 200 nm a 400 nm, fazendo jus ao nome da técnica experimental [38].

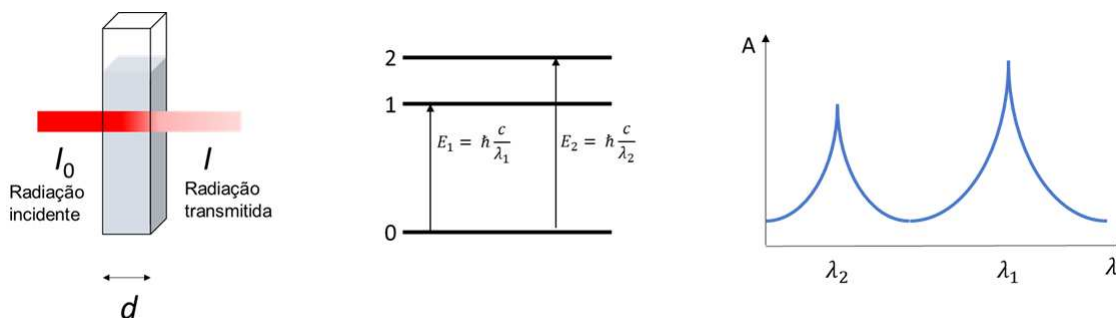


Figura 4.5 – A radiação incidente passa pela amostra que absorve em determinados comprimentos de onda, elevando seus elétrons de um nível de energia menor para o maior. O gráfico de absorbância em função do comprimento de onda apresenta um pico característico para cada amostra que absorve em determinado comprimento de onda.

A Figura 4.5 ilustra uma radiação incidente sobre uma amostra, que ao atravessá-la perde intensidade, pois as moléculas da amostra apresentam elétrons que absorvem fótons em um determinado comprimento de onda e são promovidos a níveis de energia mais elevados. O espectrofotômetro UV-VIS nos fornece esses comprimentos de onda através de um espectro de absorbância por comprimento de onda, como mostrado na

Figura 4.5, pelos picos específicos para cada material. Observe que para o pico maior a energia absorvida foi menor e vice versa, pois energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda ($E = \frac{hc}{\lambda}$).

Uma maneira de definir a absorbância é em função do logarítmico do inverso da transmitância,

$$A = \log \frac{I_0}{I}, \quad (4.10)$$

onde a transmitância é dada pela razão da radiação transmitida pela incidente,

$$T = \frac{I}{I_0}. \quad (4.11)$$

Além disso, o matemático Johann Heinrich Lambert e o físico August Beer observaram que a intensidade da radiação transmitida ao passar pelo meio absorvedor era proporcional à espessura (L) da amostra e a concentração da espécie absorvedora (C) contida na amostra, respectivamente, criando a lei de Lambert-Beer que nos fornece a absorbância como

$$A = \varepsilon LC, \quad (4.12)$$

sendo ε o coeficiente de absorção molar. De modo que podemos obter ε para um determinado comprimento de onda pela lei de Lambert-Beer, já que L e C são conhecidos.

V Ácido desoxirribonucleico (DNA)

Neste trabalho, nosso interesse é compreender a interação do complexo formado pelos compostos de platinas, cafeína e molécula de DNA; utilizando a técnica de pinça óptica para retirar parâmetros mecânicos do polímero ao sofrer interações. Neste capítulo, apresentaremos de forma breve a história e propriedades deste polímero semi-flexível.

5.1 Estrutura do DNA

Em 1953, ocorreu uma grande revolução na área da genética quando o biólogo James D. Watson e o físico Francis Crick desvendaram a estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucleico (DNA), a molécula mais importante nos sistemas vivos, ao estudarem a análise dos padrões de difração de raio-x obtido por Rosalind Franklin e E. Goslin em amostras de fibras de DNA, juntamente com as "regras de Chargaff" criadas por Erwin Chargaff em 1951 que formalizam as quantidades das bases nitrogenadas. Esta descoberta lhes renderam o Prêmio Nobel de Medicina em 1962 [39].

A molécula de DNA foi descrita por eles como uma cadeia linear que contém estruturas básicas, os nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por um grupo fosfato, um açúcar do tipo pentose, e uma base nitrogenada (adenina, guanina, citosina e timina). As bases da cadeia formam ligações de hidrogênio com as bases da cadeia vizinha, como ilustrado na Figura 5.1. Os grupos NH são os doadores da ligação, enquanto os grupos carbonil (C=O) são os aceptores. Este pareamento é altamente específico: a citosina é pareada com a guanina e a adenina é pareada com a timina [40].

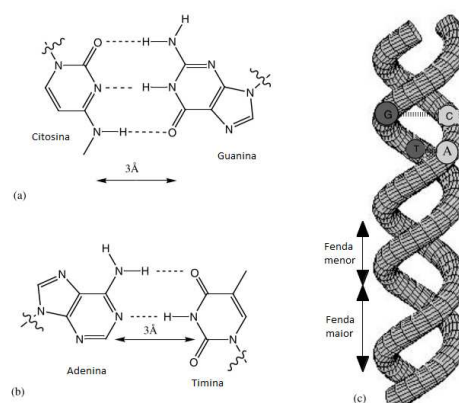


Figura 5.1 – (a) e (b): Ligação de hidrogênio entre as bases das duas fitas gerando a estrutura da dupla hélice do DNA (c) [2].

A cadeia linear é formada através da ligação fosfodiéster estabelecida entre os gru-

pos fosfatos e os grupos hidroxilas do nucleotídeo adjacente. No entanto, caso o carbono 5' da pentose do primeiro nucleotídeo esteja voltado para cima, todos os demais nucleotídeos da cadeia estarão na mesma posição, determinando o crescimento da cadeia na direção 5' para 3'. Para a formação da dupla hélice, uma outra cadeia linear se liga através da ligação de hidrogênio no sentido 3' para 5', como ilustrado na Figura 5.2. Porém, melhor correspondência entre as bases complementares é fornecida quando as duas cadeias vizinhas se torcem, formando duas cavidades desiguais: a fenda maior e a fenda menor como ilustrado na Figura 5.1 (c).

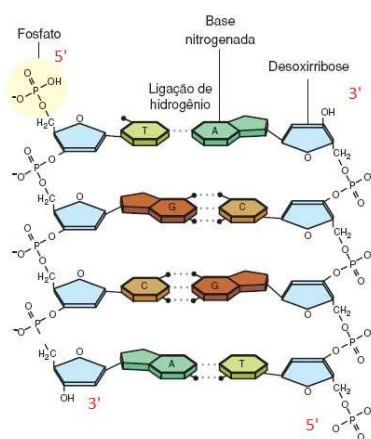


Figura 5.2 – Sentido para a formação complementar das duas fitas do DNA, em que um grupo de fosfato conecta o carbono 3' de um açúcar ao carbono 5' do próximo açúcar [3].

Note que o interessante é que o nosso código genético está descrito por apenas quatro letras do alfabeto que se organizam em pares aleatórios ao decorrer da dupla hélice.

Existem três tipos de DNA que podem ser encontrados em sistemas biológicos: DNA-A, DNA-B e DNA-z, como ilustrado na Figura 5.3 .

O que diferencia eles são fatores da sua própria estrutura, como a direção, a intensidade do enrolamento, a solução em que está presente, modificações químicas que ocorrem em suas bases, e etc. A Tabela 5.1 mostra as principais diferenças entre os três tipos de DNA.

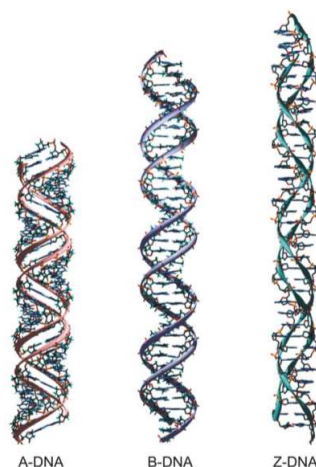


Figura 5.3 – Comparação entre diferentes formas do DNA. A-DNA(rosa), B-DNA (lilás) e Z-DNA (azul) [4].

Propriedade	Hélices		
	A	B	Z
Sentido da hélice	mão direita	mão direita	mão esquerda
Distância média entre os pares de base	~ 0,36 nm	~ 0,33nm	~ 0,456nm
Diâmetro	~ 2,55 nm	~ 2,37nm	~ 1,84nm
Pares de base por volta da hélice	11	11	12
Rotação média par de bases	31°	34,6°	-60°

Tabela 5.1 – Principais diferenças entre os três tipos de DNA (A, B e Z) que podem ser encontrados em sistemas biológicos [4, 11, 12].

Em nossos experimentos, utilizamos DNA encontrado no bacteriófago λ que possui a forma B. Ele é um vírus que infecta a bactéria *E. Coli*, possuindo 48,502 pares de base, que resulta em comprimento médio ponta a ponta de 16,5 μm , sendo ideal para experimentos de estiramentos na pinça óptica.

5.2 Propriedades mecânicas dos polímeros

Para compreender melhor sobre a molécula de DNA, precisamos introduzir algumas propriedades sobre a mecânica dos polímeros. Os polímeros são definidos como moléculas longas, constituídas de subunidades chamadas monômeros, que estão conectados sequencialmente. Portanto, a molécula de DNA está contida nessa definição, já que é constituída por quatro monômeros básicos que são os seus nucleotídeos [41]. Dentro da mecânica dos polímeros, o DNA pode ser caracterizado através das seguintes propriedades: comprimento de contorno, comprimento de persistência, distância quadrática média e o raio de giro [5].

O comprimento de contorno (L) é definido como o tamanho do polímero, de uma

extremidade a outra, quando este está em uma conformação completamente retilínea. Já o comprimento de persistência (A) está diretamente relacionado à rigidez do polímero; quanto maior a rigidez, maior será o comprimento de persistência, sendo mensurado como a distância média entre duas dobras consecutivas ao longo da cadeia polimérica.

Ao colocar o DNA em solução aquosa, ele sofrerá choques das moléculas do meio aquoso até atingir um estado de equilíbrio termodinâmico; de modo que podemos caracterizá-lo com o raio de giro, que nos informa o volume ocupado pelo polímero, e a distância quadrática média que nos dá o valor médio da distância entre as duas extremidades da cadeia polimérica. Essas características dependem diretamente da rigidez do polímero e da temperatura, como descrito a seguir.

Ao aumentar a temperatura do sistema, o número das interações da moléculas do meio aquoso com a molécula de DNA aumenta. Podemos descrever este fenômeno através da entropia, que relaciona o número de configurações possíveis para o polímero, Ω , [42],

$$s = k_B \ln \Omega, \quad (5.1)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann. Quando a temperatura é mínima, tendendo a zero, o polímero se encontra em uma conformação retilínea, de modo que o comprimento de persistência tende ao infinito. Podemos ver este resultado através da Equação 5.2 que nos informa o comprimento de persistência em função da temperatura e da rigidez flexural do polímero, k_f ,

$$A = \frac{1}{k_B T} k_f. \quad (5.2)$$

Ao aumentar a temperatura, as moléculas do meio vão se colidindo com o DNA, fazendo com que suas extremidades se aproximem, aumentando a entropia, já que o número de dobras e as possíveis configurações aumentam. Ao atingir o equilíbrio termodinâmico com a solução aquosa, o número de configurações possíveis para o polímero é máximo, implicando uma entropia máxima. Neste caso, os choques causados pela moléculas do meio aquoso sobre o polímero não alteram mais a distância média entre as extremidades do polímero.

Portanto, para conseguir estirar às pontas da molécula de DNA, precisamos aplicar uma força externa sobre ele. Existem dois regimes em que este estiramento pode acontecer, o regime entrópico que acontece quando a força aplicada possui uma magnitude pequena ($\sim 5pN$), de modo que o DNA não sofre alterações nas suas ligações químicas e como consequência retorna a sua posição inicial ao cessar da força. E o regime entálpico, em que a força é suficientemente grande de modo a modificar à estrutura da dupla hélice, aumentando o comprimento de contorno original da molécula. Em nossos experimentos, tivemos o cuidado de fazer a análise no regime entrópico, que pode ser descrito pelo modelo Worm-like chain (WLC) para um polímero semi-flexível.

5.2.1 Modelo de Kratky-Porod

Antes de descrevermos o modelo WLC, introduziremos a análise matemática para descrever a energia gasta para dobrar uma vareta flexível. Considere uma vareta rígida de comprimento L ; a energia gasta para dobrá-la em um semicírculo de raio R é [5],

$$E_{curva} = \frac{K_f L}{2R^2}, \quad (5.3)$$

sendo K_f a rigidez flexural da vareta, que é proporcional ao módulo de Young (Y) e ao momento geométrico de segunda ordem da seção reta (I). Para generalizarmos a Equação 5.3 consideramos uma curva aleatória ilustrada na Figura 5.4,

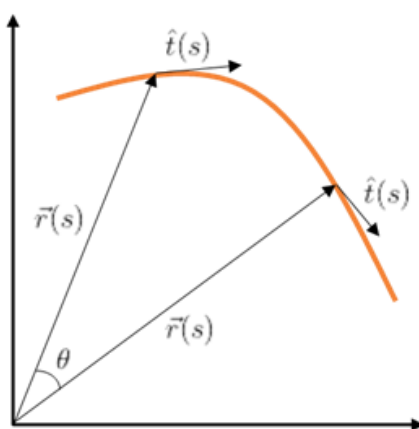


Figura 5.4 – Curva arbitrária em laranja.

Observe que na Equação 5.3, o termo $\frac{1}{R}$ é a curvatura C do semicírculo, de modo que para a curva arbitrária podemos substituir $\frac{1}{R^2}$ por C^2 . Iremos parametrizar a curva, usando o vetor posição $\vec{r}(s)$ que localiza um ponto arbitrário ao longo da curva e o vetor unitário tangente em cada ponto, $\hat{t}(s)$, que estão relacionados como

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \quad (5.4)$$

Assim, a curvatura é dada por

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|, \quad (5.5)$$

que pode ser substituída na Equação 5.3, e ao integrarmos ao longo de toda a curva de comprimento L , obtemos a energia total gasta para dobrar a curva neste formato aleatório,

$$E_{kP} = \frac{1}{2} k_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds. \quad (5.6)$$

A Equação 5.6 é o modelo desenvolvido por Kratky-Porod em 1949 para descrever a energia de curvatura de um polímero.

5.2.2 Modelo Worm Like-Chain (WLC)

O modelo Worm Like-chain de Marko e Siggia descreve as propriedades elásticas de polímeros semi-flexíveis, como a molécula de DNA. Ele utiliza a Equação 5.6 de Kratky-Porod para introduzir a energia gasta para introduzir uma curvatura no polímero. No entanto, este modelo é utilizado apenas para o regime em que os estiramentos não alteram as propriedades intrínsecas do polímeros, ou seja, no regime entrópico.

Este modelo nos fornece de maneira satisfatória a curva de força por extensão para realizar ajustes dos dados experimentais obtidos pela técnica de pinçamento óptico, para ambos os estiramentos, próximos e distantes, da conformação de equilíbrio.

Os cálculos para estes estiramentos podem ser encontrados nas referências [43,44]. Para pequenos estiramentos do polímero, a força exercida em função da extensão (z) é dada por $F = -\frac{3k_B T}{2AL} z$, e distante da conformação de equilíbrio $F = \frac{k_B T}{4A} \left[\frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right]$. Note que a expressão para grandes estiramentos não contém o estiramento para pequenas distâncias. Este problema foi contornado ao adicionar dois termos de correção na expressão de longo estiramento, que não sejam relevantes nesse regime, mas que contemplam também o regime de pequenos estiramentos. Então, em 1995, Marko e Siggia descreveram de maneira satisfatória o comportamento de polímeros semi-flexíveis para estiramento longo e curto do polímero da sua posição de equilíbrio [45], descrito pela Equação 5.7.

$$F \cong \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} - \frac{1}{4} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right], \quad (5.7)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, L e A são o comprimento de contorno e persistência, respectivamente, e z é a extensão do polímero. Esta equação é uma aproximação, pois quando $z = L$ ela diverge, sendo válida na prática até $z \cong 0,95L$.

VI Interações DNA-ligantes

Ao estudar a escala molecular, precisamos compreender fenômenos biológicos envolvidos neste meio, como a interação e associação entre moléculas. E para isto, introduziremos os principais modos de ligação de agentes químicos com a molécula de DNA, representados na Figura 6.1.

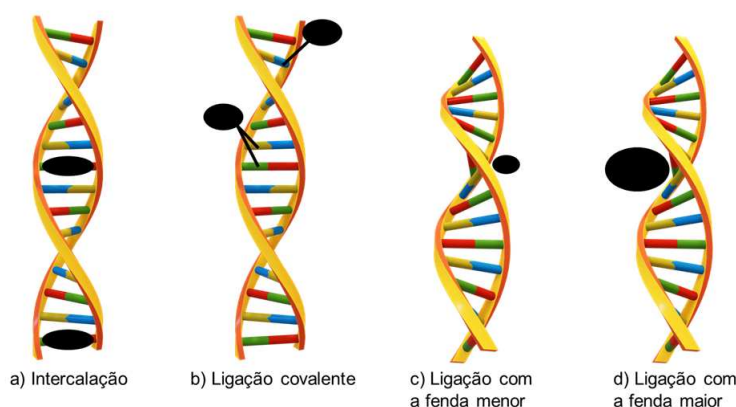


Figura 6.1 – Principais tipos de interações possíveis entre pequenos ligantes e a molécula de DNA.

Primeiramente, observamos a interação por intercalação, ilustrada na Figura 6.1 (a), que ocorre pois compostos que apresentam anéis aromáticos planares se encaixam entre os pares de bases da molécula de DNA, causando um desenrolamento da dupla hélice e gerando um pequeno aumento no comprimento de contorno para acomodar as moléculas intercaladas dos ligantes. A estabilidade desta acomodação é devido as interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, mas principalmente às interações de empilhamento π entre os anéis aromáticos do agente intercalante e os orbitais aromáticos heterocíclicos dos pares de base. Exemplos de intercalantes são a daunomicina, doxorrubicina e o brometo de etídio, composto utilizado como corante de eletroforese em gel [46, 47].

A ligação covalente ocorre quando os átomos dos ligantes e das bases nitrogenadas do DNA compartilham seus elétrons para se manterem estáveis, formando ligação conhecida como aduto. Como ilustrado na Figura 6.1(b), os monoadutos ocorrem quando há apenas uma ligação química, enquanto nos diadutos existem duas ligações entre o ligante e o DNA. Esta ligação é geralmente irreversível e inibe os processos de replicação do DNA. As platinas, objetos de estudo deste trabalho, possuem a ligação covalente como o mecanismo de ação para interagir com o DNA [48].

Na Figura 6.1 (c) e (d), estão representadas as interações por fendas menor ou maior na dupla hélice que é o grande alvo de agentes de ligação não covalentes. Esta

interação está dentro do grupo de compostos que interagem eletrostaticamente, por meio de ligação de hidrogênio e de van der Waals, entre os sítios AT da molécula de DNA. É uma interação que forma complexos reversíveis, mas que causam alterações na elasticidade da molécula [49]. Os principais ligantes de fenda são o alcaloide cafeína, e os antibióticos netropsina e berenil, entre outros.

Observamos que a interação eletrostática é fundamental para praticamente todas as interações entre o DNA e o agente químico, devido à atração e à repulsão das cargas elétricas dos mesmos. O DNA possui uma densidade de carga negativa em solução aquosa devido aos seus grupos fosfato, PO_4^- , resultando em uma distribuição de carga negativa discreta de duas cargas elementares por distância entre pares de base. Os contraíons presentes em solução podem diminuir esta repulsão interfosfato devido à interação atrativa com os mesmos.

Com isto, observamos que a interação com ligantes de cargas positivas, como os íons e macro-íons, especialmente cátions multivalentes, é de extrema relevância, podendo causar a condensação da molécula de DNA em solução.

A condensação pode ser causada por cátions multivalentes, que possuem carga igual ou superior a +3, que se ligam ao longo da dupla hélice, e as correlações posicionais entre eles desempenham papel na transição do DNA disperso para a forma condensada, onde o polímero dobra em si mesmo, aumentando a densidade local de segmentos de DNA [50]. O comprimento de contorno é uma propriedade mecânica de grande interesse ao estudar esta interação, já que as moléculas catiônicas ligadas ao longo do DNA promovem a atração de segmentos distintos, devido às correlações posicionais íons-íons. Assim, o ideal é sempre estudar polímeros em que o comprimento de contorno seja maior que o comprimento de persistência, já que pequenos DNAs não são facilmente condensados. Alguns exemplos de agentes que se ligam com o DNA por condensação de origem eletrostática são a espermina⁴⁺ e spermidina³⁺.

6.1 Equilíbrio químico nas interações DNA-ligantes

Sabemos que ao misturar duas ou mais substâncias, elas podem gerar uma terceira, produto da reação química. Nesta seção estamos interessados na descrição do equilíbrio químico da reação destas moléculas. Para nosso estudo, vamos considerar a associação entre a molécula A, definida como ligante, e a outra molécula B, que é capaz de se ligar em apenas um sítio da molécula A, produzindo um complexo C. Esta dinâmica pode ser expressada como a reação direta [2],



Podemos ter, também, a reação inversa,



onde K_i e K_d são, respectivamente, as constantes de associação e dissociação.

Para a formação do complexo C, A e B reagem de modo que as quantidades de A e B presentes na solução diminuam, pois são consumidos na reação. A quantidade de complexo C vai aumentando gradativamente. O equilíbrio por outro lado, será estabelecido quando as concentrações de reagentes e produtos não variam mais. Portanto, podemos definir o equilíbrio químico do sistema como o estado em que número médio das moléculas em cada partição do sistema permanece constante.

A reação 6.1 é caracterizada pela constante de associação de equilíbrio, K_i , definida em termos das concentrações molares das espécies no equilíbrio, como uma razão direta das concentrações dos complexos e inversa das concentrações dos reagentes,

$$K_i = \frac{[C]}{[A][B]}. \quad (6.3)$$

Observe que não importa a quantidade inicial dos reagentes ou complexos adicionados na solução, o equilíbrio acontecerá apenas para uma proporção fixa das concentrações dessas espécies, de tal forma a fazer K_i uma constante numérica.

A constante de dissociação de equilíbrio é definida como o processo inverso da reação direta ($K_d = K_i^{-1}$), ou seja,

$$K_d = \frac{[A][B]}{[C]} = K_i^{-1}, \quad (6.4)$$

que representa o processo de dissociação da molécula C em moléculas A e B, e é frequentemente expressa em molar, $[K_d] = M$.

No intuito de formalizar nosso estudo de interações DNA-ligantes, podemos definir $[A] \equiv C_f$ como sendo a concentração de ligantes livres em solução, $[C] \equiv C_b$ como a concentração de ligantes ligados à molécula de DNA e $[B] \equiv C_{bp} - C_b$, sendo a concentração de sítios livres ligáveis à molécula de DNA, onde C_{bp} é a concentração constante de pares de bases. Substituindo na Equação 6.3, temos:

$$K_i = \frac{C_b}{C_f(C_{bp} - C_b)}. \quad (6.5)$$

E definindo a razão entre a concentração dos sítios ligados pela concentração de pares de base como r,

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}}, \quad (6.6)$$

encontramos a conhecida isoterma de ligação de Scatchard, ao substituir 6.6 em 6.5,

$$r = \frac{K_i C_f}{1 + K_i C_f}. \quad (6.7)$$

Originalmente proposta em 1949, ela relaciona a fração de sítios ligados com a concentração de ligantes livres em solução [51]. Uma vez que a constante de associação química apresenta variação com a temperatura, a isoterma de Scatchard é válida apenas para experimentos realizados à temperatura constante.

Ainda que seja um modelo interessante, a isoterma descrita por Scatchard, apresenta duas simplificações que não descrevem a maioria das interações entre ligantes e DNA. A primeira é que o modelo é válido apenas para pequenas moléculas que ocupam apenas um par de bases do DNA quando ligadas e a segunda é que a interação é não cooperativa, ou seja, a ligação do primeiro ligante não altera a afinidade com a qual os demais se ligarão.

Podemos corrigir a primeira simplificação introduzindo na Equação 6.7 o parâmetro de fração de ligante ligado na saturação, r_{max} , ou seja, o máximo da fração do ligante ligado. Este valor deve possuir valor menor ou igual a um, em que $r_{max} = 1$ é a situação do ligante ocupando apenas um par de base:

$$r = \frac{r_{max} K_i C_f}{1 + K_i C_f}. \quad (6.8)$$

Note que o inverso r_{max} é o número médio de pares de bases ocupados por cada molécula de ligante ligada, $N = 1/r_{max}$.

Para contornar a segunda simplificação A.V. Hill propôs, em 1910, a isoterma de ligação de Hill quando descreveu a interação do oxigênio à hemoglobina dentro dos glóbulos vermelhos como descrito no próximo capítulo [52].

VII Modelo de Hill e cooperatividade

Compreender às propriedades dos receptores usando as leis da física e matemática se tornou uma das grandes tentativas no século XX, introduzindo importantes cientistas destas áreas na farmacologia. Em 1910, o matemático que se tornou fisiologista Archibald Vivian Hill (1886–1977) se interessou por receptores de compostos estudando a ligação do oxigênio à hemoglobina [53]; embora tenha sido reconhecido por seu trabalho mais famoso, a energia muscular, que lhe rendeu o prêmio Nobel de medicina em 1922 [54]. A conquista de Hill realmente marca o início da farmacologia quantitativa, além do surgimento da biofísica como uma disciplina distinta [53].

Ao estudar a ligação entre o oxigênio com as moléculas de hemoglobina, Hill observou de forma empírica que a isoterma de ligação medida para esta interação não podia ser explicada como o proposto por Scatchard, Equação 6.7. O problema abordado por ele está ilustrado na Figura 7.1, onde a cada molécula de hemoglobina (Hb) pode comportar até quatro moléculas de oxigênio (O_2) na saturação.

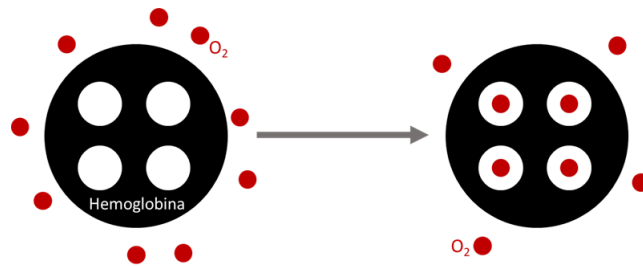


Figura 7.1 – Moléculas de oxigênio (círculo vermelho) interagindo com a hemoglobina. Lado esquerdo ilustra o estado $r = 0$ e o lado direito o estado de saturação $r = r_{max}$ [5].

A interação química global, pode ser descrita como,



sendo que Hb representa a molécula de hemoglobina, O_2 de oxigênio, e $Hb(O_2)_n$ o complexo final formado, uma molécula de hemoglobina mais n moléculas de oxigênio ligadas. Hill introduziu o coeficiente n , que é o número de sítios que a molécula de hemoglobina fornece para as moléculas de oxigênio se ligarem [55].

Neste caso, observe que a constante de associação de equilíbrio definida para um sítio de ligação já não é mais útil. Para contornar este problema, Hill definiu uma nova constante chamada de constante de associação de ligação aparente, K_A , que é dada como sendo a razão entre a concentração do complexo gerado pelo produto das concentrações da hemoglobina e do oxigênio, sendo a concentração da moléculas de oxigênio elevada ao

número de sítios de ligação,

$$K_A = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb][O_2]^n}. \quad (7.2)$$

Ao fazer o expoente de Hill unitário voltamos para o caso em que apenas um sítio de ligação está disponível e a isoterma de Scatchard é válida. Para uma melhor compreensão, vamos considerar o caso em que não há cooperatividade, isto significa, que uma molécula de oxigênio se liga a hemoglobina de cada vez. A reação química para $n = 1$ pode ser descrita como,



Neste caso a constante de associação de equilíbrio K_i é

$$K_i = \frac{[Hb(O_2)]}{[Hb][O_2]}. \quad (7.4)$$

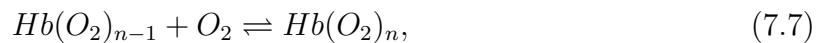
Para uma segunda reação,



e a constante de associação de equilíbrio, fica

$$K_2 = \frac{[Hb(O_2)_2]}{[HbO_2][O_2]}. \quad (7.6)$$

Já para a n -ésima reação,



temos a constante de associação de equilíbrio K_n ,

$$K_n = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb(O_2)_{n-1}][O_2]}. \quad (7.8)$$

Note que,

$$K_A = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb][O_2]^n} = \frac{[Hb(O_2)]}{[Hb][O_2]} \frac{[Hb(O_2)_2]}{[HbO_2][O_2]} \cdots \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb(O_2)_{n-1}][O_2]} = K_1 K_2 \cdots K_n. \quad (7.9)$$

Ou seja, a constante de associação de ligação aparente é o produto das constantes de associação de equilíbrio de cada etapa. Para o caso em que todas as constantes são idênticas, temos

$$K_A = K_i^n. \quad (7.10)$$

Vamos introduzir este modelo nos nossos estudo da interação de ligantes a molécula

de DNA, considerando por simplicidade que um ligante ocupa apenas um par de base. Fazendo $[Hb(O_2)_n]$ como sendo a concentração de ligantes ligado à molécula de DNA C_b , $[O_2]$ a concentração de ligantes livres em solução C_f , e $[Hb] = C_{bp} - C_b$ a diferença entre a concentração de pares de base na molécula de DNA C_{bp} e a concentração de ligantes ligados ao DNA [55]. Portanto, a constante de associação de ligação aparente pode ser escrita como,

$$K_A = \frac{C_b}{(C_{bp} - C_b)C_f^n}. \quad (7.11)$$

A fração de sítios ligados r na molécula de DNA pode ser escrita como,

$$r = \frac{K_A C_f^n}{1 + K_A C_f^n}. \quad (7.12)$$

Fazendo todas as constantes de associação de equilíbrio iguais, podemos reescrever a fração de sítios ligados como,

$$r = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}. \quad (7.13)$$

Esta equação é conhecida como a isoterma de ligação de Hill ou equação de Hill. Para generaliza-la acrescentaremos o parâmetro r_{max} que leva em consideração os ligantes que ocupam mais de um par de base da molécula de DNA,

$$r = \frac{r_{max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}. \quad (7.14)$$

Portanto, ao introduzir o coeficiente n em sua equação, além de levar em consideração a quantidade de sítios possíveis para uma ligação do ligante, este coeficiente traz o conceito de cooperatividade. Por exemplo, ao admitir valores fixos para K_i e r_{max} na Equação 7.14, quanto maior o coeficiente n , mais rápido a saturação do sistema vai acontecer, ou seja, com concentração de ligantes livres cada vez menor. Imagine a interação de ligantes na molécula de DNA, o que basicamente ocorre é que quando uma molécula do ligante se liga, a probabilidade de uma segunda molécula de se ligar aumenta, e assim sucessivamente, até a ocupação de todos os sítios livres da cadeia polimérica.

Podemos interpretar o coeficiente de Hill como um parâmetro que contabiliza o conceito de cooperatividade. Temos três situações: se $n > 1$, a cooperatividade é positiva, ou seja, uma molécula de ligante ligada aumenta a afinidade aparente do DNA para a ligação subsequente do ligante. Se $n < 1$, neste caso a interação é cooperativamente negativa e uma molécula de ligante ligada diminui a afinidade aparente do DNA para a ligação subsequente do ligante. Por último, se $n = 1$ a interação é não cooperativa e a afinidade é independente do número de moléculas ligantes previamente ligadas [56].

Dois pontos interessantes sobre este modelo são descritos aqui: o primeiro é que não se conhece na literatura interação DNA-ligante com cooperatividade negativa; e o segundo ponto diz que o modelo descrito por Hill para compreender a ligação do oxigênio

com a hemoglobina dentro dos glóbulos vermelhos obteve um valor de $n = 2,5$, que não era o esperado, já que a hemoglobina possui quatro sítios de ligação. Portanto, a nova interpretação para o coeficiente de Hill passou a ser como um limite inferior para o número de moléculas de ligante cooperantes envolvidas na reação, ou seja, que cooperam de modo efetivo [57, 58].

VIII Rotina experimental

8.1 Montagem experimental

A Figura 8.1 representa o esquema do aparato experimental utilizado em nossos experimentos, onde a região delimitada pelas linhas pontilhadas esboça o microscópio óptico invertido Nikon Eclipse Ti-U, com a óptica corrigida no infinito, além de uma objetiva com aumento de 100x e abertura numérica de 1,4, que focaliza o feixe de laser infravermelho responsável pelo aprisionamento das microesferas de poliestireno na região focal. Estas microesferas podem ser deslocadas por um piezoelétrico, modelo PI nano E-727, que está conectado a um computador responsável pelo controle com precisão nanométrica em três dimensões. O deslocador é montado sobre um estágio de controle manual que nos possibilita mover a amostra apenas nos eixos x e y.

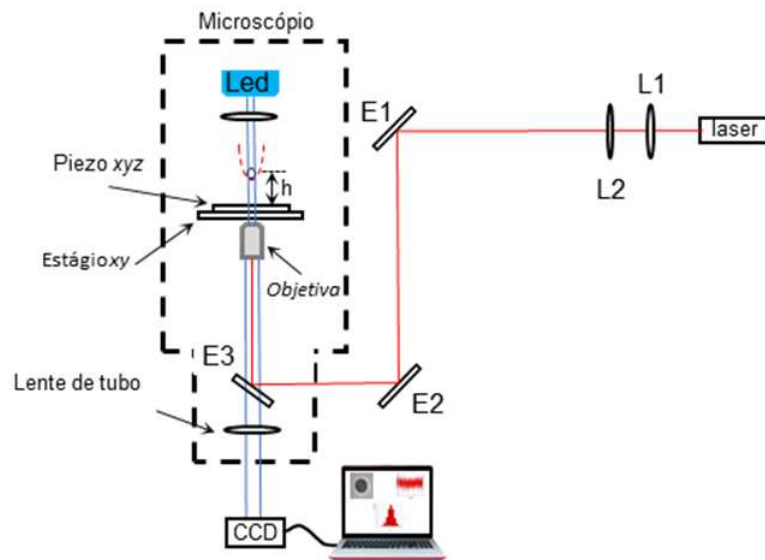


Figura 8.1 – Esquema do aparato experimental utilizado nas medidas [6].

Utilizamos um laser infravermelho (IV), modelo MIL-III (CNi Lasers, China), que possui a potência máxima de 2 W e o comprimento de onda de $\lambda = 1064$ nm. A radiação emitida passa por um conjunto de aparatos ópticos que alinha a pinça óptica para o aprisionamento. L1 e L2 são lentes responsáveis pela expansão do diâmetro e correção da divergência do laser, respectivamente, tornando-o cilíndrico. E1 e E2 são espelhos que ajustam o caminho óptico para o laser chegar ao microscópio.

O microscópio possui um espelho dicróico, E3, que seleciona a radiação desejada para chegar a objetiva, que aprisiona a microesfera a uma distância h da superfície da lamínula. A curva tracejada em vermelho representa o poço de potencial criado pela pinça

óptica. A imagem do experimento é transmitida por duas saídas do microscópio, onde conectamos duas câmeras CCD, modelo JAI-BM-500GE e JAI-CV-A50 IR, com taxa máxima de captura na ordem de 15 fps, frames por segundo, que encaminha as imagens até um monitor para visualização e para um computador que realizamos a análise dos dados. A calibração da pinça óptica pode ser encontrada em trabalhos anteriores [44,59].

8.2 Preparação da amostra

Para a realização dos experimentos precisamos que as duas pontas da molécula do λ -DNA (New Englan Biolabs) estejam fixas. Isto é possível construindo um porta-amostra que consiste de uma lamínula com uma espessura de aproximadamente 0,150 mm, em que um anel de borracha do tipo o-ring com diâmetro de 0,7 cm é colado com parafina em seu centro, como ilustrado na Figura 8.2. Posteriormente adicionamos a solução de microesfera de poliestireno com $3,0 \mu\text{m}$ de diâmetro (Bangs Laboratories, Inc.) recobertas com estreptavidina juntamente com o DNA do bacteriófago λ , um vírus que infecta a bactéria *E. Coli*.

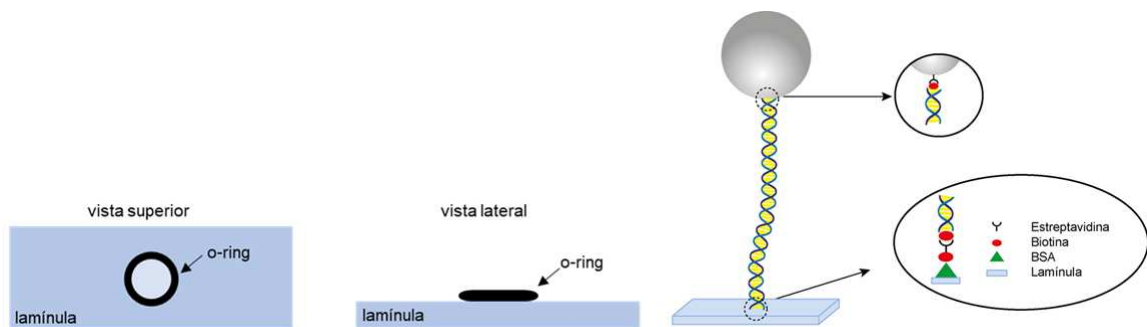


Figura 8.2 – Ilustração do porta-amostra utilizado nos experimentos, onde as duas pontas do λ -DNA estão presas, uma na lamínula previamente tratada e a outra na microesfera recoberta por estreptavidina [6].

Para a preparação desta solução, colocamos as microesferas de poliestireno recobertas com estreptavidina (Bangs labs) juntamente com o DNA biotilado, em que a biotina é um composto orgânico que possui alta afinidade com a estreptavidina, em um banho à 37°C ; para que uma das pontas do DNA se ligue a microesfera. O porta-amostra é recoberto com $20 \mu\text{L}$ da solução de proteína albumina de soro bovino biotilada (BSA-biot), na concentração de $1,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ e levado à luz ultravioleta por 20 minutos para evitar a proliferação de bactérias. Esta proteína interage com o vidro, já a vitamina biotina ficará exposta, para uma futura ligação com a proteína estreptavidina (STP), que é adicionada após a lavagem da BSA-biot com o tampão de magnésio (Tampão A). Ao adicionar $20 \mu\text{L}$ de STP na concentração de $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$, levamos novamente o porta-amostra à luz ultravioleta por 20 minutos. Ao finalizar este tempo, lavamos o porta-amostra com

solução salina tamponada com fosfato (PBS) para receber a solução de microesferas e DNA já no microscópio. Após um tempo de espera, as interações entre a microesfera, DNA e lamínula acontecem e devemos encontrar a configuração ideal para realização do experimento que está representada na Figura 8.2, onde uma extremidade da molécula de DNA está presa na microesfera e a outra na lamínula, sendo possível ser estirada pela pinça óptica.

8.3 Procedimento experimental

Na solução, podemos encontrar várias configurações possíveis, não apenas a ideal como mencionado anteriormente. Temos microesfera que executa movimento browniano, DNA com extremidades soltas, DNA grudado na lamínula e etc. Para encontrar a configuração ideal capturamos uma microesfera que escape do poço de potencial criado pela pinça e volte para a sua posição de equilíbrio, sabendo então que possui molécula de DNA. Ao atingir o objetivo, realizamos cinco medidas, das quais retiramos a média dos parâmetros mecânicos de interesse.

A medida é realizada ao movimentar o estágio piezoelétrico com uma velocidade de $v = 0,1 \mu\text{m/s}$, com uma força máxima de $F_{\text{pinça}} = 6 \text{ pN}$ como mostrado na Figura 8.3. Essa velocidade é suficientemente baixa para que o estiramento não perturbe o estado de equilíbrio infinitesimal, mantendo o regime quase-estático, e a força não quebre às ligações químicas do DNA. Os dados são obtidos via videomicroscopia e analisados no software ImageJ, no qual extraímos a posição do centro da microesfera em função do tempo, para obter a curva de força aplicada pelo deslocamento do estiramento, x_{DNA} que é ajustado pelo modelo Worm-Like chain de Marko e Siggia [45].

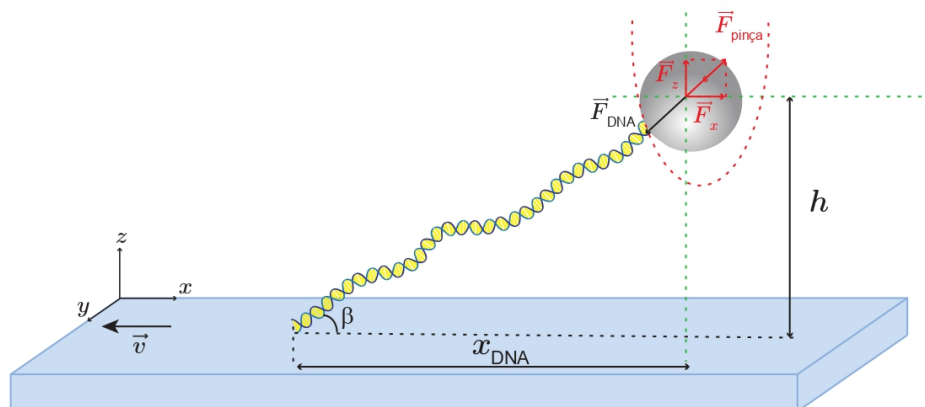


Figura 8.3 – Estiramento da molécula de DNA num regime quase-estático [6].

Note que precisamos ajustar a Equação 5.7, já que o estiramento está ocorrendo ao longo do eixo x . Usando regras básicas de trigonometria, temos

$$F_x = F \cos \beta = F \left(\frac{x_{DNA}}{z} \right) \quad (8.1)$$

e

$$z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}, \quad (8.2)$$

substituindo na Equação 5.7, encontramos

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}. \quad (8.3)$$

Ajustamos os dados obtidos com a Equação 8.3, e determinamos as propriedades mecânicas do polímero, onde o comprimento de contorno L_0 deve estar entre $14 \sim 21 \mu m$ e o comprimento de persistência entre $40 \sim 50 nm$ [60, 61].

Após realizarmos as medidas com o DNA puro, iniciamos as trocas de alíquotas, que são concentrações do ligantes desejados dentro do tampão. Na troca, removemos o quanto é possível da solução presente no interior do o-ring e inserimos a alíquota. Repetimos este processo várias vezes para garantir a homogeneização e o alcance da concentração desejada. Esperamos um tempo de reação do ligante com a molécula de DNA e realizamos as cinco medidas novamente para extrair os novos comprimentos de contorno e persistência do complexo DNA-ligante. Outras alíquotas são trocadas em concentrações crescentes e realizamos o mesmo processo; de modo a obter uma curva de propriedades mecânicas por concentrações no final.

Ao encontrar DNA com as propriedades mecânicas de interesse, introduzimos 2 mM de cafeína na amostra, que permaneceu constante durante todo o experimento. Esperamos por 30 min para atingir o equilíbrio termodinâmico, realizamos os estiramentos. Em seguida, um composto à base de platina foi escolhido e inserida na amostra em concentrações crescentes, e os parâmetros mecânicos foram determinados para cada uma dessas concentrações escolhidas. Aguardamos pelo menos 30 min para ocorrer o equilíbrio termodinâmico entre o composto e o DNA após a troca de cada concentração. Depois, traçamos os valores de comprimento de persistência e comprimento de contorno dos complexos formados (DNA-cafeína-fármaco de platina) em função da concentração do fármaco para cada um dos quatro fármacos testados: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e transplatina.

IX Modelo *quenched-disorder*

Para retirar os parâmetros físico-químicos dos dados experimentais do comprimento de persistência em função da concentração do fármaco, um modelo fenomenológico simples proposto por Rocha considera a molécula de DNA parcialmente recoberta de moléculas de ligantes ao longo de sua estrutura, como uma associação de molas entrópicas em série [62].

Vamos considerar a associação em série de n molas entrópicas com comprimentos de persistências $A_0, A_1, A_2, \dots, A_{n-1}$ que resulta em uma mola entrópica efetiva de comprimento de persistência efetivo dado por

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f_0(r)}{A_0} + \frac{f_1(r)}{A_1} + \frac{f_2(r)}{A_2} + \dots, \quad (9.1)$$

onde a função $f_i(r)$ é probabilidade de encontrar uma mola entrópica ao longo do comprimento do contorno com um comprimento de persistência local A_i (note que são funções que dependem da fração do ligante ligado r) [57, 63].

Sabemos da literatura que ligantes induzem comportamentos monotônicos do comprimento de persistência em função da concentração do fármaco na molécula de DNA. Para descrever este comportamento, vamos considerar no modelo apenas duas molas entrópicas que possuem apenas um sítio de ligação [64–66]. Aqui, consideramos um sítio como sendo o lugar efetivamente ocupado por uma única molécula de ligante, ou por um agregado de moléculas, caso a cooperatividade seja positiva.

Uma mola entrópica representa o DNA puro, com comprimento de persistência local A_0 e a outra representando a estrutura local formada pela molécula ligante ligada ao DNA, com comprimento de persistência local A_1 . Portanto, a Equação 9.1 fica,

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f_0(r)}{A_0} + \frac{f_1(r)}{A_1}. \quad (9.2)$$

Precisamos encontrar as distribuições de probabilidade dos ligantes ligados associados aos comprimentos de persistência local. A probabilidade do sítio estar ocupado por um ligante é x com o comprimento de persistência local A_1 . Onde $x = r/r_{max}$ é a fração de sítios ligados normalizada.

Já a probabilidade de encontrar o sítio desocupado é $1 - x$, como o comprimento de persistência A_0 . Portanto, o comprimento de persistência efetivo da Equação 7.1, pode ser reescrito como

$$\frac{1}{A_E} = \frac{1 - x}{A_0} + \frac{x}{A_1}, \quad (9.3)$$

onde $x = r/r_{max}$ pode ser conectado a uma isoterma de ligação. Este é o modelo *quenched-*

disorder de um sítio que pode ser usado para ajustar o comprimento de persistência determinado experimentalmente em função da concentração do fármaco, retornando os parâmetros de ligação que caracterizam as interações. Para nossos experimentos, estes dados foram obtidos utilizando a isoterma de Hill (Equação 7.14) que pode ser expressa como

$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n}. \quad (9.4)$$

Fazendo o uso do vínculo $C_f = C_T - r C_{bp} = C_T - r_{max} C_{bp} x$ na isoterma de ligação de Hill, obtemos

$$x = \frac{[K_i (C_T - r_{max} C_{bp} x)]^n}{1 + [K_i (C_T - r_{max} C_{bp} x)]^n}, \quad (9.5)$$

que pode ser conectada a Equação 9.3 para nos fornecer os parâmetros físico-químicos ao medir as propriedades mecânicas da molécula de DNA.

A Equação 9.5 pode ser resolvida numericamente retornando x para cada valor de C_T . Para isto é necessário um algoritmo que ajuste melhor a equação para valores quaisquer dos parâmetros físico-químicos, considerando as concentrações dos ligantes estudados nos experimentos, retornando ao final melhores valores para x . Estes valores são inseridos na Equação 9.3, e ajustados aos dados experimentais da variação do comprimento de persistência pela concentração de ligantes, satisfazendo os critérios para a convergência do método dos mínimos quadrados. Ao final o algoritmo nos fornece os parâmetros físico-químicos dos complexos DNA-ligantes, além do comprimento de persistência A_0 , A_1 e A_2 .

X Resultados

10.1 Resultados obtidos da pinça óptica

A Figura 10.1 mostra algumas curvas de força-extensão representativas para um complexo de DNA formado com uma platina específica (10.1a cisplatina, 10.1b carboplatina, 10.1c oxaliplatina e 10.1d transplatina) obtidas para a concentração constante de 2 mM de cafeína e concentrações de platinas indicadas nas legendas. As linhas contínuas são ajustes de alta precisão do modelo worm like-chain, do qual foram determinados os comprimentos de persistência e o comprimento de contorno.

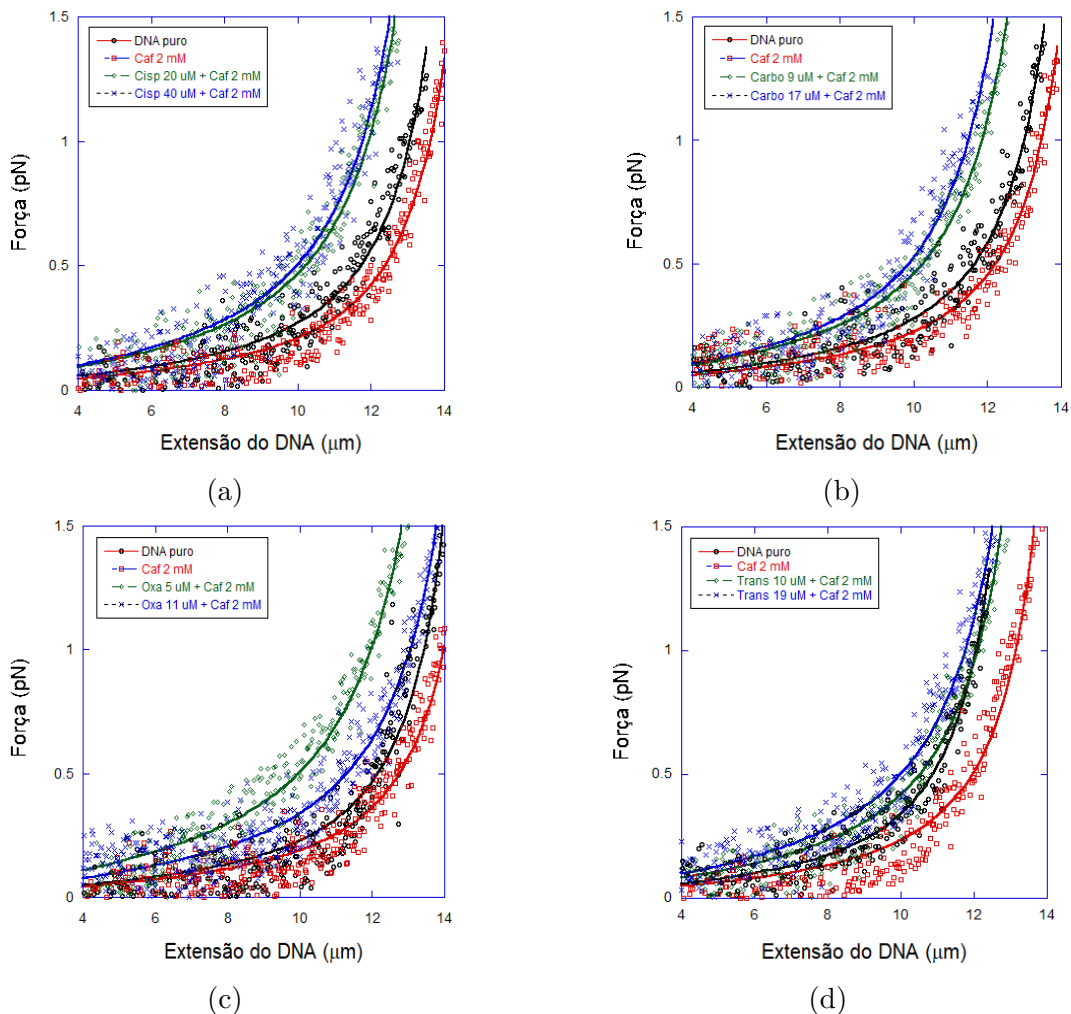


Figura 10.1 – Curvas de força-extensão representativas para um determinado complexo de DNA formado com (a) cisplatina, (b) carboplatina, (c) oxaliplatina e (d) transplatina, obtidas para as concentrações de cafeína e os compostos de platina indicadas nas legendas. As linhas contínuas são ajustes à equação de Marko-Siggia, de onde os parâmetros mecânicos (persistência e comprimentos de contorno) foram determinados.

A Figura 10.2 mostra os dados de comprimento de persistência obtidos para os complexos DNA-cisplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), sendo que o DNA foi previamente tratado com 2 mM de cafeína. Fazemos uma comparação dos dados com aqueles obtidos sem o uso da cafeína na amostra originalmente obtidos da referência [7](quadrados abertos no inset).

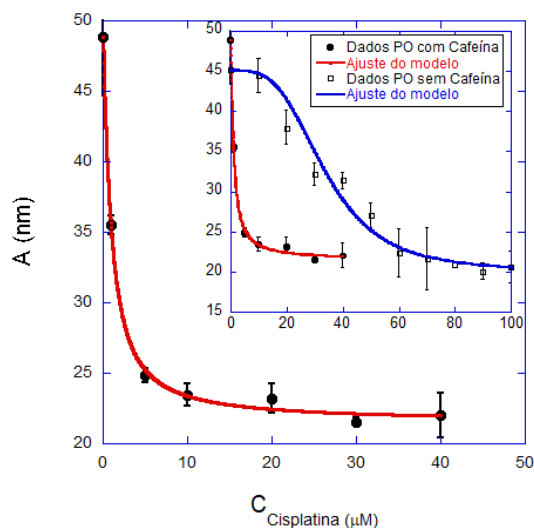


Figura 10.2 – Dados de comprimento de persistência obtidos para complexos de DNA cisplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), sendo o DNA previamente tratado com cafeína a 2 mM. O inset mostra uma comparação desses dados com os equivalentes obtidos sem o uso de cafeína na amostra (quadrados abertos), originalmente obtidos na referência [7]. As linhas sólidas são ajustes ao modelo *quenched-disorder* para o comprimento de persistência, a partir do qual se pode obter o parâmetros de ligação da interação em cada situação.

As linhas sólidas são ajustes do modelo *quenched-disorder* para o comprimento de persistência, do qual retiramos os parâmetros de ligação das interações que estão mostrados na Tabela 10.1, juntamente com os resultados obtidos para os outros fármacos estudados neste trabalho para fins de comparação. [56, 57].

Observe que concentrações crescente da cisplatina induzem uma diminuição monotônica no comprimento de persistência dos complexos formados. Este comportamento ocorre exclusivamente devido à cisplatina, pois a cafeína induz um efeito contrário, aumentando o comprimento de persistência da molécula de DNA nas condições experimentais utilizadas, ou seja, com 2 mM de cafeína e uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) com $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ [67].

Podemos tirar algumas conclusões da comparação dos gráficos de comprimento de persistência em função da concentração crescente de cisplatina com (linha vermelha) e sem (linha azul) cafeína. Observe que na presença de cafeína na amostra, o comprimento

Fármacos	Cafeína	K (M ⁻¹)	n
cisplatina	2 mM	$(6.5 \pm 1.0) \times 10^5$	1 (fixo)
carboplatina	2 mM	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	1 (fixo)
oxaliplatina	2 mM	$(9.6 \pm 1.5) \times 10^5$	1 (fixo)
transplatina	2 mM	$(5.2 \pm 1.0) \times 10^4$	1 (fixo)
cisplatina	0	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^4$	3.4 ± 0.4 [7]
carboplatina	0	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^4$	5.1 ± 0.7 [8]
oxaliplatina	0	$(4.0 \pm 0.7) \times 10^4$	1.0 ± 0.2 [9]
transplatina	0	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^3$	1.0 ± 0.1 [10]

Tabela 10.1 – Parâmetros de ligação obtidos dos ajustes do modelo para os quatro fármacos de platina testados que interagem com DNA sob 2 mM de cafeína. Os resultados equivalentes para a situação sem cafeína, obtidos em trabalhos anteriores [7–10], também são mostrados para fins de comparação. K é a constante de ligação da associação de equilíbrio e n é o expoente de Hill, que mede a cooperatividade das reações de ligação.

de persistência do complexo DNA-cisplatina satura em concentrações mais baixas do fármaco. Tiramos como conclusão que a cafeína funciona como um catalisador da ligação DNA-cisplatina, já que é uma molécula que aumenta a eficiência desta interação. De fato a cafeína aumenta a constante de ligação de associação efetiva, K, da interação. Da referência [7] sabemos que $K = (2,4 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para o caso em que a amostra não possui cafeína. Para nossos experimentos com 2 mM de cafeína, encontramos uma constante de equilíbrio igual a $K = (6,5 \pm 1,0) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Observe que o valor de K aumentou cerca de $\sim 27\times$ na presença de cafeína. Em outras palavras, a cafeína aumenta a afinidade efetiva da cisplatina ao DNA em mais de uma ordem de grandeza quando 2 mM de cafeína foi utilizada em nossas condições experimentais.

Note também que a curva perde sua forma sigmoideal quando o alcalóide está presente. Este formato da curva está fortemente ligado ao grau de cooperatividade da interação [56, 57]. Para o caso em que há ausência de cafeína, o ajuste nos retorna o expoente de Hill de aproximadamente 3,4 (referência [7]), mostrando que a interação da cisplatina com o DNA na ausência da cafeína é cooperativa, pois o expoente é maior que a unidade. O melhor ajuste em nossos dados com 2 mM de cafeína retorna um expoente de Hill igual à unidade, mostrando que a interação da cisplatina com o DNA não é mais cooperativa na presença do alcalóide.

O comportamento do aumento do valor de k e do expoente de Hill unitário (não cooperatividade) ao adicionar a cafeína na amostra foram recorrentes para os demais fármacos à base de platina testadas em nosso trabalho, conforme apresentaremos nas figuras seguintes. A interpretação completa desses resultados será discutida em detalhes na seção de discussões.

A Figura 10.3 mostra os dados do comprimento de persistência obtidos para o complexo DNA-carboplatina em função do aumento concentração do fármaco na amostra

(círculo preto) em que o DNA foi previamente tratado com 2 mM de cafeína.

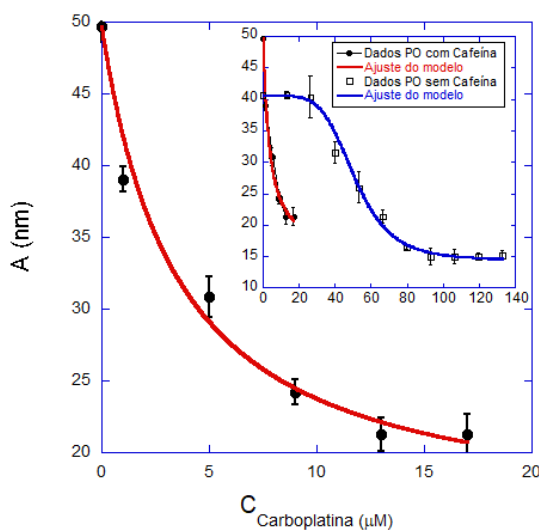


Figura 10.3 – Gráfico dos dados de comprimento de persistência (A) obtidos para complexos DNA-carboplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), tendo o DNA sido previamente tratado com cafeína a 2mM. O inset mostra uma comparação de tais dados com o equivalente obtido sem o uso de cafeína na amostra (quadrados abertos), originalmente obtido na referência [8]. As linhas sólidas são ajustes ao modelo *quenched-disorder* para o comprimento de persistência, de onde se pode obter os parâmetros de ligação da interação em cada situação.

Note que o comportamento da curva é semelhante ao da cisplatina quando o alcalóide foi adicionado a amostra, em que há a perda de cooperatividade entre a ligação da carboplatina na molécula de DNA e existe um aumento da afinidade efetiva, pois a saturação acontece para menores concentrações da carboplatina na presença da cafeína.

Do ajuste obtido dos dados, mostrados na Tabela 10.1, notamos que a constante de equilíbrio de associação, K , aumentou cerca de $\sim 7,5\times$ quando a cafeína estava presente na amostra em comparação aos resultados para a amostra sem o alcalóide originalmente obtidos da referência [8]. Já o expoente de Hill diminuiu de ~ 5 sem cafeína para 1 quando a cafeína foi adicionada, portanto a reação é não cooperativa, ou seja, a ligação de uma molécula não influencia na ligação da próxima.

Na Figura 10.4 mostramos o gráfico do comprimento de persistência para as concentrações de oxaliplatina, onde o DNA já havia sido tratado com 2 mM de cafeína. O resultado do ajuste dos dados (Tabela 10.1) nos mostrou que a cafeína aumentou a constante de associação de equilíbrio cerca de $\sim 24\times$ em comparação aos dados com apenas oxaliplatina e DNA na amostra obtidos da referência [9]. Mas para o caso da oxaliplatina, a cooperatividade já não existia na ausência da cafeína (formato da curva é não sigmoide) mantendo este mesmo comportamento com 2 mM do alcalóide, ou seja, o coeficiente de Hill do ajuste para ambos os casos é unitário.

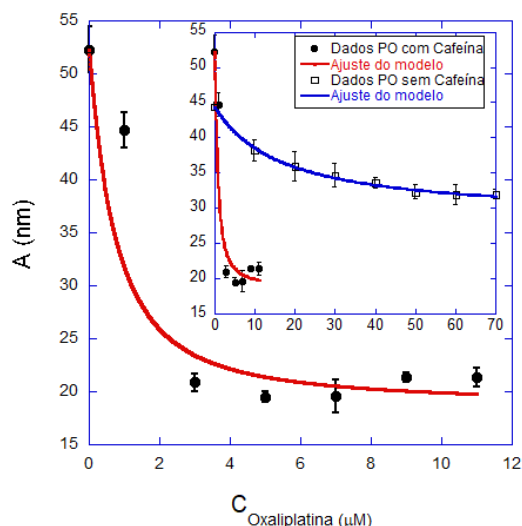


Figura 10.4 – Gráfico dos dados de comprimento de persistência (A) obtidos para complexos DNA-oxaliplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), tendo o DNA sido previamente tratado com cafeína a 2 mM. O inset mostra uma comparação de tais dados com o equivalente obtido sem o uso de cafeína na amostra (quadrados abertos), originalmente obtido na referência [9]. As linhas sólidas são ajustes ao modelo quenched-disorder para o comprimento de persistência, de onde se pode obter os parâmetros de ligação da interação em cada situação.

Por fim, a Figura 10.5 mostra os dados para o comprimento de persistência em função da concentração da transplatina, o isômero trans da cisplatina, neste caso o DNA também havia interagido com 2 mM de cafeína.

A constante de associação de equilíbrio passou de $K = (1,8 \pm 0,2) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para os dados sem a cafeína obtidos da referência [10], para $K = (5,2 \pm 0,6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ao adicionar 2 mM de cafeína. Portanto, a constante de ligação aumentou cerca de $\sim 29\times$, melhorando a afinidade de ligação até para o isômero trans que era considerado inativo em tratamentos quimioterápicos, enquanto o expoente de Hill permaneceu unitário em ambos os casos para um melhor ajuste dos dados.

Para concluir os resultados da pinça óptica, a Figura 10.6 apresenta os dados do comprimento de contorno em função da concentração crescente de cada platina. Note que o comprimento de contorno foi normalizado pelo comprimento médio do contorno dos complexos DNA-cafeína obtidos sem qualquer fármaco de platina na amostra.

Podemos observar que para os dados da cisplatina (círculo vermelho), carboplatina (quadrado azul) e oxaliplatina (losango verde), o comprimento de contorno permanece constante à medida que os fármacos se ligam à dupla hélice do DNA. No caso da transplatina (triângulo preto) tal parâmetro mecânico apresenta um decréscimo inicial muito leve, aumentando para concentrações maiores do fármaco.

O comportamento do comprimento de contorno dos complexos DNA-platina verificado para os três primeiros fármacos (cisplatina, carboplatina, e oxaliplatina) é quali-

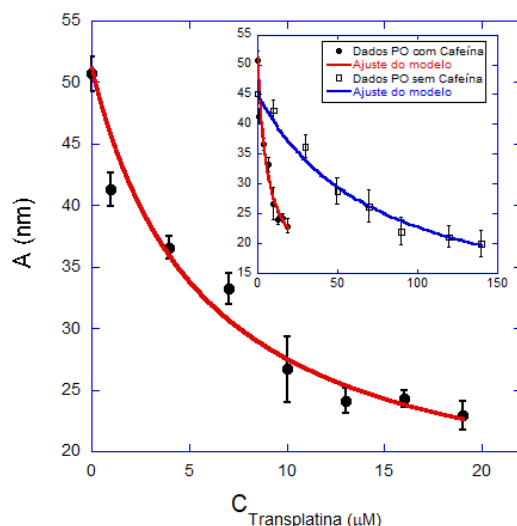


Figura 10.5 – Gráfico dos dados de comprimento de persistência obtidos para complexos DNA-transplatina em função da concentração do fármaco na amostra (círculos pretos), tendo o DNA sido previamente tratado com cafeína a 2 mM. O inset mostra uma comparação de tais dados com o equivalente obtido sem o uso de cafeína na amostra (quadrados abertos), originalmente obtido na referência [10]. As linhas sólidas são ajustes ao modelo *quenched-disorder* para o comprimento de persistência, de onde se pode obter os parâmetros de ligação da interação em cada situação.

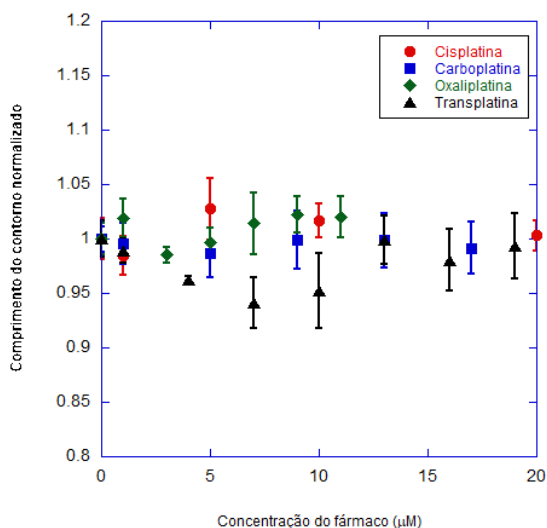


Figura 10.6 – Gráfico dos dados de comprimento do contorno (normalizado pelo comprimento médio do contorno dos complexos DNA-cafeína obtidos sem qualquer droga de platina na amostra) dos mesmos complexos de DNA formados com os quatro fármacos à base de platina estudados aqui, com cafeína fixada em 2 mM na amostra. Observe que tal parâmetro mecânico permanece constante à medida que os fármacos se ligam à dupla hélice do DNA para cisplatina, carboplatina e oxaliplatina e apresenta uma ligeira diminuição seguida de um aumento subsequente para a transplatina.

tativamente diferente dos resultados obtidos em trabalhos anteriores como mostrado na Figura 10.7a, na ausência de cafeína na amostra. Para estes casos, o comprimento de contorno dos complexos DNA-platinas em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) com $[Na] = 150$ mM apresentou uma ligeira diminuição monotônica, em torno de $\sim 10-16$ % do comprimento inicial. Esta diminuição se deve ao fato que os fármacos à base de platinas formam ligações intrafitas (diadutos) na dupla hélice do DNA, aproximando segmentos distintos, promovendo a aproximação da molécula. Ao aumentar a concentração do fármaco, mais ligações acontecem de modo a compactar a molécula de DNA. Então, concluímos que com a presença da cafeína na amostra, estas ligações não ocorrem, mantendo o comprimento de contorno constante (Figura 10.6).

Comparando os dados da Figura 10.6 e o dados obtidos da referência [10], mostrados na Figura 10.7b para a transplatina, notamos que o comportamento qualitativo é semelhante com ou sem o alcalóide na amostra. No entanto, o decréscimo máximo verificado para o parâmetro na presença da cafeína é menor, embora dentro da barra de erro. Isto indica que a transplatina ainda é capaz de formar ligações intrafitas ao longo do comprimento da molécula de DNA, mesmo com a adição de 2 mM de cafeína. Para maiores concentrações verificamos um aumento do comprimento de contorno devido ao rearranjo das ligações das moléculas de transplatina para alcançar uma maior estabilidade através de ligações interfitas.

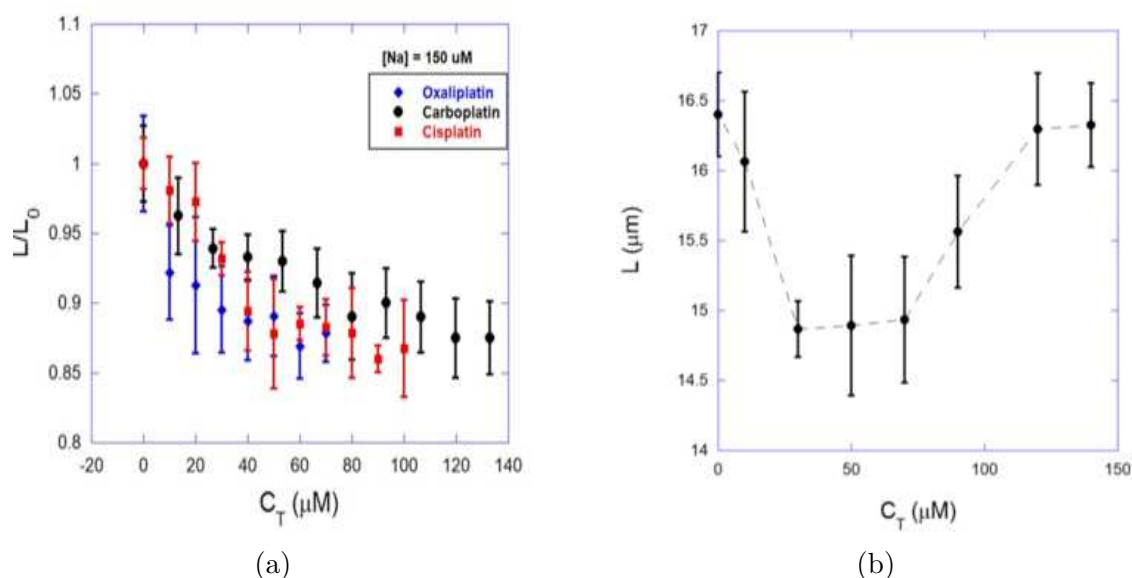


Figura 10.7 – (a) Comprimento de contorno em função das concentrações da oxaliplatina (losango azul), carboplatina (círculo preto), cisplatina (quadrado vermelho), em PBS= 150 mM, dados obtidos originalmente das referências [7–9] . (b) Comprimento de contorno em função das concentrações de transplatina em em PBS= 150 mM, dados obtidos originalmente da referência [10].

10.2 Resultados obtidos da espectroscopia UV-VIS

A espectroscopia UV-VIS foi utilizada como uma técnica experimental complementar para compreensão dos dados obtidos pela técnica de pinça óptica mencionados na seção 10.1. O intuito era avaliar se existe uma interação relevante entre a cafeína e os fármacos de platina em solução com PBS =150 mM (sem a molécula de DNA). Nossa análise foi realizada para a cisplatina, e generalizada para os demais fármacos à base de platina, devido a semelhança das estruturas químicas.

Primeiramente, estudamos a concentração de cisplatina fixa em $500 \mu\text{M}$ enquanto a da cafeína variou de 1 a $10 \mu\text{M}$ para temperatura ambiente e $pH = 7,4$ na solução. Os espectros de absorbância por comprimento de onda para os resultados estão mostrados na Figura 10.8a. Note que a presença da cafeína alterou o espectro de absorção da cisplatina, deslocando o pico principal para comprimentos de onda mais altos e aumentando muito a absorbância desse pico, indicando uma interação significativa entre a cafeína e a cisplatina.

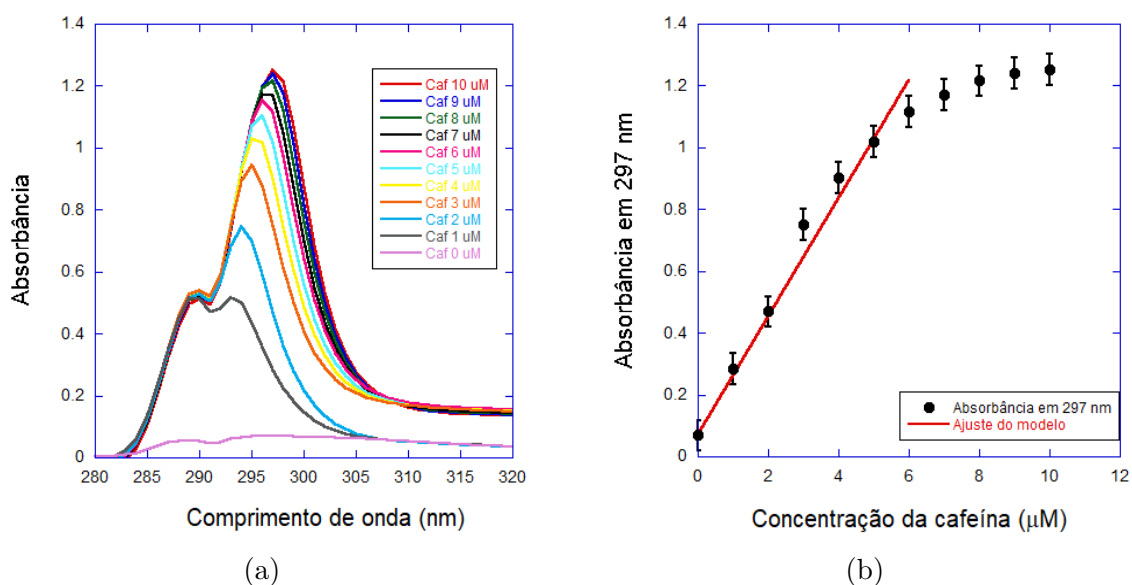


Figura 10.8 – (a) Absorbância para várias concentrações diferentes de cafeína em função do comprimento de onda de absorção, mantendo a concentração de cisplatina fixada em $500 \mu\text{M}$. (b) valores de absorbância em 297 nm para várias concentrações diferentes de cafeína, obtidos a partir dos dados do painel 10.8a. A linha sólida vermelha é um ajuste ao modelo proposto, que permite estimar a constante de ligação de equilíbrio entre os dois compostos.

Para estimar a constante de ligação de equilíbrio para a interação entre a cisplatina e a cafeína, escolhemos um comprimento de onda e analisamos a absorbância em função da concentração de cafeína. A Figura 10.8(b) mostra o resultado obtido para o comprimento de onda em 297 nm. Observe que a absorbância aumenta linearmente com a concentração de cafeína para valores menores que $6 \mu\text{M}$, desviando para concentrações maiores. A constante de ligação de equilíbrio, K_{CC} pode ser estimada supondo por simplicidade uma ligação um-para-um entre a cisplatina e cafeína, de modo que K_{CC} pode ser escrito como

$$K_{cc} = \frac{C_{cc}}{C_{caf}^f C_{cisp}^f}, \quad (10.1)$$

onde C_{cc} é a concentração do complexo cisplatina-caféina formado e C_{caf}^f e C_{cisp}^f são as concentrações de caféina e cisplatina livres em solução, respectivamente.

Usando a lei de Beer-Lambert (Equação 4.12), podemos escrever a absorvância (Abs) da solução como

$$Abs = \sum \epsilon_x LC_x, \quad (10.2)$$

onde ϵ_x e C_x são a absorvância molar e a concentração da espécie x em solução, e L é o comprimento da cubeta utilizada (1 cm no presente caso). Assim,

$$Abs = \epsilon_{cis} LC_{cis} + \epsilon_{caf} LC_{caf} + \epsilon_{cc} LC_{cc}, \quad (10.3)$$

usando as condições $C_x^0 = C_x^f - C_{cc}$ para a cisplatina e caféina, onde C_x^0 é a concentração total adicionada na preparação da amostra da espécie x, e o fato que a concentração total de cisplatina é muito maior que a da caféina em nosso sistema ($C_{cisp}^0 \gg C_{caf}^0$), encontramos que

$$Abs \sim \epsilon_{cis} LC_{cisp}^0 + (\epsilon_{cc} - \epsilon_{cisp}) L \frac{K_{cc} C_{cisp}^0 C_{caf}^0}{1 + K_{cc} C_{cisp}^0}. \quad (10.4)$$

Observe que usando a aproximação $C_{cisp}^0 \gg C_{caf}^0$, a absorvância medida deve crescer linearmente com a concentração total na amostra. Analisando os dados da Figura 10.8b, notamos que essa região corresponde a concentrações de caféina menores que 6 μM . Usando a Equação 10.4 para ajustar os dados (linha vermelha), estimamos a constante de ligação de equilíbrio da ligação: $K_{CC} \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$. Este resultado é encontrado mesmo se não negligenciarmos o termo da absorvância molar da caféina pura da Equação 10.3.

Outro experimento de espectroscopia UV-VIS foi realizado para confirmar este resultado. Neste caso, mantivemos a concentração de caféina fixa em 2 mM em solução, e adicionamos concentrações crescentes de cisplatina variando de 1 a 100 μM , como mostrado na Figura 10.9. Para este caso, note que a absorvância diminui com aumento de cisplatina na amostra.

Para estimar a constante K_{CC} dos dados do experimento, utilizamos a condição de que a concentração total de caféina é muito maior que a concentração da cisplatina ($C_{caf}^0 \gg C_{cisp}^0$) e analisamos os dados no comprimento de onda em 290 nm para o caso em que a curva se comporta linearmente (Figura 10.9b). Portanto, encontramos do ajuste proposto a constante de ligação de equilíbrio da reação: $K_{CC} \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Os valores encontrados para K_{CC} são relativamente altos em comparação a interações com a cisplatina e a molécula de DNA, indicando uma interação forte entre as moléculas de cisplatina e caféina em solução.

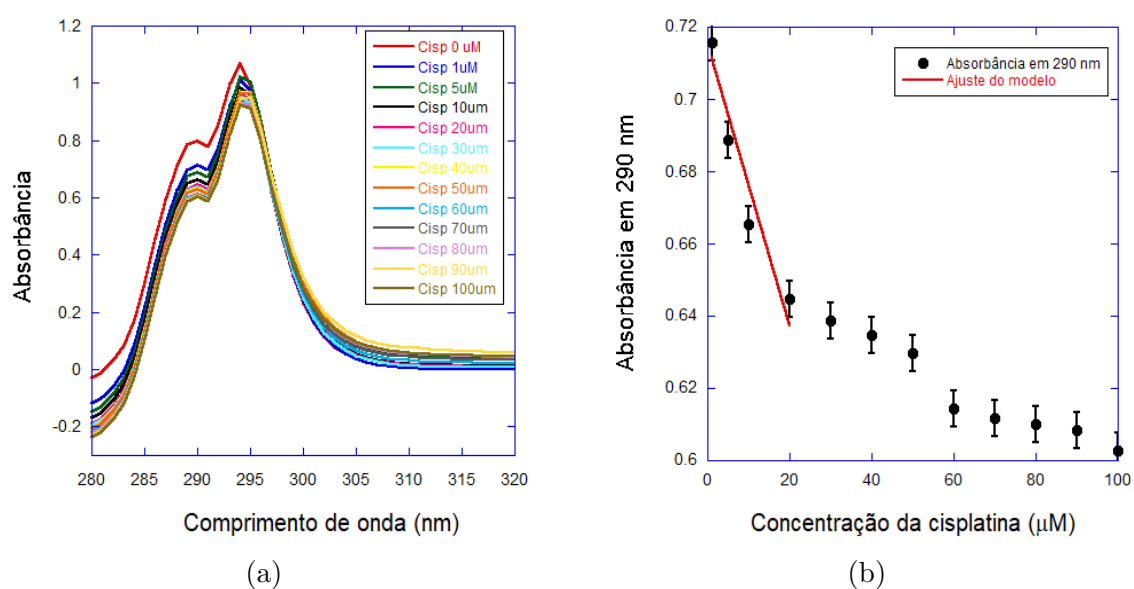


Figura 10.9 – (a) Absorbância para várias concentrações diferentes de cisplatina em função do comprimento de onda de excitação, mantendo a concentração de cafeína fixada em 2 mM. (b) valores de absorbância a 290 nm para várias concentrações diferentes de cisplatina, obtidos a partir dos dados 10.9a. A linha vermelha é um ajuste ao modelo proposto, que permite estimar a constante de ligação de equilíbrio entre os dois compostos.

XI Discussões

Concluimos dos dados de comprimento de persistência para os complexos de DNA formados com os quatro fármacos de platina, com o ajuste realizado do modelo *quenched-disorder* que na presença de cafeína há uma maior afinidade efetiva de todos os compostos de platina com a molécula de DNA, aumentando a constante de ligação de associação de equilíbrio em $\sim 7,5\times$ para a carboplatina e $\sim 24-29\times$ para os outros fármacos. Além de observar a perda da forma sigmoidal da curva, mostrando que não há mais cooperatividade para a interação do DNA com a cisplatina e a carboplatina na presença do alcalóide.

Dos dados de comprimento de contorno, mostrados no gráfico 10.6, correspondentes para os complexos DNA-platina, notamos que a presença da cafeína anula a maior parte das ligações intrafitas ao longo do comprimento de contorno da dupla hélice do DNA.

Da referência [67] sabemos que a cafeína se liga nas fendas maiores e menores da dupla hélice, aumentando o comprimento de contorno e de persistência na concentração utilizada neste trabalho (2 mM), além de desidratar o polímero. Um elevado número de moléculas do alcalóide irão impor restrições espaciais ao longo da cadeia polimérica, dificultando a ligação intrafitas (diadutos) dos compostos de platinas em pares de bases distintos do DNA.

Para compreender melhor os dados obtidos investigamos a interação direta entre a cafeína e os fármacos de platina em solução contendo apenas PBS= 150 mM, sem DNA, usando a técnica de espectroscopia de absorção UV-VIS, em que concluimos que existe uma interação direta entre a cafeína e as moléculas dos compostos de platina. Devido à semelhança da estrutura química do alcalóide com as bases purinas da molécula de DNA, notamos que os fármacos de platina também possuem uma grande afinidade química com a cafeína.

É importante lembrar que todos os fármacos de platina possuem dois sítios disponíveis para ligações covalentes independentes com as bases de DNA depois de sofrer a hidrolisação em meio intracelular. Com o resultado obtido pelas amostras UV-VIS, sabemos que a cafeína interage com as moléculas de platina, provavelmente deixando apenas um sítio da molécula disponível para se ligar ao DNA. Isto explica o fato das ligações intrafitas dos fármacos de platina terem sido suprimidas na presença da cafeína.

Portanto, o fato das ligações intrafitas serem suprimidas quando a cafeína é previamente ligada ao DNA explica o motivo do comprimento de contorno permanecer constante com a adição crescente das concentrações para os três fármacos (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) e mudam menos para transplatina, como mostrado na Figura 10.6, pois as ligações intrafitas tendem a aproximar diferentes segmentos da cadeia polimérica resultando em uma compactação efetiva [68, 69]. A transplatina possui uma distância maior

entre os dois sítios que se ligam covalentemente aos pares de base do DNA, possuindo uma probabilidade ligeiramente maior de encontrar sítios disponíveis para ocorrer as ligações intrafitas, explicando o comportamento de pequena diminuição do comprimento de contorno para as concentrações iniciais. Observe que para maiores concentrações de transplatina o comprimento de contorno aumenta novamente, isto acontece pois as ligações intrafitas não são mais estáveis para essas concentrações, e um rearranjo do comprimento de contorno acontece para ligações interfitas estáveis [10].

Note que a perda da cooperatividade das ligações da cisplatina e carboplatina como o DNA pode ser compreendida também pelo fato das ligações de intrafitas diminuírem. De fato, para interações desses compostos com o DNA, a cooperatividade surge devido a compactação do DNA imposta pelas ligações intrafitas de longo alcance formadas ao longo da cadeia polimérica, pois tal efeito aumenta a probabilidade de formar ainda mais dessas ligações devido ao aumento da proximidade dos segmentos. Ou seja, a perda da compactação do DNA dificulta a cooperatividade das reações de ligações dos fármacos de platina.

Os nossos dados não provam a existência das ligações de intrafitas e interfitas dos compostos de platinas na molécula de DNA, porém elas foram amplamente estudadas por várias técnicas experimentais. Podemos verificar suas existência através da espectroscopia de força de molécula única (pinça óptica) realizados no regime entálpico de alta força, como descrito nas referências [8, 9].

Para concluir nossa análise, classificamos a cafeína como um agente catalisador alostérico que modifica a afinidade efetiva do DNA com os fármacos de platina, quando ligada previamente ao DNA em solução, aumentando significativamente a constante de ligação de equilíbrio entre eles, como mostrado na Tabela 10.1; embora um estudo microscópico em nível de pares de bases ainda seja necessário para avançar na compreensão deste efeito.

Muitos estudos relataram que a cafeína aumenta a eficácia dos compostos a base de platinas em matar células cancerosas em cultura e em tratamento de tumores reais *in vivo* [14, 15, 70, 71]. Neste trabalho, trazemos novas informações físico-químicas das interações envolvidas medidas em ensaios simples realizados em nível molecular, independente da complexidade do ambiente intra-celular.

Um fato interessante é que a propriedade que a cafeína possui de aumentar a ligação dos fármacos de platina com o DNA não se reproduz quando o o alcalóide é utilizado junto com fármacos que intercalam na dupla hélice do DNA, como no caso do brometo de etídio [72]. Neste último caso, a cafeína dificulta a interação destes compostos para ligar com DNA em solução, diminuindo a concentração efetiva desses compostos capazes de intercalar com o DNA. Isto mostra que mais estudos sobre a papel da cafeína para modular a ligação de outros fármacos ao DNA se faz necessário para trazer melhorias em tratamentos quimioterápicos atuais e futuros.

XII Conclusões

Neste trabalho realizamos o estudo da interação dos complexos DNA, cafeína e um fármaco à base de platina, em uma amostra simples contendo uma solução salina tamponada com fosfato, sendo estudado no final quatro fármacos: cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e transplatina, através da espectroscopia de molécula única e UV-VIS. O principal interesse foi verificar o papel explícito da físico-química das interações envolvidas na conhecida propriedade da cafeína no aumento da toxicidade dos fármacos de platina dentro de células reais, já mencionado na literatura para a cisplatina.

Nossos resultados mostram que esse efeito promovido pelo alcalóide pode ocorrer, já fora do ambiente celular complexo, pois a cafeína aumenta a constante de ligação de equilíbrio efetiva medida para as interações do DNA com os quatro fármacos de platina estudados, e também altera o comportamento cooperativo associado às interações entre o DNA e a cisplatina e carboplatina.

De modo que, nossos experimentos mostraram com a técnica de pinça óptica juntamente com a UV-VIS, que para o estudo de moléculas únicas já existe uma interações significativa entre o complexo DNA-platinas e a cafeína. Observe que este resultado é muito promissor, pois nos fornece mais informações além das já estudadas em cultura de células, como mencionado na literatura. Ou seja, com estes dados e com mais estudos, acreditamos que problemas que antes estavam presentes no tratamento de câncer, como a resistência ao medicamento e os efeitos colaterais, podem ser reduzidos ou até mesmo acabar, melhorando a eficiência dos fármacos à base de platinas.

Podemos considerar que tal efeito parece ser geral para os fármacos à base de platina porque as mesmas foram alcançadas para os quatro fármacos clássicas desses compostos.

Note que, nossos dados não fornecem de forma direta como as ligações moleculares ocorrem. Assim, novos estudos em nível molecular são necessários para compreender melhor como as ligações ocorrem, qual átomo liga em qual. Mas dos resultados do comprimento de persistência e do comprimento de contorno, e das informações retiradas deles, mostramos que existe estas ligações que podem ser obtidas por outras técnicas experimentais, como a espectroscopia Raman, por exemplo.

Como conclusão, este trabalho apresenta novas perspectivas sobre O mecanismos de ação envolvendo a combinação de fármacos de platina e cafeína para aplicações quimioterápicas.

XIII Artigo publicado

Artigo publicado: "Caffeine Enhances the Toxicity of Platinum-Based Drugs at the Molecular Level Even Outside of the Intracellular Environment: A Single-Molecule Force Spectroscopy Study".

DOI URL: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c01553>

THE JOURNAL OF
PHYSICAL
CHEMISTRY **B**
A JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

pubs.acs.org/JPCB

Article

Caffeine Enhances the Toxicity of Platinum-Based Drugs at the Molecular Level Even Outside of the Intracellular Environment: A Single-Molecule Force Spectroscopy Study

Rayane M. de Oliveira, Tiago A. Moura, and Márcio S. Rocha*

Cite This: *J. Phys. Chem. B* 2022, 126, 3291–3299

Read Online

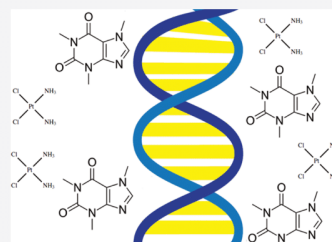
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: It is well reported in the literature that caffeine, the most consumed alkaloid around the world, enhances the anticancer effects of the drug cisplatin by inhibiting DNA repair by the cellular machinery. Here, we perform single-molecule force spectroscopy assays with optical tweezers to show that caffeine enhances the toxicity not only of cisplatin but also of various different platinum-based drugs already at the molecular level, using samples containing only double-stranded (ds)DNA, platinum drugs, and the alkaloid in a simple phosphate buffer, that is, completely out of the complex environment found inside real living cells. In fact, our results show that caffeine acts as an allosteric catalyst which increases the effective equilibrium binding constant between DNA and the platinum drugs, also interfering in the cooperativity of the binding reactions. To the best of our knowledge, this is the first time that such a property of caffeine was demonstrated and characterized from a pure physicochemical perspective, outside the cellular environment. Thus, the present work provides new insights into the use of this alkaloid for current chemotherapeutic applications.



INTRODUCTION

Platinum-based drugs constitute one of the classes of compounds most employed in current cancer chemotherapies.^{1–7} Because of the success achieved in clinical trials using these drugs, over the past years, a number of groups have investigated the molecular mechanism of action of cisplatin and its derivatives, especially their interactions with the DNA molecule—the main target of these drugs inside living cells.^{8–24} It is known that the platinum-based compounds can form a variety of different covalent adducts with the DNA bases. Such structures are recognized as the cause of their antitumor activity, resulting in an effective hindering of many intracellular DNA-related processes.^{8,9}

Cisplatin [*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)], the precursor of this class of compounds, was first described already in 1845 by Michele Peyrone²⁵ and today it is still one of the most important platinum drugs, despite the several side effects associated with its use and the development of drug resistance by the cells during the treatments.²⁶ Because of these limitations, derived compounds were synthesized over the past years in order to improve the efficacy of the treatments. In particular, two of these compounds have achieved relative success in some kinds of chemotherapies: carboplatin [*cis*-diammine (cyclobutane-1,1-dicarboxylate-O,O')] platinum (II)]^{2–5} and oxaliplatin [(1*R*,2*R*)-diamino-cyclohexaneoxalatoplatinum(II)].^{27–29} On the other hand, the cisplatin isomer known as transplatin curiously was earlier discarded as an antitumor agent because it

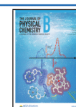
was reported to present small effects in cancer treatments. This singular difference was attributed to the types of covalent adducts formed between the compounds and the DNA bases,^{30–33} with transplatin having interstrand crosslinks as the most stable covalent diadducts^{24,30,34} and the other three compounds cited above having intrastrand crosslinks playing such a role.^{9,35} Nevertheless, it is worth mentioning that some recent studies have proposed that transplatin can also be useful as an antitumor agent under certain circumstances.^{24,34}

Another important strategy to improve the efficacy of chemotherapies is to use a second molecule besides the antitumor agent to modulate the activity of the latter, by improving its effects on DNA. It is well reported for instance that caffeine, the most consumed alkaloid around the world, enhances the anticancer effects of cisplatin by inhibiting DNA repair by the cellular machinery.^{36–40} Many specific results concerning this fact were obtained from experiments performed at the cellular level. For example, it was shown that caffeine increases the antiproliferative activity and apoptosis caused by cisplatin in cultured cells.^{36,37} Thus, the alkaloid decreases the

Received: March 4, 2022

Revised: April 11, 2022

Published: April 20, 2022



Referências

- [1] Barnett Rosenberg, Loretta Van Camp, and Thomas Krigas. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(4972):698–699, 1965.
- [2] Michel Daune. *Molecular biophysics: structures in motion*. Number Sirsi) i9780198577836. 1999.
- [3] Jack. Conceito de gene e dna. [urlhttp://soudebiologicas.blogspot.com/2016/03/resumo-conceito-de-gene-e-dna.html](http://soudebiologicas.blogspot.com/2016/03/resumo-conceito-de-gene-e-dna.html), 2022.
- [4] Clarisse Gravina Ricci. *A, B e Z-DNA: caracterização conformacional e importância biológica*. 2007.
- [5] Márcio Santos Rocha. *Interações DNA-ligantes: uma introdução*. Livraria da Física, 2020.
- [6] Ulisses Moreira Silveira Andrade. *Manipulação de partículas superparamagnéticas utilizando feixes de Bessel e Estudo das interações DNA-Líquidos Iônicos*. 2022.
- [7] L Oliveira and MS Rocha. Force spectroscopy unravels the role of ionic strength on dna-cisplatin interaction: Modulating the binding parameters. *Physical Review E*, 96(3):032408, 2017.
- [8] L Oliveira, JM Caquito Jr, and MS Rocha. Carboplatin as an alternative to cisplatin in chemotherapies: New insights at single molecule level. *Biophysical Chemistry*, 241:8–14, 2018.
- [9] L Oliveira, JM Caquito Jr, and MS Rocha. Oxaliplatin effects on the dna molecule studied by force spectroscopy. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 5(5):055009, 2019.
- [10] L Oliveira, JM Caquito Jr, and MS Rocha. Transplatin ineffectiveness against cancer from a molecular perspective: A single-molecule force-spectroscopy study. *Physical Review E*, 101(6):062412, 2020.
- [11] David L Nelson and Michael M Cox. *Leninger princípios de bioquímica*, pages 975–975. 2002.
- [12] Richard E Dickerson, Horace R Drew, Benjamin N Conner, Richard M Wing, Albert V Fratini, and Mary L Kopka. The anatomy of a-, b-, and z-dna. *Science*, 216(4545):475–485, 1982.

- [13] Arthur Ashkin. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10):4853–4860, 1997.
- [14] Yohei Kawano, Masashi Nagata, Takafumi Kohno, Akihiro Ichimiya, Tomomi Iwakiri, Manabu Okumura, and Kazuhiko Arimori. Caffeine increases the antitumor effect of cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(3):400–407, 2012.
- [15] Yuichiro Oda, Muneaki Hidaka, and Akito Suzuki. Caffeine has a synergistic anticancer effect with cisplatin via inhibiting fanconi anemia group d2 protein monoubiquitination in hepatocellular carcinoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, pages b17–00457, 2017.
- [16] William J Slichenmyer and Daniel D Von Hoff. Taxol: a new and effective anti-cancer drug. *Anti-cancer drugs*, 2(6):519–530, 1991.
- [17] Douglas H Thamm, Elizabeth A Mauldin, and David M Vail. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor—41 cases (1992–1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(5):491–497, 1999.
- [18] Kenji Inagaki and Yoshinori Kidani. Ultraviolet difference spectral study of the interaction of dna with platinum complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 46:35–39, 1980.
- [19] Bruno Van Hemelryck, Eric Guittet, Genevieve Chottard, Jean Pierre Girault, Tam Huynh-Dinh, Jean Yves Lallemand, Jean Igolen, and Jean Claude Chottard. A d (gpg)-platinated oligonucleotide can form a duplex with a complementary strand. *Journal of the American Chemical Society*, 106(10):3037–3039, 1984.
- [20] William M Scovell and Lee R Kroos. Cis-and trans-diamminedichloroplatinum (ii) binding produces different tertiary structural changes on sv40 dna. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 104(4):1597–1603, 1982.
- [21] Lukáš Dvořák, Igor Popa, Pavel Štarha, and Zdeněk Trávníček. In vitro cytotoxic-active platinum (ii) complexes derived from carboplatin and involving purine derivatives, 2010.
- [22] Deepak K Jangir and Ranjana Mehrotra. Raman spectroscopic evaluation of dna adducts of a platinum containing anticancer drug. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130:386–389, 2014.
- [23] Kenneth Swenerton, John Jeffrey, Gavin Stuart, Michel Roy, Gary Krepart, John Carmichael, Pierre Drouin, Robert Stanimir, Gregory O’Connell, and Grant MacLean. Cisplatin-cyclophosphamide versus carboplatin-cyclophosphamide in advan-

- ced ovarian cancer: a randomized phase iii study of the national cancer institute of canada clinical trials group. *Journal of clinical oncology*, 10(5):718–726, 1992.
- [24] Muhyi Al-Sarraf, Barbara Metch, Julie Kish, John Ensley, John J Rinehart, and David E Schuller. Oncology group and wayne state university study 1, 2, 3. *Cancer treatment reports*, 71(7-8):723, 1987.
- [25] Corey J Langer, John C Leighton, Robert L Comis, Peter J O’Dwyer, Cecilia A McAleer, Colleen A Bonjo, Paul F Engstrom, Samuel Litwin, and Robert F Ozols. Paclitaxel and carboplatin in combination in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a phase ii toxicity, response, and survival analysis. *Journal of clinical oncology*, 13(8):1860–1870, 1995.
- [26] C Bokemeyer, O Köhrmann, J Tischler, L Weissbach, U Räth, A Haupt, Patrick Schöffski, A Harstrick, and H-J Schmoll. A randomized trial of cisplatin, etoposide and bleomycin (peb) versus carboplatin, etoposide and bleomycin (ceb) for patients with ‘good-risk’ metastatic non-seminomatous germ cell tumors. *Annals of oncology*, 7(10):1015–1021, 1996.
- [27] A Horwich, D Th Sleijfer, SD Fossa, SB Kaye, RTD Oliver, MH Cullen, GM Mead, R de Wit, PHM De Mulder, DP Dearnaley, and Others. Randomized trial of bleomycin, etoposide, and cisplatin compared with bleomycin, etoposide, and carboplatin in good-prognosis metastatic nonseminomatous germ cell cancer: a multiinstitutional medical research council european organization for research and treatment of cancer trial. *Annals of oncology*, 1997.
- [28] David J Stewart. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical reviews in oncology/hematology*, 63(1):12–31, 2007.
- [29] Angelika Küng, Dirk B Strickmann, Markus Galanski, and Bernhard K Keppler. Comparison of the binding behavior of oxaliplatin, cisplatin and analogues to 5-gmp in the presence of sulfur-containing molecules by means of capillary electrophoresis and electrospray mass spectrometry. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 86(4):691–698, 2001.
- [30] Gan Wang, Vanitha Bhoopalan, David Wang, Le Wang, and Xiaoxin Xu. The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. *Experimental hematology & oncology*, 4(1):1–9, 2015.
- [31] Jann N Sarkaria, Ericka C Busby, Randal S Tibbetts, Pia Roos, Yoichi Taya, Larry M Karnitz, and Robert T Abraham. Inhibition of atm and atr kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer research*, 59(17):4375–4382, 1999.

- [32] Andreas P Kyriazis, Aikaterini A Kyriazis, and Alan Yagoda. Enhanced therapeutic effect of cis-diamminedichloroplatinum (ii) against nude mouse grown human pancreatic adenocarcinoma when combined with 1- β -d-arabinofuranosylcytosine and caffeine. *Cancer research*, 45(12_Part_1):6083–6087, 1985.
- [33] Vitor Santaella Zanuto. Pressão de radiação: sobre os efeitos das forças de radiação em água. 2015.
- [34] Arthur Ashkin, James M Dziedzic, John E Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, 11(5):288–290, 1986.
- [35] Yasuhiro Harada and Toshimitsu Asakura. Radiation forces on a dielectric sphere in the rayleigh scattering regime. *Optics communications*, 124(5-6):529–541, 1996.
- [36] Robert W Applegate, Jeff Squier, Tor Vestad, John Oakey, and David WM Marr. Optical trapping, manipulation, and sorting of cells and colloids in microfluidic systems with diode laser bars. *Optics express*, 12(19):4390–4398, 2004.
- [37] Thomas Germer, Joanne C Zwinkels, and Benjamin K Tsai. *Spectrophotometry: Accurate measurement of optical properties of materials*. Elsevier, 2014.
- [38] Heinz-Helmut Perkampus. *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [39] James D Watson and Francis HC Crick. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953.
- [40] Maurice Kleman and Oleg D Lavrentovich. *Soft matter physics: an introduction*. Springer, 2003.
- [41] Masao Doi. *Soft matter physics*. Oxford University Press, 2013.
- [42] Stephen J Blundell and Katherine M Blundell. *Concepts in thermal physics*. Oxford University Press on Demand, 2010.
- [43] Tiago de Assis Moura. *Efeitos da cafeína sobre a estrutura da molécula de DNA: um estudo por espectroscopia de força*. Universidade Federal de Viçosa, 2017.
- [44] Luana Aparecida dos Reis. *Estudo da interação do DNA com o corante fluorescente DAPI utilizando a técnica de pinça ótica*. Universidade Federal de Viçosa, 2017.
- [45] John F Marko and Eric D Siggia. Stretching dna. *Macromolecules*, 28(26):8759–8770, 1995.

- [46] Andy Sischka, Katja Toensing, Rainer Eckel, Sven David Wilking, Norbert Sewald, Robert Ros, and Dario Anselmetti. Molecular mechanisms and kinetics between dna and dna binding ligands. *Biophysical journal*, 88(1):404–411, 2005.
- [47] Jonathan B Chaires, Nanibhushan Dattagupta, and Donald M Crothers. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on the interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 21(17):3933–3940, 1982.
- [48] Nam-Kyung Lee, Jin-Sung Park, Albert Johner, Sergei Obukhov, Ju-Yong Hyon, Kyoung J Lee, and Seok-Cheol Hong. Investigation of the elasticity of a cisplatin-dna adduct via single-molecule measurements and bimodal modeling. *Physical Review E*, 79(4):041921, 2009.
- [49] Antonino Lauria, Alessandra Montalbano, Paola Barraja, Gaetano Dattolo, and Anna Maria Almerico. Dna minor groove binders: an overview on molecular modeling and qsar approaches. *Current medicinal chemistry*, 14(20):2136–2160, 2007.
- [50] Victor A Bloomfield. Condensation of dna by multivalent cations: considerations on mechanism. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 31(13):1471–1481, 1991.
- [51] GD Scatchard. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY Acad. Sci.*, 51:660–672, 1949.
- [52] David Colquhoun. The quantitative analysis of drug–receptor interactions: a short history. *Trends in pharmacological sciences*, 27(3):149–157, 2006.
- [53] Archibald Vivian Hill. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *j. physiol.*, 40:4–7, 1910.
- [54] A. V. Hill. The nobel prize in physiology or medicine 1922 was divided equally between archibald vivian hill "for his discovery relating to the production of heat in the muscle" and otto fritz meyerhof "for his discovery of the fixed relationship between the consumption of oxygen and the metabolism of lactic acid in the muscle.". [urlhttps://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1922/summary/](https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1922/summary/).
- [55] Márcio Santos Rocha. Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação dna-fármacos. 2008.
- [56] MS Rocha. Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate dna interactions with drugs and proteins in single molecule experiments. *Integrative Biology*, 7(9):967–986, 2015.

- [57] L Siman, ISS Carrasco, JKL da Silva, MC de Oliveira, MS Rocha, and ON Mesquita. Quantitative assessment of the interplay between dna elasticity and cooperative binding of ligands. *Physical Review Letters*, 109(24):248103, 2012.
- [58] E. C. Cesconetto, F. S. A. Junior, F. A. P. Crisafuli, O. N. Mesquita, E. B. Ramos, and M. S. Rocha. Dna interaction with actinomycin d: mechanical measurements reveal the details of the binding data. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:11070–11077, 2013.
- [59] Eduardo Ferreira da Silva. Estudo da interação dna-hoescht (33258) por pinçamento ótico. 2013.
- [60] Michelle D Wang, Hong Yin, Robert Landick, Jeff Gelles, and Steven M Block. Stretching dna with optical tweezers. *Biophysical journal*, 72(3):1335–1346, 1997.
- [61] Terence Strick, Jean-François Allemand, Vincent Croquette, and David Bensimon. Twisting and stretching single dna molecules. *Progress in biophysics and molecular biology*, 74(1-2):115–140, 2000.
- [62] MS Rocha. Modeling the entropic structural transition of dna complexes formed with intercalating drugs. *Physical Biology*, 6(3):036013, 2009.
- [63] James D McGhee and Peter H von Hippel. Theoretical aspects of dna-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *Journal of molecular biology*, 86(2):469–489, 1974.
- [64] John van Noort, Sander Verbrugge, Nora Goosen, Cees Dekker, and Remus Thei Dame. Dual architectural roles of hu: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(18):6969–6974, 2004.
- [65] EF Silva, EB Ramos, and MS Rocha. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(24):7292–7296, 2013.
- [66] Micah J McCauley and Mark C Williams. Optical tweezers experiments resolve distinct modes of dna-protein binding. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 91(4):265–282, 2009.
- [67] TA Moura, L Oliveira, and MS Rocha. Effects of caffeine on the structure and conformation of dna: A force spectroscopy study. *International journal of biological macromolecules*, 130:1018–1024, 2019.
- [68] Xi-Miao Hou, Xing-Hua Zhang, Kong-Ji Wei, Chao Ji, Shuo-Xing Dou, Wei-Chi Wang, Ming Li, and Peng-Ye Wang. Cisplatin induces loop structures and condensation of single dna molecules. *Nucleic acids research*, 37(5):1400–1410, 2009.

-
- [69] FAP Crisafuli, EC Cesconetto, EB Ramos, and MS Rocha. Dna–cisplatin interaction studied with single molecule stretching experiments. *Integrative Biology*, 4(5):568–574, 2012.
- [70] Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Katsuhiro Hayashi, Akihiko Takeuchi, and Hiroyuki Tsuchiya. Caffeine citrate enhanced cisplatin antitumor effects in osteosarcoma and fibrosarcoma in vitro and in vivo. *BMC cancer*, 19(1):1–11, 2019.
- [71] Masayuki Hayashi, Hiroyuki Tsuchiya, Norio Yamamoto, Michiaki Karita, Toshiharu Shirai, Hideji Nishida, Akihiko Takeuchi, and Katsuro Tomita. Caffeine-potentiated chemotherapy for metastatic carcinoma and lymphoma of bone and soft tissue. *Anticancer research*, 25(3C):2399–2405, 2005.
- [72] TA Moura, RLR Junior, and MS Rocha. Caffeine modulates the intercalation of drugs on dna: A study at the single molecule level. *Biophysical Chemistry*, 277:106653, 2021.