

EDUARDO FERREIRA DA SILVA

**ANÁLISE DE COMPLEXOS DNA-LIGANTES COM
APLICAÇÕES NA CONSTRUÇÃO DE CARREADORES
DE FÁRMACOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

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

T

S586a
2018
Silva, Eduardo Ferreira da, 1972-
Análise de complexos DNA-ligantes com aplicações na
construção de carreadores de fármacos / Eduardo Ferreira da
Silva. – Viçosa, MG, 2018.
xii, 119 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.111-119.

1. Pinças ópticas. 2. Eletroforese. 3. DNA. 4. Fármacos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Física.
Programa de Pós-Graduação em Física. II. Título.

CDD 22. ed. 535.2

EDUARDO FERREIRA DA SILVA

**ANÁLISE DE COMPLEXOS DNA-LIGANTES COM APLICAÇÕES NA
CONSTRUÇÃO DE CARREADORES DE FÁRMACOS**

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2018.



Alexandre Gurgel




Clodoaldo Irieneu Levartoski de Araujo



Rafael de Sousa Dutra



Sérgio Luís de Abreu Mello



Márcio Santos Rocha
(Orientador)

À ciência. Com muito carinho a todos que lutaram por ela, que tornaram o processo científico uma verdade, especialmente àqueles que tiveram suas vidas tomadas por defendê-la!

“Aquele que pára de estudar simplesmente porque terminou um curso está para sempre e irremediavelmente condenado à mediocridade, qualquer que seja sua área de atuação. O caminho do sucesso é o caminho da aprendizagem contínua. ”

Napoleon Hill

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que tem estado me apoiando ao longo da minha jornada. Um agradecimento muito especial a toda a minha família, meus pais, irmãos, esposa e filha. Com todo seu amor, companheirismo, amizade, apoio, tolerância, compreensão, animação, determinação, etc: família, você é o pilar da minha perseverança!

Àqueles que fazem da Universidade Federal de Viçosa uma universidade de ponta e um ótimo ambiente para viver e aprender, principalmente aos professores e funcionários do Departamento de Física!

Muito obrigado aos amigos da pós graduação. Através dos estudos em grupo, os debates sobre os aprendizados, as explicações nos momentos de dúvidas e incontáveis outros apoios, com certeza vocês tornaram o caminho muito mais fácil.

Aos amigos e companheiros do grupo de Física Biológica, que não só ajudaram enormemente na execução dos trabalhos, mas também contribuíram com o enriquecedor espírito de equipe. Mais além ainda, ajudaram para que fosse possível realizar a ciência no dia a dia de um laboratório. Este grupo fez do *LFB – UFV* o melhor grupo de Física Biológica do Brasil e com toda certeza um dos melhores do mundo. Todos sempre foram muito profissionais, dedicados, colaboradores e respeitosos.

Um especial muito obrigado ao meu orientador, Márcio Santos Rocha. Dono de uma postura ética e sábia admirável, é incansável na luta pelo bom trabalho e demonstra a cada membro do grupo que crê em seus potenciais.

A todas as agências de fomento à pesquisa, pela aquisição de equipamentos e materiais necessários ao funcionamento e manutenção do laboratório. Agradeço em especial à CAPES pela bolsa concedida e à FAPEMIG pelo apoio nos encontros e congressos.

À Universidade Federal de Viçosa.

... À VIDA!

Sumário

Lista de Figuras	viii
Resumo	xi
Abstract	xii
1 Introdução	1
2 DNA	5
2.1 Breve Relato Histórico e Importância	6
2.2 Estruturação da Cadeia	7
2.3 Conformações do DNA	11
2.4 Propriedades e características poliméricas do DNA	12
2.4.1 Energia de configuração da cadeia: o modelo de Kratky-Porod	12
2.4.2 Elasticidade no Regime Entrópico	14
2.4.3 Haste continuamente flexível - modelo WLC	17
2.4.3.1 Estiramentos mínimos no WLC	17
2.4.3.2 Estiramentos máximos no WLC	18
2.4.3.3 Expressão de Marko e Siggia	20
2.5 λ – DNA	21
2.6 Equilíbrio químico nas interações DNA-Ligantes	21
2.6.1 Cooperatividade no modelo de Hill	22
2.6.2 Exclusão de vizinhos no modelo de McGhee - von Hippel	26

2.6.2.1	Modelo de exclusão de vizinhos sem cooperatividade	26
3	Pinças Ópticas	31
3.1	Histórico	31
3.2	Teoria e Princípios Físicos	34
3.2.1	Requisitos sobre elementos óticos	34
3.2.2	Requisitos sobre partículas dielétricas	35
3.2.3	Teorias do pinçamento ótico	36
3.3	Esquema de montagem da pinça e da videomicroscopia	40
3.4	A constante de força: calibrando a pinça óptica	42
3.5	Metodologias Experimentais para a pinça óptica	45
3.5.1	Procedimento experimental - pinça óptica	45
3.5.1.1	Os dados do estiramento do DNA e do complexo DNA-ligante	45
3.5.2	Preparo das amostras - pinça óptica	51
3.5.2.1	Construção do porta-amostra	52
3.5.2.2	Preparo da solução de DNA - pinça óptica	53
4	Eletroforese em Gel de Agarose	54
4.1	Metodologias Experimentais para a eletroforese	54
4.1.1	Preparo do gel e da solução eletrolítica	56
4.1.2	Preparo das amostras - eletroforese	56
5	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	58
5.1	Metodologias Experimentais para o DLS	59
5.1.1	Preparo das amostras - DLS	61
6	Resultados e Discussões	62
6.1	Estudos da formação do complexo DNA-Proteína $C_4S_{10}K_{12}$	62
6.1.1	A proteína $C_4S_{10}K_{12}$	63
6.1.2	Apuração das propriedades mecânicas	63

6.1.2.1	O comprimento de persistência	64
6.1.2.2	O comprimento de contorno	64
6.2	Estudos da formação do complexo DNA-Doxorrubicina	68
6.2.1	A Doxorrubicina	68
6.2.2	Propriedades mecânicas e físico-químicas do complexo DNA-Doxorrubicina	70
6.2.2.1	Comprimento de Contorno e seu uso para deduzir as propri- edades físico-químicas da interação	71
6.2.2.2	Comprimento de persistência e a dependência da força externa	77
6.2.3	Conclusões sobre o estudo da interação DNA-doxo	84
6.3	Estudos da formação do complexo DNA-DTAB	85
6.3.1	O surfactante catiônico DTAB	85
6.3.2	Propriedades mecânicas dos complexos DNA-DTAB	86
6.3.2.1	O comprimento de persistência	87
6.3.2.2	O comprimento de contorno	89
6.3.3	Resultados DNA-DTAB via Eletroforese	91
6.3.4	Conclusões sobre o estudo da interação DNA-DTAB	93
7	Conclusões finais e perspectivas	94
A	Cálculo da média quadrática da distância entre as extremidades $\langle r_{ee}^2 \rangle$	97
B	Artigos publicados	101
	Revista <i>Biopolymers</i>	101
	Referências Bibliográficas	111

Lista de Figuras

2.1	Diagrama de um nucleotídeo do DNA.	8
2.2	Bases nitrogenadas.	8
2.3	Esquema da direção de crescimento da cadeia.	9
2.4	Esquema da dupla hélice.	10
2.5	Tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas.	11
2.6	Deformação de haste em semi-círculo	13
2.7	Curva aleatória	13
2.8	Aumento de entropia do DNA em solução	15
2.9	Forças no regime entropico	16
2.10	Gráfico modelo para o coeficiente de Hill	25
2.11	Tamanhos da lacuna e do número de exclusão	27
2.12	Comportamento gráfico típico da isoterma de McGee - von Hippel	30
3.1	Detalhes dos elementos óticos	35
3.2	Regimes de espalhamento	37
3.3	Forças de espalhamento e de gradiente	38
3.4	Desvios dos raios e da microesfera	39
3.5	Região focal	40
3.6	Montagem experimental	41
3.7	Poço de potencial de aprisionamento da pinça óptica	42
3.8	Gráfico de V por Δx	44
3.9	Possíveis configurações da solução no porta-amostra	47

3.10	Direção de estiramento para testar uniformidade	47
3.11	Estiramento do DNA ao longo de sua extensão	48
3.12	Curva de força típica de um DNA em sua forma nativa	49
3.13	Esquema do porta-amostra e troca de alíquota	51
4.1	Representação esquemática da Eletroforese	55
4.2	Recipiente de preparo do gel	56
5.1	Cubeta de quartzo e solução DLS	60
5.2	Esquema de funcionamento DLS	60
6.1	Esquema da proteína	63
6.2	Persistência por concentração	64
6.3	Gráficos: Comprimento de contorno dos complexos DNA- $C_4S_{10}K_{12}$	65
6.4	Força por extensão em regime de altas forças	66
6.5	Estrutura hipotética do λ -DNA em processo de compactação pela $C_4S_{10}K_{12}$	67
6.6	Estrutura molecular da doxorubicina	69
6.7	curvasforçapbstris	71
6.8	Comprimento de contorno relativo	73
6.9	Proposição de dímeros ligados ao DNA	76
6.10	Comprimento de persistência A em função da concentração total C_T	78
6.11	Comprimento de persistência A em função da concentração total C_T	79
6.12	Imagens AFM A x C_T	80
6.13	Comparação dos raios de giro e hidrodinâmico (R_g, R_h) em função da concentração total C_T	82
6.14	Composição e estrutura química do DTAB	86
6.15	Comprimento de persistência dos complexos DNA-DTAB ($A(C_T)$) em função da concentração total C_T	87
6.16	Conformação do DNA e do complexo DNA-DTAB	88
6.17	Comprimento de contorno dos complexos DNA-DTAB ($L(C_T)$) em função da concentração total C_T	90

6.18	Imagem eletroforética com baixo tempo de incubação e baixa concentração . . .	91
6.19	Imagem eletroforética com alto tempo de incubação e baixa concentração . . .	92
6.20	Imagem eletroforética com baixo tempo de incubação e alta concentração . . .	93
A.1	Curva arbitrária de um polímero e seus vetores posição	97

Resumo

SILVA, Eduardo Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Análise de complexos DNA-ligantes com aplicações na construção de carreadores de fármacos.** Orientador: Marcio Santos Rocha. Coorientadores: Jose Ésio Bessa Ramos Júnior e Marcelo Lobato Martins.

Neste trabalho, fizemos experimentos de estiramentos em moléculas únicas com pinça óptica e apoiamos nossas análises e conclusões nas técnicas de Eletroforese em Gel, Microscopia de Força Atômica e Espalhamento Dinâmico de Luz. Usamos este aparato para estudarmos interações do DNA com alguns ligantes, incluindo proteína, surfactante, fármaco antitumoral (doxorrubicina) e complexos formados com a união de dois destes ligantes e o DNA. Os ligantes, proteína e surfactante, foram escolhidos devido a suas possíveis funcionalizações como transportadores de fármacos ou material genético para o interior celular (carreadores). Estes dois são agentes condensantes do DNA e a condensação é um processo de fundamental importância na formação de carreadores. O fármaco antitumoral foi estudado por ser um material interessante a ser transportado para o interior celular. As propriedades mecânicas dos complexos em função da concentração do ligante foram diretamente determinadas a partir das medidas de estiramento, através do ajuste de curvas de força por extensão, no qual empregamos o modelo da cadeia vermiforme (WLC) para polímeros semiflexíveis. Além disso, os parâmetros físico-químicos da interação DNA-doxorrubicina foram extraídos a partir de dados do comprimento de contorno, usando o modelo estatístico de ajuste pelo comprimento de contorno, previamente desenvolvido pelo grupo de Física Biológica da UFV. Este modelo nos permitiu a obtenção da isoterma de ligação e particularmente, detectamos a interação típica de intercalantes para o fármaco doxorrubicina, desvendando peculiaridades dessa interação a partir da autoagregação da droga em diferentes condições iônicas. Também coletamos dados da interação da proteína $C_4S_{10}K_{12}$ com o DNA que ajudam a evidenciar o processo de ação pelo qual a proteína $C_4S_{10}K_{12}$ condensa o DNA. Estudamos também a interação do surfactante catiônico DTAB com o DNA, como outro agente condensante do DNA, observando alguns aspectos importantes deste processo de condensação.

Abstract

SILVA, Eduardo Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Analysis of DNA-bindings complexes with applications in drug carriers formation.** Adviser: Marcio Santos Rocha. Co-Advisers: Jose Esio Bessa Ramos Júnior and Marcelo Lobato Martins.

In this work, we performed single molecules stretching experiments with optical tweezers, and we supported our analysis and conclusions with the techniques of Gel Electrophoresis, Atomic Force Microscopy and Dynamic Light Scattering. We used these apparatus to study interactions of DNA with various ligands, including: protein, surfactant, an antitumoral drug (doxorubicin) and complexes formed from the link-up of two of these substances and DNA. The binders, protein and surfactant, were chosen because of their possible functionalisations as drug or genetic material carriers for the cellular interior (carriers). These two are DNA-condensing agents and the DNA condensation is a fundamental process in carriers formation. The antitumor drug was studied because it is an interesting material to be transported into cells. The complexes' mechanical properties as a function of ligand concentration were directly determined from stretching measurements by fitting the force extension curves to the worm-like chain model (WLC) of semi-flexible polymers. In addition, the physicochemical parameters of the DNA-doxorubicin interaction were extracted using a statistical model-fitting approaches by the contour length previously developed by the group of Biological Physics of UFV. These models allowed us to obtain the binding isotherms and particularly we detected the typical interaction of intercalators for the doxorubicin drug, unraveling peculiarities of this interaction, from drug self-aggregation, in different ionic conditions. Also, we collected data of the $C_4S_{10}K_{12}$ -DNA interaction that help to evidence the action process throughout which the protein $C_4S_{10}K_{12}$ condenses DNA. We also have studied the interaction between DNA and the cationic surfactant DTAB, as another DNA condensing agent, in which we observed some important aspects from this condensation process.

Capítulo 1

Introdução

Nos dias atuais estamos realizando o desejo científico sonhado durante longo período na história da ciência. Estamos numa era na qual podemos enxergar as vastas possibilidades das interações de uma substância a partir do ponto de vista de suas porções moleculares, compreendendo-as através de escalas atômicas e/ou subatômicas. Por meio de ferramentas de altos níveis de resolução extraem-se informações experimentais da interação de moléculas únicas, o que permite simultaneamente abandonar a média do comportamento de múltiplas moléculas e também estabelecer um paralelo entre o comportamento médio e da molécula única. De outro ponto de vista, temos a possibilidade de realizar um ajuste fino nas tomadas de medidas científicas.

Neste viés, as ciências biológicas tornam-se capazes de alcançar notáveis avanços. Tais avanços são permitidos pela agregação de ciências como Física, Química, Matemática e Computação que, junto à área biológica, disponibilizam um grande arsenal de técnicas capazes de ir a fundo nas pesquisas sobre as interações moleculares.

Muitas técnicas de análises de interações moleculares utilizam a conexão da Física e da Biologia nas tentativas de desvelamento das interações observadas. Neste aspecto, atua nosso grupo de pesquisa de Física Biológica do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, lançando mão de técnicas como a *Pinça Óptica (OT)*, *Microscopia de Força Atômica (AFM)*, *Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)*, *Eletroforese em Gel de Agarose (GE)*, *Pinça Magnética (MT)* e outras. Estas últimas (outras) estão presentes no laboratório de cultura de células com suas metodologias estatísticas de análises.

O foco de trabalho desta tese consistiu em estudar complexos formados com o DNA capazes de adentrar ao interior celular, de tal forma que o DNA estivesse hospedando alguma substância a ser inserida no meio celular. Portanto, há necessidade que a substância seja transportada para o meio celular. Sendo assim, caracterizamos a interação do DNA com dois ligantes compac-

tantes e um fármaco antitumoral, que no nosso caso é a substância de interesse científico que seja entregue no interior celular. Compactado, o DNA por sua vez estaria portando o material de interesse capaz de proporcionar algum efeito desejado à célula, seja ele medicação ou terapia gênica. Portanto, estudamos como sendo os ligantes condensantes, a proteína biossintética $C_4S_{10}K_{12}$ (proteína formada por 400 aminoácidos, dez octapeptídeos e doze aminoácidos de lizina) e o surfactante Brometo de Dodeciltrimetilamônio (DTAB). Já como agente para entrega no interior celular, utilizamos o conhecido fármaco antitumoral, doxorubicina. No capítulo de resultados, todas estas substâncias serão abordadas detalhadamente.

Os trabalhos apresentados nesta tese mostram e discutem resultados corroborados por diferentes técnicas, sendo elas tanto técnicas de moléculas únicas quanto de média sobre conjuntos. A principal ferramenta de trabalho adotada foi a pinça óptica, uma técnica de molécula única. Entretanto, também contamos com o suporte de observações adquiridas pelas técnicas de eletroforese em gel e espalhamento dinâmico de luz, que se baseiam no comportamento médio sobre um conjunto de moléculas. Uma parte dos trabalhos de análise da interação do DNA com o surfactante DTAB foi feita diretamente com a eletroforese e por isso esta técnica é descrita nesta tese, embora resumidamente. Deste mesmo modo, os trabalhos com o espalhamento de luz suportaram algumas medidas específicas do comportamento da doxorubicina e por isso a técnica também está descrita neste trabalho. Nas análises do fármaco doxorubicina, há também resultados corroborados pela técnica de microscopia de força atômica (AFM), cujos trabalhos foram conduzidos por outro pesquisador de nosso grupo e nos quais os detalhes compõem outra tese de doutoramento. Em vista disso, são os estiramentos de complexos formados com o DNA, via pinça óptica, que viabilizam a maior parte de nossas análises das interações moleculares e as consequentes extrações de dados físico-químicos.

A pinça óptica se baseia na utilização de um feixe laser focalizado pela ação de uma lente objetiva no interior de um microscópio. O desenvolvimento desta técnica foi conduzida por Arthur Ashkin a partir da década de 1960, demonstrando o poder desta técnica na integração da Física e da Biologia. A pinça óptica permite aprisionar e controlar com sensibilidade a micromanipulação de partículas dielétricas e biológicas na região focal do feixe laser, trabalhando normalmente com forças em escalas de piconewtons e chegando até femtonewtons [1–9].

As interações de nosso interesse são as que ocorrem entre a molécula de DNA e as inúmeras substâncias denominadas ligantes do DNA. Portanto, faz-se necessário abordar no trabalho uma compreensão elucidativa sobre o DNA e seu comportamento através das condições que norteiam nosso interesse. A partir dos impactantes artigos de Watson e Crick em 1953 [10, 11] desvendando a estrutura do DNA, uma gama de novas técnicas foram exploradas com intuito de descobrir as possibilidades e os modos de relações do DNA com variados tipos de substâncias [12]. Devido ao papel crucial que a interação do DNA com ligantes exerce nas relações das células com seus respectivos meios, estas interações ganharam um grandioso destaque. Passa-

ram a pautar notável importância em pesquisas que visassem compreender desde organização e estruturação intracelulares básicas, até complexos desenvolvimentos em avançadas técnicas de tratamentos quimioterápicos. Os aparatos utilizados nestes estudos, possibilitam até o desenvolvimento de terapias gênicas e de drogas capazes de atingir efeitos de citotoxicidades desejadas e com reduzidos efeitos colaterais, como a cardiotoxicidade [13, 14].

Usamos uma metodologia de análise de dados recentemente desenvolvida pelo nosso grupo, que permite extrair parâmetros físico-químicos, e conseqüentemente a isoterma de ligação, a partir de medidas puramente mecânicas. Esta metodologia consiste no procedimento de ajuste dos dados dos comprimentos de persistência e de contorno de um complexo DNA-ligante. Por esta metodologia usa-se um modelo estatístico de desordem de sítios para análises dos dados a partir do comprimento de persistência e usa-se um modelo que aborda o aumento relativo do contorno quando analisamos a interação pelo comprimento de contorno [15–19].

No capítulo 2 esta tese inicia uma apresentação das concepções gerais que fundamentam a metodologia escolhida para o desenvolvimento deste ramo científico e também aquelas envolvidas na análise dos resultados obtidos por este trabalho. Neste capítulo é apresentada os principais aspectos e importâncias da molécula do ácido desoxirribonucleico, junto com um apanhado histórico da construção coletiva de sua estrutura.

No capítulo 3 a descrição da pinça óptica, embora sucinta, pretende proporcionar ao leitor uma perspectiva para o entendimento e a análise de nossos dados, discorrendo sobre o que é o pinçamento óptico, englobando o embasamento teórico e um breve histórico. Dentro deste capítulo temos a seção 3.5 em que são apresentadas as metodologias experimentais para a pinça óptica, relatando passos importantes que abordam desde o preparo do DNA à montagem da pinça óptica, que formam a base essencial deste trabalho.

Nos capítulos 4 e 5 são apresentadas breves descrições, porém relevantes, sobre as técnicas de eletroforese em gel de agarose e espalhamento dinâmico de luz. Estas técnicas ajudaram a formar nossas análises e conclusões do trabalho. Analogamente ao que ocorreu no capítulo sobre a pinça, dentro destes dois há apresentação dos preparos e metodologias experimentais pertinentes.

Embora sejam apresentados alguns resultados fornecidos pela técnica de microscopia de força atômica, que corroboram alguns resultados da interação DNA-doxorrubicina. Estes resultados foram obtidos por outro pesquisador de nosso grupo e fez parte de sua tese de doutorado, não havendo, portanto, descrição desta técnica neste trabalho.

No capítulo 6 apresentam-se os resultados alcançados por este trabalho, separadamente para cada tipo específico de ligante do DNA que estudamos. Com este formato de apresentação da tese pretende-se possibilitar o entendimento do trabalho englobando o planejamento, a execução e os resultados.

Os apêndices reúnem informações com maior rigor sobre embasamentos matemáticos de

algumas passagens que fundamentam as metodologias de análise, bem como o artigo publicado durante o trabalho de doutoramento.

Capítulo 2

DNA

Este é um capítulo que se destina a apresentar um pouco de conhecimento sobre aquela que é a molécula na qual todo o nosso trabalho se apoia. Como temos a sorte de trabalhar com uma molécula que tem papel crucial em sistemas biológicos, podemos até dizer que este capítulo trata de um assunto no qual a própria vida se apoia. Não podemos afirmar que o DNA é a molécula mais importante de sistemas vivos, pois, ele desempenha importantes funções em conjunto com o RNA, as proteínas e algumas moléculas de açúcares e lipídeos. Juntos eles desempenham funções de fabricação, controle, armazenamento, logística, manutenção e outros dos quais quaisquer sistemas biológicos são dependentes. Há muito que a ciência discute sobre quais destes é o elemento mais importante e parece que recentemente se aponta para o RNA como o principal. Fato é, que a verdadeira fábrica viva de construção molecular não funciona caso algum deles não execute sua função. Pode-se afirmar que o DNA é de relevância supradestacada, pois, a partir dele se determina o tipo de ser que se formará, o que este ser carrega de informação sobre seus antepassados e o que transmitirá ao futuro de sua espécie. Através do DNA pode-se inclusive até consertar defeitos de fabricação e manutenção deste ser, por intermédio de tratamentos variados. O DNA é o codificador de informação da vida.

Embora de modo simples e muito específico, neste capítulo contaremos um pouco da história do DNA. Abordaremos aqueles que, ao nosso ver, são conteúdos fundamentais a se conhecer sobre a molécula do DNA. Assim nos preocupamos em discorrer um pouco sobre a importância de seu estudo, mostrando a estrutura e alguns de seus principais aspectos biológicos. Além disso, abordamos alguns conceitos matemáticos que envolvem a descrição energética dos processos de conformação e de estruturação do DNA.

2.1 Breve Relato Histórico e Importância

O ácido desoxirribonucleico (ADN) ou, como é mais conhecido por sua sigla em inglês, DNA, é o responsável pela transmissão dos caracteres através das gerações. As estruturas dos sistemas biológicos de maiores complexidades, em geral, são compostas por muitas células, variando desde 1 até ordens de 10^9 células, e nos sistemas celulares o DNA é uma unidade central de controle. Ele é sozinho o armazenador do conjunto de informação genética e o programa que processa e transmite tais informações. As informações transmitidas e presentes no DNA de um novo ser desempenham, cada uma dentro de sua própria célula, um conjunto de funções específicas, ligadas às produções e ao controle de proteínas. Esta organização designa a estrutura e a funcionalidade das células. São muitas as funções e participações do DNA na estrutura e funcionamento das células, mas, para o interesse deste trabalho, as notáveis características citadas já são suficientes para que se julgue ser o estudo do DNA de muita relevância e que o conhecimento proporcionado pelas inúmeras técnicas capazes de aperfeiçoar a compreensão a respeito do DNA seja de fato muito estimulante e de grande fascínio.

A ciência buscou por muitos anos compreender de que forma se davam as transmissões dos caracteres genéticos. Em função da complexidade do assunto e do enorme número de detalhes contidos em tais processos, a comunidade científica julgou durante longo período que seriam as proteínas as responsáveis por estes processos. As proteínas são em grande número e estão disponíveis em variadas estruturas, que combinadas responderiam bem pela grande variabilidade genética.

Entretanto, os estudos levaram ao reconhecimento do verdadeiro responsável por aquelas funções. O DNA, uma estrutura bem mais simples com unidades repetidas e combinadas, que respondem adequadamente pela enorme gama de variações.

O gatilho inicial para a compreensão do DNA foi disparado por um monge, Gregor J. Mendel, o qual recebeu a atribuição pela descoberta de que a hereditariedade é fruto de unidades específicas, que não as proteínas. Estudioso e muito observador das características presentes em plantas e algumas espécies de abelhas, ele reconheceu que tais características são referidas aos genes, unidades elementares da hereditariedade.

No entanto, a descoberta do DNA é merecidamente referida a um jovem médico suíço, que também era fisiólogo e químico orgânico de nome Friederich Miescher, que em 1869 [12, 20] conseguiu isolar uma substância do núcleo do material genético de leucócitos, que ele chamou de nucleína. Embora à época se conhecesse uma grande quantidade de proteínas, o material encontrado por ele se distinguia de todo grupo conhecido até então. O material apresentava uma grande quantidade de fósforo, que não se encontram nas proteínas. O ceticismo científico da época sobre suas descobertas o levou a trabalhar arduamente naqueles novos tipos de moléculas

orgânicas, para identificá-las e diferenciá-las das proteínas.

Dois contemporâneos de Friedrich Miescher, Albrecht Kossel e Richard Altmann, tendo sido este último aluno de Miescher, somaram contribuições significativas às descobertas daquelas novas moléculas. Kossel identificou as bases nitrogenadas e Altmann descobriu a natureza ácida do material, sendo inclusive responsável pelo termo *ácido nucleico*. Algum tempo depois o médico e bioquímico russo-estadunidense, Phoebus Aaron Levene, propôs o modelo de nucleotídeo como sendo composto por um grupo fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada. Na metade do século XX, surgiram as regras de Chargaff, um conjunto de normas para se compreender as distribuições das bases nitrogenadas no DNA, criadas pelo bioquímico austríaco Erwin Chargaff, que mais tarde ajudariam a elucidar a verdadeira estrutura do DNA [12].

Nesta época estabeleceu-se uma corrida pelas próximas descobertas para elucidar a estrutura do DNA. Uma especialista na técnica de cristalografia de raios-x, a biofísica britânica Rosalind Franklin, colaboradora nas pesquisas conduzidas pelo fisiologista neozelandês Maurice Wilkins, foi capaz de obter imagens em alta resolução numa difração de raios-x da molécula de DNA. Os trabalhos com as regras de Chargaff e o das imagens de Rosalind Franklin eram o que faltavam para que dois cientistas também interessados na estrutura do DNA, James Watson (Biólogo) e Francis Crick (Físico), pudessem propor um modelo para a estrutura da molécula de DNA. O trabalho foi publicado em 1953 e rendeu o prêmio nobel de medicina de 1962 [10, 11]. Desta época em diante, apoiadas na estrutura do DNA, as pesquisas na área da genética avançaram enormemente, alcançando muitas áreas da ciência e fazendo com que despontassem muitas novas técnicas para estudar os diversos temas ligados ao DNA, desde formas básicas para a transmissão de informação genética até manipulação de genes [12, 20].

2.2 Estruturação da Cadeia

Watson e Crick depositaram na modelagem suas expectativas para desvendar a estrutura do DNA. A proposta final é o modelo hoje conhecido como o modelo da dupla hélice, a qual tem na parte externa da hélice grupos fosfatos e internamente, açúcar e bases nitrogenadas. Esta dupla hélice pode ser comparada a uma escada torcida, onde os grupos fosfatos se assemelham ao corrimão da escada e as bases fazem o papel dos degraus.

O DNA é um biopolímero, tendo como monômeros os nucleotídeos, constituídos de um grupo fosfato, um açúcar pentose do tipo desoxirribose e uma base nitrogenada. A figura 2.1 revela o esquema básico do nucleotídeo. A complexidade do biopolímero DNA, bem como sua capacidade de variação e armazenagem da informação genética, reside na repetição de seus

monômeros e no modo sequencial destes.

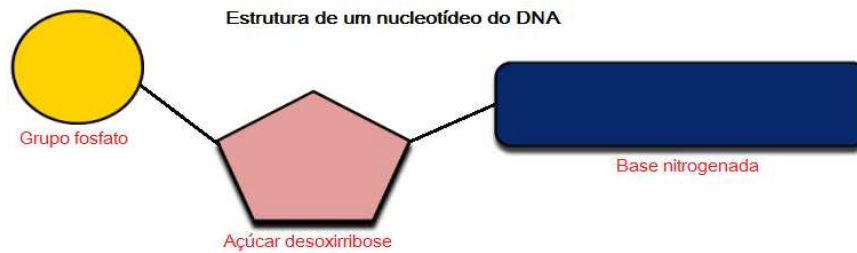


Figura 2.1: **Diagrama do nucleotídeo.** Estrutura de um nucleotídeo do DNA, com um grupo fosfato, um açúcar do tipo pentose (desoxirribose) e uma base nitrogenada.

Duas ligações covalentes ocorrem para manter o nucleotídeo, uma éster entre o grupo fosfato e o açúcar pentose e outra glicosídica unindo a base nitrogenada e o açúcar desoxirribose. No DNA, há quatro tipos diferentes de bases nitrogenadas: adenina (A) e guanina (G), formando o grupo das purinas, e timina (T) e citosina (C), formando o grupo das pirimidinas, vistas na figura 2.2.

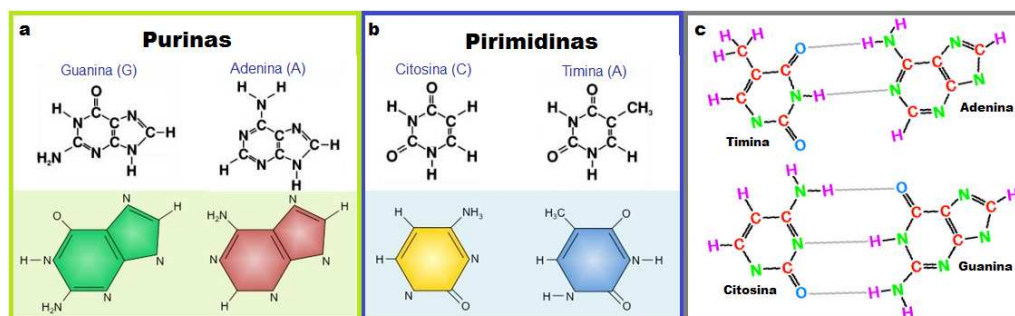


Figura 2.2: **Bases nitrogenadas** (a) Purinas e suas estruturas em anéis; (b) Pirimidinas e suas estruturas em anéis; (c) Ligações entre as purinas e pirimidinas.

A polimerização necessária para formar a cadeia é feita pela união dos nucleotídeos, que ocorre por uma ligação covalente fosfodiéster entre um grupo fosfato de uma base e um açúcar de outra base. O grupo fosfato do primeiro nucleotídeo se liga ao carbono 3' da pentose do segundo nucleotídeo e assim de modo sucessivo o fazem os próximos nucleotídeos. Como visto na figura 2.3, fica então estabelecida a direção 5' \rightarrow 3' como a direção de crescimento da cadeia de DNA.

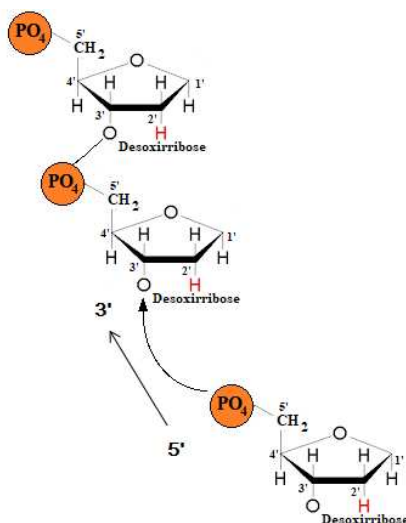


Figura 2.3: **Esquema da direção de crescimento da cadeia.** O carbono 5' de uma pentose (desoxirribose) se liga a um grupo fosfato que por sua vez se liga ao carbono 3' de uma outra desoxirribose.

A cadeia assim formada permite uma série de rotações entre as ligações, o que gera flexibilidade à cadeia. As maiores possibilidades de torções localizam-se entre as ligações fosfodiéster e a glicosídica. Com adequada flexibilidade e interação com histonas por exemplo, a cadeia consegue se conformar no meio onde se encontrar e até atingir os empacotamentos necessários exigidos pelo meio intracelular. Para a formação da dupla hélice serão formadas duas fitas nas condições citadas, com uma delas crescendo no sentido oposto da outra, ou seja, elas são antiparalelas, o que pode ser conferido na figura 2.4(a). As duas fitas se complementam e se unem pelas bases nitrogenadas, sempre com a conexão de uma purina a uma pirimidina. Assim teremos uma citosina ligada a uma guanina e adenina ligada a timina, como pode ser visto nas figuras 2.2 e 2.4(a). A união entre as bases é feita por ligações de hidrogênio e a complementação das fitas ocorrerá seguindo as regras de Chargaff, de tal forma que:

$$T = A, \text{ igualdade entre timinas e adeninas.} \quad (2.1)$$

$$C = G, \text{ igualdade entre citosinas e guaninas.} \quad (2.2)$$

$$A + G = T + C, \text{ igualdade entre purinas e pirimidinas.} \quad (2.3)$$

A união das duas fitas também gera uma torção e esta torção conforma o DNA na dupla hélice. Embora o tamanho do DNA possa variar, o diâmetro é bastante uniforme, pois os pares de base são de tamanhos e dimensões semelhantes [13,21,22]. Na conformação em dupla hélice, esquematizada na figura 2.4(b), há distanciamentos padrões entre os pares de bases de 0,334 nm e a cada 10,1 pares de bases se alcança um giro completo na hélice. Por giro completo encontram-se duas fendas na hélice e as duas tem dimensões diferentes. A fenda de maior

2.3 Conformações do DNA

O DNA tem uma forma mais comum de se conformar em solução com condições de concentração de sal fisiológica e em pH neutro, que é a forma conhecida como B-DNA, usada em nossos experimentos. Esta forma possui giro para a direita e é a forma descrita pelo modelo de Watson e Crick, o qual já enfatizamos. Entretanto, duas outras formas de conformação da dupla hélice são possíveis: elas são as formas A-DNA e Z-DNA. Entre as formas há diferenças no passo da hélice, no diâmetro e até no sentido de giro da hélice. A figura 2.5 nos mostra que essas diferenças são bastante notáveis.

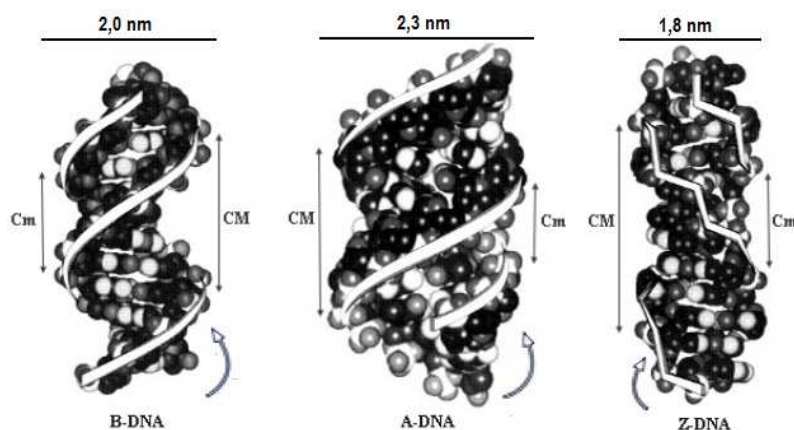


Figura 2.5: **Tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas.** Note diferenças no sentido de giro, na espessura e nas dimensões das fendas. C_m representa a cavidade menor e CM a cavidade maior. Adaptada da referência [24]

As formas A-DNA e B-DNA possuem similaridade no sentido de giro da hélice, que são para a direita, enquanto a forma Z-DNA apresenta o giro para a esquerda. Existe uma diferença no número de pares de base que compõem uma volta completa, correspondente ao passo da hélice. Na forma Z-DNA são 12 pares de base por volta, na forma A-DNA são 11 e na forma B-DNA são 10. A conformação pode ser ditada pelas condições do meio; por exemplo, ambientes desidratados conformam a dupla hélice no tipo A-DNA, e certos tipos de solventes orgânicos e até proteínas são capazes de forçar o DNA a se conformar nas formas A e Z. A presença de grande quantidade de cátion em solução leva o DNA a se conformar no tipo Z-DNA. Como visto na figura 2.5, há também diferenças no diâmetro nas diferentes formas de conformação, sendo o DNA mais espesso na forma A-DNA, como se sofresse um achatamento nesta forma. Essas diferenças de espessura e quantidade de pares de base por volta induzem diferenciação

nas dimensões das fendas [25].

2.4 Propriedades e características poliméricas do DNA

O polímero é uma macromolécula que se desenvolve a partir da união de várias unidades estruturais menores, denominadas monômeros. Para o DNA de fita simples os monômeros são os nucleotídeos, e embora no DNA de fita dupla, os nucleotídeos também se repitam como as menores unidades estruturais, os pares de base também se repetem e podem ser tomados como os monômeros. Foi levemente discutido nas seções anteriores que o DNA exhibe diferentes tipos de modos conformacionais e possíveis empacotamentos, o que o torna uma cadeia passível de muitas dobras [21], ou seja, que o DNA exhibe certa flexibilidade, ou, visto de outra forma, certa rigidez. A flexibilidade, ou rigidez, é uma típica propriedade dos polímeros usada no estudo deles. Diferentes tipos de DNA irão apresentar tamanhos variados, mas em geral a rigidez deste tipo de molécula é a mesma, afinal sua composição básica (nucleotídeos) é a mesma. Há uma configuração energética entre molécula e o meio no qual se encontra que está expressa no modo conformacional da molécula. Retirar a molécula desta conformação demanda uso de forças que são capazes de induzir distensões, compressões ou ainda rotações na molécula polimérica, com consequentes gastos energéticos [23]. Como o DNA é um biopolímero estudaremos nesta seção as propriedades e características poliméricas de interesse a este estudo.

2.4.1 Energia de configuração da cadeia: o modelo de Kratky-Porod

O modelo de Kratky-Porod é um modelo capaz de descrever estados intermediários entre dois extremos de uma cadeia, de uma haste rígida a uma cadeia perfeitamente flexível de rotação livre (cadeia Gaussiana) [21, 24]. Vamos descrever sua formulação nesta subseção e assim verificar as características do DNA como uma cadeia polimérica semiflexível.

A expressão 2.4 denota a energia envolvida na deformação de uma haste rígida, mostrada na figura 2.6, supondo que ela será forçada a tomar a forma de um semicírculo;

$$E_{curv} = \frac{1}{2} k_f L_c C^2, \quad (2.4)$$

onde k_f é a intensidade da rigidez flexional da haste, L_c retrata o tamanho desta haste e C^2 é o quadrado da curvatura à qual a haste pode ser submetida.

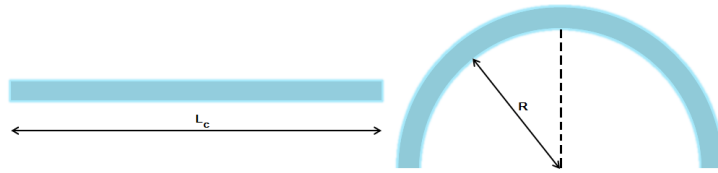


Figura 2.6: **Curvatura da haste.** Deformação de uma haste inicialmente retilínea em um semi-círculo.

Tomando δ uma longa curva aleatória de comprimento total L_c , formada por N segmentos de comprimento s em que $0 < s < L_c$ e vista na figura 2.7, estenderemos os conceitos aplicados à expressão 2.4 para desenvolvermos a matemática do modelo de Kratky-Porod para quaisquer curvas arbitrárias δ .

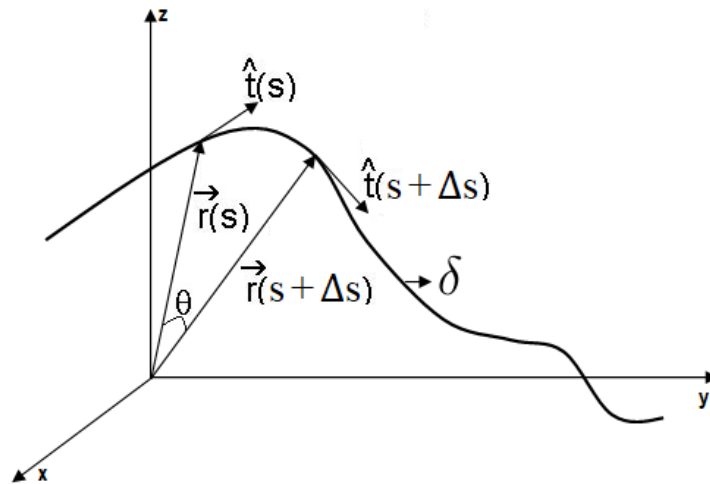


Figura 2.7: **Curva arbitrária.** Curva aleatória δ mostrando a mudança dos vetores posição no espaço, dados por $\vec{r}(s)$.

Na figura 2.7 podemos ver os vetores posição que localizam pontos quaisquer da curva, $\vec{r}(s)$, e também os vetores unitários tangentes à curva nos mesmos pontos localizados, $\hat{t}(s)$. Pelo cálculo vetorial temos a seguinte definição do vetor unitário $\hat{t}(s)$;

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}. \tag{2.5}$$

Ao se tomar um segmento qualquer ao longo da curva aleatória δ , que seja delimitado pelos vetores $\vec{r}(s)$ e $\vec{r}(s + \Delta s)$, este segmento definirá um elemento de arco que é dado por:

$$ds = R d\theta \implies \frac{1}{R} = \frac{\partial \theta}{\partial s} \tag{2.6}$$

cuja curvatura pode ser calculada por:

$$C = \left| \frac{1}{R} \hat{n} \right|, \quad (2.7)$$

onde \hat{n} é o vetor unitário na direção do raio do elemento de arco gerado pela deformação da haste rígida (vista na figura 2.6). Assim, podemos construir a relação entre a curvatura C e os vetores posição $\vec{r}(s)$ da seguinte forma:

$$C = \left| \frac{1}{R} \hat{n} \right| = \left| \frac{\partial \theta}{\partial s} \frac{\partial \hat{t}}{\partial \theta} \right| = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right|, \quad (2.8)$$

Sendo a equação acima válida para cada elemento de arco ao longo da curva arbitrária δ , podemos calcular a curvatura total somando todos os elementos de arco. Assim, integrando a equação 2.8 em todo o comprimento da curva δ e substituindo na equação 2.4, obteremos a expressão que é a proposta do modelo de Kratky-Porod para a contabilização de energia de curvatura de vários segmentos de hastes rígidas (s), de tamanhos infinitesimais, ao longo de curvas arbitrárias:

$$E_{KP} = \frac{1}{2} k_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right|^2 ds. \quad (2.9)$$

Este modelo energético, considerando uma cadeia como uma sucessão de segmentos dotados de alguma flexibilidade, consegue descrever a configuração de energia envolvida na conformação do DNA no devido meio em que se encontra. Assim, levando em conta estes cálculos iniciais com as próximas seções podemos descrever matematicamente o DNA como um polímero semiflexível.

2.4.2 Elasticidade no Regime Entrópico

O DNA está todo o tempo imerso em algum tipo de solução, esteja ele no meio intracelular ou mantido em algum outro meio externo. Este fato o torna sujeito ao dinamismo do meio, com uma constante busca pelo equilíbrio termodinâmico. Os choques com as partículas do meio, sofridos por uma cadeia longa e composta por pequenos segmentos, obriga a cadeia a se conformar de acordo com a permissão de sua rigidez flexional e de sua constante agitação no meio. Uma vez que a cadeia não se desconfigure, as muitas conformações possíveis serão apenas de caráter entrópico. Por ser uma cadeia biopolimérica de certa flexibilidade, com comprimento de contorno bem definido L_c , o DNA variará sua entropia em solução [26, 27]. A variação tenderá a um valor mínimo de zero quando a configuração se aproximar de uma haste rígida, mas tenderá a valores máximos quando estiver em configurações com infinitas dobras, conforme ilustra

a figura 2.8, que retrata o fato de que a maximização da entropia indica que a molécula atingiu uma configuração de equilíbrio com o meio.

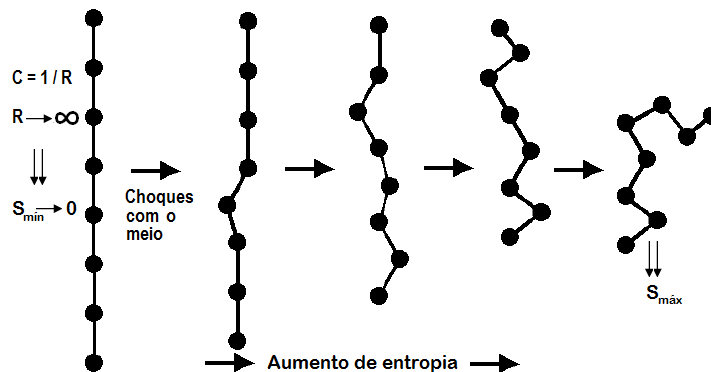


Figura 2.8: **Aumento de entropia do DNA em solução.** A molécula inicialmente estirada sofre colisões com o meio e atinge uma configuração de equilíbrio de maior entropia. Adaptado da referência [26]

Notemos, entretanto, que a configuração de entropia nula só seria atingido num sólido perfeitamente cristalino na temperatura do zero absoluto, de acordo com a terceira lei da termodinâmica. A entropia aqui, com valor mínimo de zero, está somente referenciando o fato de uma cadeia polimérica sujeita à constante agitação do meio, mas que com rigidez elevada não muda sua configuração neste meio.

A partir da equação da entropia,

$$S = k_B \ln \Omega, \quad (2.10)$$

onde Ω é o número de estados possíveis e k_B a constante de Boltzmann, vemos que a distância ponta a ponta do biopolímero com a haste rígida é o próprio comprimento de contorno L_c e a entropia é nula pois;

$$\lim_{\Omega \rightarrow 1} S(\Omega) = 0. \quad (2.11)$$

Entretanto, os choques com as partículas do meio aumentam o número de configurações possíveis do biopolímero, resultando no aumento da entropia. Se os choques não causarem deformações nas propriedades estruturais da molécula, saberemos que as muitas conformações possíveis serão resultados de elasticidade devido à entropia do sistema molécula-meio. Embora, nos nossos trabalhos observamos a interação da molécula de DNA com vários ligantes, nenhum deles é capaz de provocar deformações estruturais na mesma. Assim, não se têm rompimentos das ligações que mantêm os monômeros, nem a dupla fita, de tal forma que se atinja uma resposta de elasticidade entálpica. Desta forma, podemos afirmar que nossas condições de trabalho nos restringem ao regime entrópico de forças.

Aplicando forças às extremidades do DNA o forçaremos até que fique totalmente estirado, como na figura 2.9, no qual o comprimento é o próprio comprimento de contorno (L_c) da

molécula. Neste caso há um gasto energético para estirar e manter a molécula neste estado. Uma vez interrompido o regime de forças, a molécula voltará a uma configuração de equilíbrio, conforme a discussão precedente sobre elasticidade.

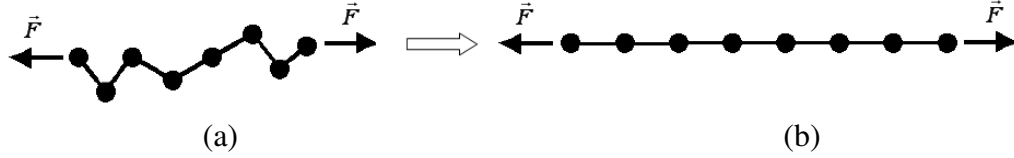


Figura 2.9: **Forças no regime entrópico.** Para estirar e manter o DNA esticado sem destruí-lo precisamos aplicar forças dentro do regime entrópico. (a) O DNA começando a ser esticado, (b) DNA mantido esticado. Adaptado da referencia [26]

Neste ponto é então importante que saibamos como tirar uma medida da elasticidade entrópica da molécula de DNA em solução. A grandeza que pode fornecer esta medida é o comprimento de persistência (A), que é a medida da rigidez ou da flexibilidade de moléculas poliméricas. Reanalizando a figura 2.7, consideremos um pequeno arco s , de ângulo θ , formado entre dois valores consecutivos de $\hat{t}(s)$ para posições arbitrárias quaisquer ao longo da curva δ ; lembrando o valor do elemento de arco $s = R\theta$ a energia de curvatura deste arco é dada por:

$$E_{arc} = \frac{k_f s}{2 R^2} = \frac{k_f \theta^2}{2 s}. \quad (2.12)$$

O valor quadrático médio do ângulo θ calcula o intervalo de valores possíveis para o ângulo θ , considerando a variação das flutuações na curvatura desse arco. Este valor é definido por:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E) d\Omega}{\int \exp(-\beta E) d\Omega}, \quad (2.13)$$

onde $d\Omega = \sin \theta d\theta d\phi$ é o elemento de ângulo sólido e $\beta = 1/k_B T$, em que T é a temperatura absoluta. A integração considerando pequenos valores para s leva a:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2 s}{\beta k_f}, \quad (2.14)$$

de onde extraímos que a medida do comprimento de persistência do polímero pode ser definida como:

$$A = \beta k_f. \quad (2.15)$$

O comprimento de persistência é, portanto, uma grandeza diretamente proporcional à rigidez flexional do polímero e inversamente proporcional à temperatura absoluta. Quanto maior T mais choques da molécula com o meio, gerando maiores torções e dobras. A molécula irá então se conformar o mais próximo possível da haste rígida se k_f tiver um valor muito alto.

Caso k_f tenha pequenos valores, a molécula é fortemente comprimida. Assim, entendemos o comprimento de persistência (A) como a medida da rigidez, ou da flexibilidade, da molécula.

2.4.3 Haste continuamente flexível - modelo WLC

O modelo da cadeia vermiforme (worm-like chain) consiste da consideração de gastos energéticos na aplicação de forças externas para tensionar um polímero dotado de alguma flexibilidade. Ele é capaz de considerar a energia envolvida tanto no estiramento para começar a retirar o polímero da configuração de equilíbrio, quanto para a distensão do mesmo longe desta conformação. Ele é uma aplicação do modelo de Kratky-Porod e enxerga o polímero como uma fina haste continuamente elástica. A submissão do polímero a um estiramento onde as forças envolvidas estão dentro do regime entrópico pode ser perfeitamente descrito pelo WLC. Assim, ele é muito preciso para forças da ordem de $\sim 5 pN$, o que o torna adequado às nossas análises experimentais, pois consideramos forças dentro do regime entrópico de até $\sim 3 pN$. Tomado um polímero de comprimento de contorno L_c , o uso do WLC possui uma limitação para quando o polímero atinge o valor $0,9L_c$ devido a uma divergência quando $z = L_c$.

O modelo WLC aqui descrito é desenvolvido em três passos. O primeiro deles considera a energia envolvida em casos de pequenos estiramentos, ou seja, na situação na qual o polímero está próximo de sua conformação de equilíbrio. O segundo aborda exatamente a situação oposta, ou seja, o polímero está longe de sua conformação de equilíbrio, aproximando do limite máximo do estiramento contido pelo modelo. No último passo, acontece a junção dos limites mínimos e máximos de estiramento, em que se faz uma interpolação para que qualquer situação seja prevista pelo modelo. A interpolação resulta na expressão de Marko e Siggia do modelo da cadeia vermiforme.

2.4.3.1 Estiramentos mínimos no WLC

Na situação de pequenos estiramentos, a baixa intensidade das forças permite que se compreenda a elasticidade através da lei de Hooke. Considerando então os pequenos estiramentos tem-se que:

$$F = -kz, \quad (2.16)$$

onde k é a constante elástica e z é uma medida do estiramento do polímero.

Para se obter o valor da força primeiramente estimam-se os valores de k e z . Na conformação o polímero tem suas extremidades separadas por uma distância (r_{ee}) e à medida que se

estira o polímero esta distância é alterada. Pode-se então estimar a extensão do polímero através da média quadrática da distância entre as extremidades $\langle r_{ee}^2 \rangle$, cujos cálculos podem ser conferidos no *apêndice A*. A estimativa para pequenos estiramentos é então feita considerando que o comprimento de persistência do polímero é muito menor que o do contorno ($A \ll L$), de onde se obtém:

$$z \cong \sqrt{2 A L_c}. \quad (2.17)$$

Quando o polímero está próximo da conformação de equilíbrio, a energia envolvida é da ordem de $k_B T$ e pelo princípio da equipartição da energia, tem-se que:

$$\frac{3}{2} k_B T = \frac{1}{2} k z^2 \implies k = \frac{3 k_B T}{z^2}. \quad (2.18)$$

Substituindo-se o valor z da equação 2.17 na equação acima e então substituindo o valor encontrado para k na expressão 2.16, obtém-se a expressão da força estimada para pequenos estiramentos:

$$F = -\frac{3 k_B T}{2 A} \frac{z}{L_c}. \quad (2.19)$$

2.4.3.2 Estiramentos máximos no WLC

Quando o estiramento do polímero for grande o suficiente para que se alcance uma condição longe da conformação de equilíbrio, não será mais adequada a estimativa da elasticidade pela Lei de Hooke. Usamos então as considerações energéticas construídas no modelo de Kratky-Porod, com uma condição extra de corrigir a expressão retirando o trabalho executado pela força necessária para manter a molécula totalmente estirada. Logo:

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz, \quad (2.20)$$

onde os parâmetros já foram todos definidos na descrição da subseção 2.4.1 e F é a força que mantém a molécula estirada. Da mesma forma que foi necessário fazer a estimativa da distância ponta a ponta do polímero para pequenos estiramentos dispondo da média quadrática da distância entre as extremidades $\langle r_{ee}^2 \rangle$ (*vide apêndice A*), também faremos para o caso em que o estiramento chega próximo do limite, ou seja;

$$z \sim L_c. \quad (2.21)$$

Nesta situação o DNA estará totalmente estirado e qualquer vetor unitário $\hat{t}(s)$ ao longo do polímero, será praticamente paralelo à curva $\vec{r}(s)$ que descreve a conformação da molécula. Com a componente t_z deste vetor definida ao longo da própria extensão z do polímero, ela se manterá praticamente constante e terá valor muito maior que as componentes t_x e t_y .

Sendo assim, o módulo do vetor $\hat{t}(s)$, definido por $t^2 = t_z^2 + t_x^2 + t_y^2 = 1$, tendo as componentes x e y pequenas e praticamente perpendiculares a $\vec{r}(s)$, implica que $t_x^2 + t_y^2 = t_\perp^2$ e portanto;

$$t_z = \sqrt{1 - t_\perp^2}. \quad (2.22)$$

Podemos então fazer uma expansão desta expressão e como $t_\perp^2 \ll 1$ por causa do valor de suas componentes, é bastante razoável tomar uma aproximação de primeira ordem que leva a;

$$t_z \cong 1 - \frac{t_\perp^2}{2}. \quad (2.23)$$

Mas a expansão e conseqüente aproximações anteriores são também usadas na estimativa da extensão do estiramento do polímero, conforme cálculos no *apêndice A*, gerando o resultado;

$$z \cong \int_0^{L_c} t_z(s) ds. \quad (2.24)$$

Ainda, devido ao fato de t_z ser considerado praticamente constante ao longo da curva que define o polímero, podemos substituir $\partial t / \partial s$ por $\partial t_\perp / \partial s$ na equação 2.20, que junto com os resultados das aproximações em 2.23 e 2.24 também incluídos fornece:

$$\begin{aligned} E_{WLC} &= \frac{1}{2} k_B T A \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}_\perp}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^{L_c} \left(1 - \frac{t_\perp^2}{2} \right) ds = \\ &= \frac{1}{2} k_B T \int_0^{L_c} \left[A \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - F L_c. \end{aligned} \quad (2.25)$$

Analisando a equação acima, sabemos que há uma energia associada a cada modo normal de vibração, então pode-se aplicar a transformada de Fourier para decompor a energia total em seus modos normais. Usando então a definição;

$$\tilde{t}_\perp(q) = \int \exp(iqs) t_\perp(s) ds, \quad (2.26)$$

e substituindo em 2.25 chega-se em uma expressão de energia dado por;

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_B T \int \frac{1}{2\pi} \left[A q^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_\perp|^2 dq - F L_c. \quad (2.27)$$

Uma expressão que possui uma relevância especial, pois a partir dela pode-se calcular o valor quadrático médio de t_{\perp} (cálculo detalhado na referência [23]), é:

$$\langle t_{\perp}^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{F A}}. \quad (2.28)$$

Como o estiramento praticamente lineariza o polímero, z está praticamente sobreposto ao comprimento de contorno L_c , logo a divisão do estiramento pelo contorno (z/L_c) resultará na componente escalar ao longo de z do vetor unitário, ou seja, $z/L_c \cong t_z$ que por sua vez leva a:

$$\frac{z}{L_c} \cong 1 - \frac{t_{\perp}^2}{2} \implies \frac{z}{L_c} \cong 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{F A}}, \quad (2.29)$$

de onde, com um rearranjo de termos, obtemos a expressão final para a força em função da extensão $F(z)$, considerando os estiramentos máximos do polímero:

$$F = \frac{1}{4} \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L_c}\right)^2} \right]. \quad (2.30)$$

2.4.3.3 Expressão de Marko e Siggia

As expressões 2.19 e 2.30 obtidas são válidas para pequenos e longos estiramentos, respectivamente. Uma expansão em primeira ordem da última expressão deveria levar à primeira, caso esta fosse também válida para pequenos estiramentos. Como não é o caso, a expansão de 2.30 não possibilita encontrar 2.19 diretamente. A solução foi proposta por Marko e Siggia [28], que fizeram uma interpolação dos seguintes dois termos (z/L_c) e $(-1/4)$ na expressão de grandes estiramentos. Neste caso, o estiramento tende ao comprimento de contorno ($z \sim L_c$) e a subtração de $1/4$ é muito pequena, assim os dois termos tornam-se insignificantes. Desta forma obtém-se finalmente uma expressão para estiramentos no regime WLC, capaz de incluir os estiramentos para próximo e longe da conformação de equilíbrio, dentro do regime entrópico e respeitando o limite de que z não ultrapasse $0,90L_c$ [23, 24, 28, 29]:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L_c} + \frac{1}{4\left(1 - \frac{z}{L_c}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (2.31)$$

Assim como ela é válida para grandes estiramentos, a expansão em primeira ordem desta expressão geral, leva à obtenção de uma expressão de força também válida para pequenos estiramentos.

2.5 λ – DNA

Usamos o DNA do bacteriófago λ em nossos experimentos. Nas nossas condições iniciais de trabalho o λ – DNA estava conformado em dupla fita na forma B. Aqui dizemos “iniciais” pois o DNA foi submetido a concentrações altas de ligantes que poderiam induzir outras conformações ao DNA; no entanto, em nosso trabalho não tínhamos como finalidade observar se as mudanças conformacionais ocorreram ou não. O bacteriófago λ é um vírus que infecta a bactéria *Escherichia Coli* e é adequado aos nossos experimentos por causa de seu tamanho.

Este DNA possui medidas padrões para os comprimentos de contorno e persistência. Com 48.500 pares de base, o λ – DNA possui comprimento de contorno (L_c), comprimento médio ponta a ponta, da ordem de $16,5 \mu m$ ($L_c \approx 16,5 \times 10^{-6} m$), enquanto o comprimento de persistência (A) tem valor aproximado de $50 nm$ ($A \approx 50 \times 10^{-9} m$) [14, 23, 30–32].

2.6 Equilíbrio químico nas interações DNA-Ligantes

Nesta seção será apresentada uma pequena formulação matemática sobre o equilíbrio químico relacionado às interações DNA-ligantes, necessária para os desenvolvimentos deste tipo de estudo. Descreve-se nesta seção, dois importantes modelos que tratam deste tipo de equilíbrio, o modelo de Hill e o modelo de McGee-von Hippel, além de indiretamente tratar do modelo de Scatchard.

Devido à estrutura, composição e conformação do DNA os ligantes podem se ligar a ele de múltiplos modos. A ligação pode se dar numa interação de natureza eletrostática entre o DNA e o ligante, pode ser interação que leva os ligantes ao encaixe entre os pares de base, também que leve ao encaixe deles entre as fendas do DNA, existentes devido ao giro da hélice bem como do tipo de pares (GC ou AT) nessas fendas. Além disso, todas as formas de interação ainda podem ocorrer simultaneamente. O conhecimento de parâmetros físico-químicos apresentados nesta seção ajudam a compreender o modo de ligação das moléculas ligantes ao DNA.

No interior celular o DNA interage com muitas substâncias de forma espontânea e todas as interações são regidas por condições de equilíbrios químicos e termodinâmicos. Estamos em busca da compreensão básica sobre o equilíbrio químico do sistema composto pelas moléculas de DNA e os ligantes. Sendo o DNA e o ligante duas partes distintas do sistema, da associação delas será gerada uma nova parte e juntas essas partes podem ser representadas simplificada-mente pela seguinte equação química:



onde A e B são as substâncias que passarão pela reação de associação e C é o produto desta reação. Os termos K_i e K_d são, respectivamente, as constantes químicas intrínsecas de associação e dissociação da reação, também conhecidas como constantes termodinâmicas ou macroscópicas e que são definidas em termos das concentrações molares de A e B , ou seja;

$$k_i = \frac{[C]}{[A][B]} \quad \text{e} \quad k_d = \frac{[A][B]}{[C]} = k_i^{-1}. \quad (2.33)$$

2.6.1 Cooperatividade no modelo de Hill

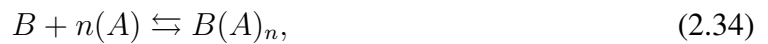
As reações anteriores foram apresentadas com uma simbologia generalizada. Para que se adéquem apropriadamente aos termos que estudamos, elas necessitam ser renomeadas. Deste modo tomemos a concentração de uma das partes reagentes como sendo a concentração dos ligantes livres em solução, ou seja: $[A] \equiv C_f$. Já a outra parte reagente é considerada a concentração de pares de base do DNA subtraída da concentração de ligantes ligados, ou seja: $[B] \equiv C_{bp} - C_b$, onde C_{bp} é a concentração de pares de base do DNA (uma constante do sistema). Finalmente, consideramos como o produto a concentração de ligantes ligados ao DNA, ou seja: $[C] \equiv C_b$.

Embora a reação 2.32 possa fornecer a constante de afinidade entre os reagentes, ela não considera casos em que uma associação ocorrida influencie na formação de uma nova associação. Esta reação simplificada é representada pelo modelo de Scatchard, formulada pelo químico americano George Scatchard, e ela considera que as associações são independentes umas das outras.

Nos sistemas nos quais estamos interessados, associação de ligantes ao DNA, muitas vezes uma associação apresenta dependência de outras, ou seja, a ocorrência de uma nova associação é influenciada pela ocorrência da associação anterior, que pode ser no sentido de uma facilitação ou dificuldade. Este modo de associações é englobado nos estudos realizados pelo fisiologista britânico Archibald Vivian Hill e é conhecido como modelo de ligação cooperativa, ou simplesmente modelo cooperativo de Hill.

O modelo surgiu para que se pudesse compreender a interação do oxigênio com a hemoglobina. As observações experimentais desta interação tinham dados que não se adequavam ao

equilíbrio previsto pelo modelo anterior. Assim A. V. Hill teve que considerar que os sítios de ligação pudessem admitir dois ou mais ligantes e, além disso, que após a associação do primeiro ligante, este então cooperaria com a ligação do próximo ligante, facilitando ou dificultando essa nova associação, ou na linguagem do modelo, cooperando positiva ou negativamente. Para ilustrar, imaginemos a seguinte reação:



em que a molécula reagente A pode se associar à molécula reagente B com n moléculas. No produto final a molécula B está associada com n moléculas de A. Essas reações químicas são representadas por uma constante de associação aparente k_A , que é definida como:

$$k_A = \frac{[B(A)_n]}{[B][A]^n}. \quad (2.35)$$

A constante aparente de ligação possui uma interpretação diferente da constante intrínseca. A constante intrínseca definida anteriormente representa a reação de uma única molécula de ligante com um único sítio de ligação do substrato, ao passo que a constante aparente representa uma reação em que n moléculas do ligante interagem com uma única molécula do substrato, ou seja, representa a reação global. Estas duas constantes serão idênticas no caso em que o substrato possua apenas um sítio de ligação. Para situações nas quais as ligações ocorram com uma molécula se associando após a outra e que cada associação tenha uma constante intrínseca igual à outra, será válida uma relação entre as constantes na qual;

$$k_A = k_i^n. \quad (2.36)$$

Desta forma pode-se reescrever a equação da constante aparente (k_A) em função dos termos em que foi escrita a relação da constante intrínseca (k_i), ou seja;

$$k_A = \frac{C_b}{C_f^n (C_{bp} - C_b)}. \quad (2.37)$$

Um valor de interesse no processo de ligação de ligantes aos sítios do DNA é a fração de sítios ligados. Esta fração é obtida tomando-se a razão entre a concentração de ligantes ligados pela concentração de pares de base do DNA, ou seja;

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}}. \quad (2.38)$$

Se dividirmos a equação 2.37 pelo número de pares de base do DNA, ou seja, por C_{bp} , veremos que o termo da fração de sítios ligados r está inserido na equação 2.37. Depois da divisão pode-se igualar o resultado obtido à equação 2.36, o que nos leva a obter:

$$k_i^n = \frac{r}{C_f^n(1-r)} \quad (2.39)$$

que devidamente rearranjada para r obtém-se:

$$r = \frac{(k_i C_f)^n}{1 + (k_i C_f)^n}. \quad (2.40)$$

Parte do que almejávamos com as considerações acima era chegar a esta equação para a fração de sítios ligados. Esta é a conhecida *equação de Hill* ou ainda *isoterma de ligação de Hill*. Nela o parâmetro n tem uma interpretação muito especial e é destacado como o *coeficiente de Hill* e será discutido à parte mais à frente. O termo “isoterma de ligação” ressalta a necessidade da ocorrência da associação sob temperatura constante. A constante intrínseca de ligação (k_i) é uma grandeza com grande variação em função da temperatura, o que restringe a equação de Hill. Graficamente a isoterma é uma curva que relaciona a fração ligada de ligante por substrato (r) com a concentração de ligante livre em solução (C_f). A determinação, experimental ou teórica, desta curva torna possível o conhecimento de propriedades físico-químicas do sistema em questão.

Está faltando uma consideração a mais para que possamos extrair todas as valiosas informações físico-químicas a partir da isoterma. Devemos considerar ainda que um ligante possa ocupar mais que um par de base do DNA, o que deixa a fração de sítios ligados com um valor máximo a ser atingido. Vamos considerar uma situação em que a solução encontra-se saturada e que o equilíbrio já foi atingido. Assim se ocorre uma ligação na qual o DNA está todo ocupado e com cada par de base ocupado exatamente por um ligante, temos que a fração de sítios ligados é 100%, ou seja, $r = 1$. Entretanto, como já dito existe a possibilidade em que o ligante ocupa mais que um par de base e assim o valor de r será menor que a unidade. Este fato ainda não havia sido considerado na elaboração acima da equação. No entanto, resolver essa ausência no modelo é simples, bastando que seja introduzido um termo que prevê uma fração máxima ligada, o qual é denotado por r_{max} . Desta forma, teremos uma equação mais geral, escrita como;

$$r = \frac{r_{max}(k_i C_f)^n}{1 + (k_i C_f)^n}. \quad (2.41)$$

Vamos agora enfatizar uma parte do modelo que dá a ele enorme relevância nas análises

de modos de ligação entre o DNA e seus ligantes: o coeficiente de Hill. Na figura 2.10, estão esboçadas uma série de curvas típicas para a fração de sítios ligados (r) como uma função da concentração de ligantes livres (C_f), considerando distintos valores de n . As curvas tiveram valores fixados para a constante de associação k_i e para a fração máxima de sítios ligados r_{max} , onde $k_i = 10^4 M^{-1}$ e $r_{max} = 1$.

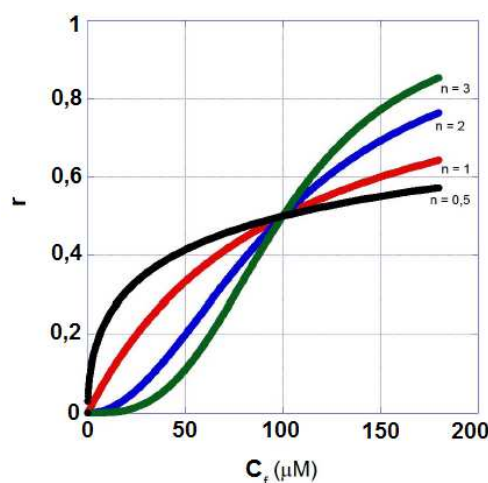


Figura 2.10: **Gráfico modelo para o coeficiente de Hill.** Alguns valores de n com valores fixos de $r_{max} = 1$ e $k_i = 10^4 M^{-1}$. Extraída das notas de aula do curso “Interação entre biomoléculas” de Márcio S. Rocha.

Para os diferentes valores do coeficiente de Hill (n), concluímos que a tendência a maiores valores leva a curva a saturar muito rapidamente, ou seja, o valor de $r_{max} = 1$ é atingido para valores mais baixos da concentração de ligantes quanto mais alto for o valor para o parâmetro n . Este fato implica ocorrer maior afinidade do ligante pelos sítios do DNA quanto maior for o valor de n . Assim fica claro como é analisada a cooperatividade do modelo de Hill quando vista a partir do parâmetro de cooperatividade, ou seja;

- i-* Se $n > 1$, há uma afinidade alta do ligante pelo substrato. Neste caso a primeira associação facilita a ocorrência das próximas. Classifica-se por **cooperatividade positiva**,
- ii-* Se $n < 1$, em geral, a afinidade do ligante pelo substrato é baixa. Mais especificamente após a primeira associação as próximas são dificultadas. Classifica-se por **cooperatividade negativa**,
- iii-* Se $n = 1$, não há aumento ou diminuição da afinidade do ligante pelo substrato após a primeira associação. As associações são independentes e classifica-se por **interação não-cooperativa**.

Podemos pensar na cooperatividade, a partir da exposição neste modelo, como um limite inferior para o número de sítios que efetivamente cooperam para as associações. Esta interpretação é de fato a mais aceita e usada na literatura para o coeficiente de Hill.

2.6.2 Exclusão de vizinhos no modelo de McGhee - von Hippel

Os pesquisadores James D. McGhee and Peter H. von Hippel [33] elaboraram um modelo teórico explicando a interação de ligantes que pudessem ocupar mais de um sítio ligável de uma rede unidimensional, que no nosso interesse é tomada como sendo a molécula de DNA. Para facilitar a visualização e compreensão, consideraremos como sítios ligáveis do DNA apenas os pares de base do mesmo.

O modelo é conhecido como modelo de exclusão de vizinhos, ou simplesmente modelo de McGee-von Hippel. Para a produção do modelo, os pesquisadores se basearam nas estatísticas de se encontrar ligantes aleatoriamente espalhados pela rede, considerando as probabilidades condicionais quanto às distribuições dos ligantes em relação aos sítios livres ligáveis e suas proximidades com outros ligantes ao longo da rede. Desta forma se empenharam em compor um modelo com equações que descrevessem a interação em termos da constante intrínseca de equilíbrio, dos tamanhos dos sítios de ligação e da cooperação entre os ligantes, relacionando tais termos às quantidades livres de ligante em solução e ao número de ligantes ligados à rede.

Ao cogitarmos o uso deste modelo para ajustar nossos dados experimentais com o ligante anticancerígeno doxorubicina, nós o consideramos para extrair os parâmetros físico-químicos de uma interação na qual a forma da curva na figura 6.8 mostra-se típica de um intercalante simples que não apresenta cooperatividade, para a interação ocorrendo no tampão Tris-HCl. Por isso abordaremos aqui apenas o modelo de exclusão de vizinhos sem cooperatividade.

2.6.2.1 Modelo de exclusão de vizinhos sem cooperatividade

Duas importantes generalizações iniciais são feitas na formulação do modelo, sendo uma delas relacionada à rede de ligação, considerando-a homogênea e unidimensional, e a outra relacionada aos ligantes, considerando que eles não possuem especificidade a sítios da rede. A não especificidade neste caso afirma que o ligante não tem par de base ou sequência de pares bases preferencial para a ligação.

Ainda são necessários alguns conceitos sobre rede e ligantes para a compreensão do mo-

delo. A rede, repleta de sítios livres ligáveis, é infinitamente longa, formada por um número grande de unidades repetidas e é considerada extensa o suficiente para que os efeitos de borda possam ser desprezados. Os ligantes, em geral, apresentam afinidades comparáveis pelos sítios do DNA, ou seja, com baixa variação da ordem de grandeza na constante de ligação.

À medida que as ligações vão ocorrendo, as distâncias entre duas moléculas consecutivas ligadas formam lacunas (gaps) nas quais novas ligações obedecerão a novas regras de probabilidades condicionais. Nas lacunas existe um número s de sítios ligáveis, dado por:

$$s = g - N + 1, \quad (2.42)$$

onde g é o número de sítios totais presente na lacuna (ou tamanho da lacuna) e N é o número de exclusão (número de sítios ocupados por uma molécula), como pode ser visto na figura 2.11;

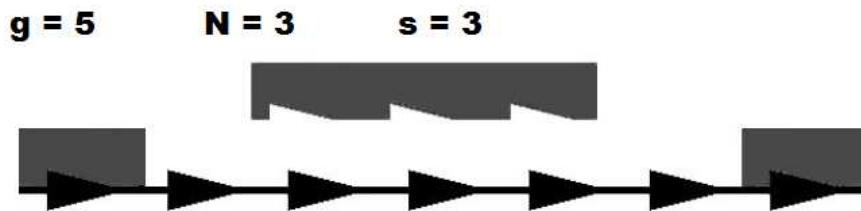


Figura 2.11: Tamanhos da lacuna e do número de exclusão.

Podemos generalizar o número de sítios ligáveis distribuído por lacuna ao longo do DNA por um número médio destes sítios (\bar{s}) ao considerarmos a probabilidade de uma lacuna particular possuir exatamente g sítios (P_g). Fazendo então a soma dos sítios ligáveis existentes ($\sum s$) pelas várias lacunas a serem preenchidas por ligações através da rede, obtém-se;

$$\bar{s} = \sum_{g=N}^{g_{max}} (g - N + 1) P_g, \quad (2.43)$$

em que o valor mínimo do somatório (N) é aquele no qual cabe exatamente um ligante na lacuna. Já o valor máximo (g_{max}) corresponde a uma lacuna que pode ser tão extensa quanto a própria rede, podendo ser a situação inicial na primeira ligação.

Há um processo de reação ocorrendo, que dentro de condições a volume constante, tenderá a um equilíbrio que pode ser resumido na expressão seguinte;

$$k_i = \frac{C_b}{C_f \bar{S}}, \quad (2.44)$$

onde k_i corresponde à constante de equilíbrio (ou constante intrínseca de ligação), C_f é o número de ligantes livres em solução, \bar{S} é o número médio total de sítios livres do DNA e C_b é o número de ligantes ligados.

Devido à unidimensionalidade da rede sempre se terá uma unidade a mais de lacunas em relação ao número de moléculas de ligantes ligadas, por isso o número médio total de sítios livres do DNA, \bar{S} , pode ser estimado como;

$$\bar{S} = (C_b + 1)\bar{s}, \quad (2.45)$$

A junção das equações 2.43, 2.44 e 2.45 gera uma equação a qual já pode ser dita como um modelo que considera ligações nas quais são ocupados mais de um sítio ligável de determinada rede. Mas como pode ser vista na expressão 2.46, ela está em função das probabilidades de ocorrência das ligações;

$$\frac{C_b}{C_f} = k_i(C_b + 1) \sum_{g=N}^{\infty} (g - N + 1)P_g, \quad (2.46)$$

em que g_{max} foi adequadamente substituído por ∞ .

Temos agora então que trabalhar a geração das probabilidades para que possamos derivar a famosa expressão fechada do modelo de exclusão de vizinhos.

Para tanto devemos ter em mente as probabilidades de ocorrência das ligações. Inicialmente temos sítios livres vizinhos, simbolizados por f (do inglês *free*). Depois da ocorrência de uma ligação inicial qualquer, haverá probabilidades de que em determinada lacuna se possa encontrar uma molécula ligada e o sítio vizinho a ela pode ou não estar ocupado. Caso encontremos a extremidade inicial da molécula ligada, que chamaremos de b_1 , tendo como vizinho anterior um sítio livre f , denotaremos esta probabilidade de $P\{f|b_1\}$. Caso encontremos a extremidade final de uma molécula, que chamaremos de b_N , tendo como vizinho posterior um sítio livre, denotaremos esta probabilidade de $P\{b_N|f\}$. E se dois sítios vizinhos forem livres, esta probabilidade será $P\{f|f\}$, o que ocorrerá $g - 1$ vezes. Assim a expressão geral da probabilidade será;

$$P_g = P\{f|b_1\} \times [P\{f|f\}]^{g-1} \times P\{b_N|f\}, \quad (2.47)$$

Para que possamos chegar à isoterma de ligação, as probabilidades devem ser expressas nos termos que governam a interação até o alcance do equilíbrio químico, ou seja, nos termos já apresentados como a constante de ligação k_i , o número de exclusão N , as concentrações de ligantes ligados e livres C_b e C_f , o número de sítios ligáveis do DNA, denotado por C_{bp} (concentração de pares de base do DNA).

Tomando-se um ponto sobre a isoterma de ligação, com C_b moléculas ligadas, teremos o produto $C_b N$ representando o número total de sítios ligados da rede. Assim a fração total ligada é $C_b N / C_{bp}$ ou simplesmente Nr ¹. Esta última análise nos leva à conclusão de que $1 - Nr$ é então a fração de sítios livres da rede. No entanto, $1 - Nr$ é também a probabilidade de que

¹O valor da fração $r = C_b / C_{bp}$ foi definido na equação 2.38

algum sítio aleatoriamente escolhido da rede possa estar livre.

Consideremos as probabilidades para dois sítios, sendo o primeiro aleatoriamente escolhido. Com este primeiro livre a probabilidade é $1 - Nr$ e se o segundo também estiver livre a probabilidade condicional para os dois será de $P\{f|f\}$. Entretanto, o segundo pode estar ocupado com probabilidade $Nr/N = r$, levando à probabilidade condicional de $P\{f|b_1\}$ se o sítio livre está à esquerda do ocupado. Entretanto, há independência da aleatoriedade de escolha para uma probabilidade geral de que o segundo sítio também esteja livre, logo pode-se escrever:

$$1 - Nr = (1 - Nr)P\{f|f\} + r P\{b_N|f\}. \quad (2.48)$$

Em função da análise que estamos construindo direcionar-se a uma relação de não cooperatividade entre os ligantes, concluímos que a probabilidade do sítio estar livre ou ocupado deve ser a mesma, logo:

$$P\{f|f\} = P\{b_N|f\}, \quad (2.49)$$

e a junção das equações 2.48 e 2.49 leva ao seguinte resultado:

$$P\{f|f\} = P\{b_N|f\} = \frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r}. \quad (2.50)$$

Retornemos agora à consideração de probabilidades para dois novos sítios, sendo novamente o primeiro aleatoriamente escolhido. Se este primeiro está ocupado a probabilidade é então r , mas se o segundo à esquerda estiver livre, a probabilidade condicional para os dois será de $P\{f|b_1\}$. Entretanto, se o segundo estiver ocupado com probabilidade também r , leva à probabilidade condicional de $P\{b_N|b_1\}$. O valor b_N é devido ao fato do sítio à esquerda estar ocupado pelo ligante de número de exclusão N . Da mesma forma, pode-se escrever:

$$r = (1 - Nr)P\{f|b_1\} + r P\{b_N|b_1\}, \quad (2.51)$$

e ainda devido à igualdade de probabilidade e ao rearranjo da equação anterior:

$$P\{f|b_1\} = P\{b_N|b_1\} = \frac{r}{1 - (N - 1)r}. \quad (2.52)$$

Agora podemos inserir os resultados das equações 2.50 e 2.52 dentro da equação 2.47 para obtermos a expressão da probabilidade P_g em função dos parâmetros desejados;

$$P_g = \left(\frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \right)^g \left(\frac{r}{1 - (N - 1)r} \right). \quad (2.53)$$

Finalmente, ao substituirmos a expressão obtida para a probabilidade na equação 2.46, chegaremos ao resultado de uma isoterma de ligação nos termos adequados a um processo de inte-

ração entre ligantes e redes, dentro das condições que estudamos nesta abordagem. No entanto, para simplificar a expressão final, após se observar que a série encontrada até este ponto é a derivada de uma série geométrica, pode-se fazer algumas operações algébricas para a obtenção da forma final da isoterma de ligação do modelo de McGhee - von Hippel ², a qual se escreve:

$$\frac{r}{C_f} = k_i(1 - N r) \left(\frac{1 - N r}{1 - (N - 1)r} \right)^{N-1}. \quad (2.54)$$

Podemos visualizar na figura 2.12 um esboço desta equação, para que compreendamos o comportamento gráfico típico de interações onde o ligante ocupa mais de um sítio da rede de ligação. Pode-se observar que a curva tem concavidade voltada para cima. Na figura tomamos a constante intrínseca de ligação como $k_i = 10^5$ e o número de exclusão $N = 3$. O valor da fração r varia dentro de valores típicos para ligantes de número de exclusão 3.

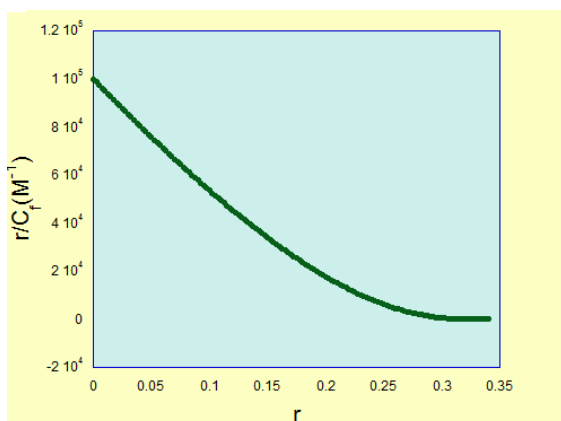


Figura 2.12: **Gráfico modelo para a equação 2.54.** $k_i = 10^5$ e o número de exclusão $N = 3$. O valor da fração r varia dentro de valores típicos para ligantes de número de exclusão 3. Adaptada das notas de aula do curso “*Interação entre biomoléculas*” de Márcio S. Rocha.

²Esta descrição do modelo de exclusão de vizinhos é muito sucinta; para maiores detalhes sobre manipulações das equações e sobre a confecção do modelo, deve ser consultado diretamente o artigo de McGhee - von Hippel de 1974 [33].

Capítulo 3

Pinças Ópticas

Neste capítulo descreveremos alguns dos aspectos e propriedades mais importantes sobre a técnica de pinças ópticas. Serão abordados temas como o histórico do desenvolvimento da técnica, princípios físicos que a sustentam, nosso aparato experimental, como medimos a intensidade do pinçamento nas nossas instalações, além de muitos outros aspectos correlacionados tanto à técnica quanto à nossa metodologia, que não terão seções específicas mas que estarão embutidas nas descrições e conceitos citados.

Vale de início ressaltar que a pinça óptica realiza a possibilidade de observar a interação da matéria em subescalas de micron e nanômetros, alcançando a resolução de enxergar a interação de uma única molécula. Para muitas áreas da ciência, este poder proporciona descobertas e avanços notáveis uma vez que nos níveis mais fundamentais as moléculas únicas realizam as reações primordiais. Localizar, observar e detalhar a interação de uma só molécula é de supra importância para Física, Biologia, Química, Biofísica, Bioquímica, e todas as demais áreas correlacionadas.

3.1 Histórico

Inicialmente podemos manter em mente que a técnica de pinça óptica é um fruto, uma consequência, do fato de que ao longo da história científica, houve uma perseguição pelo entendimento da interação da luz com a matéria. Acreditamos que perguntas muito simples como “*o que é a luz*” nortearam a busca que culminou no avanço da ciência e do que nos importa aqui, do desenvolvimento da manipulação de matéria através da luz.

Desde a Grécia antiga muitos pensadores buscaram pela natureza da luz. Os mais notáveis pensadores de muitas épocas se dedicaram a estudar fenômenos óticos. Aristóteles teria afirmado que a luz e as cores são uma mistura de luminosidade e escuridão, sendo a luz branca a essência da luz. Ptolomeu entendia a luz como uma forma de energia. Euclides compilou conhecimentos sobre reflexão, difusão, visão, etc, em um livro chamado “*OPTICS*”.

O físico e matemático árabe de nome Alhazen, que teria vivido entre os séculos V e VI D.C., estudou propriedades ópticas em lentes e espelhos, além de buscar entender a luz das estrelas e da lua. Seus estudos desconstruíram a concepção errônea de Ptolomeu de que a luz seria originada nos olhos e mostraram a reflexão pelos objetos.

Mais alguns séculos mais tarde, Isaac Newton e Christiaan Huygens discordavam quanto ao entendimento do que era a luz. O primeiro apontou a teoria corpuscular e o segundo a teoria ondulatória. Newton mostrou que a luz branca era na verdade a consequência da composição das demais cores. Desde então os avanços passaram a ser mais contínuos, com intervalos muito menores entre as descobertas. Alguns anos mais tarde Thomas Young realçou em suas pesquisas as características ondulatórias da luz, logo em seguida James Clerk Maxwell comprovou que a luz é um tipo de onda eletromagnética. Albert Einstein, muitos anos após Young, reaviva as características corpusculares, provando-as ao explicar o efeito fotoelétrico.

Se olharmos com uma lente de maior aumento, o que é assunto para outro tipo de trabalho, veremos muitas contribuições a mais, de grandes relevâncias, para que hoje estejamos colhendo tanto avanço tecnológico por meio das fascinantes manifestações das propriedades da luz.

Além das propriedades de reflexão e refração estudadas, com seus conceitos evoluídos ao longo de anos e por muitos estudiosos, que são fundamentais para a pinça óptica, uma outra propriedade interessante a este trabalho foi percebida há aproximadamente quatro séculos. Johannes Kepler concebeu a ideia de que a luz exerce força nos objetos sobre os quais incide, justificando o formato das caudas de cometas em suas diferentes posições das órbitas ao redor do sol. Esta força ficou conhecida como pressão de radiação, devido à radiação eletromagnética.

A partir da proposição de Kepler, o efeito da pressão de radiação deslumbrou muitos dos mais famosos cientistas desde aquela época. Isaac Newton, J. C. Maxwell, J. H. Poynting, J. J. Thomson, O. Heaviside, A. Einstein, H. Minkowski, M. Abraham e muitos outros chegaram a propor teorias com explicações sobre o transporte de momento pela luz. Muitos experimentos também foram propostos e alguns foram anunciados como tendo detectado com precisão o efeito da pressão. Entretanto, tanto a maioria das teorias quanto dos experimentos não foi capaz de explicar e comprovar a pressão como se supunha. Baixas intensidades e grandes espalhamentos da luz dificultaram a detecção, por se tratar de forças de baixíssimas ordens de grandeza ($\approx 10^{-12}$ N) [34].

Quando J. C. Maxwell reuniu e reformulou o conhecimento e as leis do eletromagnetismo,

ele pôde inclusive prever a existência da pressão de radiação, pois a propagação da onda eletromagnética possui densidade volumétrica de energia. A existência da pressão de radiação também foi prevista pelo físico italiano Adolpho Bartoli, conduzido pelos estudos da segunda lei da termodinâmica. Ambos se destacaram por suas descobertas, de tal forma que as forças devido à pressão de radiação ficaram conhecidas por forças de Maxwell-Bartoli [34, 35].

A descrição completa e perfeita da intensidade da pressão de radiação sobre objetos, corpos ou meios que interagem com a luz está diretamente conectada ao entendimento do transporte de momento pela luz, um conceito que é conhecido pela física/óptica há séculos. Entretanto há dificuldades na compreensão do momento do fóton de luz, um problema que já perdura por mais de cem anos, desde a controvérsia de Abraham-Minkowski. Embora tenham se baseado nos mesmos fundamentos, Abraham descreveu seu formalismo indicando que o momento do fóton é inversamente proporcional ao índice de refração do meio, enquanto Minkowski propôs que ele seria diretamente proporcional, uma discussão que ainda persiste até os dias atuais [34, 35].

No campo experimental, apesar das dificuldades em montar um aparato eficiente o bastante para captar apenas as contribuições devido à incidência de luz, Lebedew, Nichols e Hull [36–38] conseguiram realizar experimentos com grande sensibilidade e descreveram terem evidências reais sobre forças devido a pressão de radiação em ambientes laboratoriais. Ambos chegaram à conclusão de que a força é dependente da potência e não do comprimento de onda da luz incidente.

O laser, luz colimada e de grande intensidade, surge na década de 1960 e possibilita experimentos com maior poder de detecção da pressão de radiação e seu efeito sobre meios dielétricos. O primeiro a utilizá-lo com este fim foi o cientista Jones [39], que o incidiu sobre meios refrativos em diferentes líquidos, obtendo boa precisão dos índices de refração de cada um deles. Com o laser Arthur Ashkin realizou os mais relevantes experimentos em líquidos dielétricos que significaram os maiores avanços na histórica pesquisa sobre pressão de radiação.

No primeiro da série de experimentos, Ashkin revelou ter prendido e acelerado micropartículas em um poço de potencial estável, exercendo forças nas partículas através da pressão de radiação causada por um laser contínuo [1]. Em ensaios seguintes, ele detectou que as partículas sofriam dois tipos de aceleração, sendo que no início elas eram aceleradas no sentido do gradiente de intensidade, ou seja, para o centro do laser, e depois no sentido de propagação do feixe. O uso de dois feixes simultaneamente possibilitou além do aprisionamento, a levitação e o arraste das partículas [2, 3].

O uso de um laser com intensidade e comprimento de onda adequadamente escolhidos viabilizou manipulações de pequenas partículas dielétricas e também biológicas [4, 5]. Utilizando um único feixe e fazendo-o atravessar uma lente objetiva de alta abertura numérica de um microscópio, não seria exagero dizer que deste advento Ashkin e colaboradores deram vida à pinça óptica [6]. A conjugação do feixe com a lente gera um poço de potencial tridimensional

estável na região do foco da objetiva, e assim, partículas dielétricas de tamanhos no intervalo de 25 nm a 10 μm podem ser aprisionadas, tanto num plano transversal quanto na direção axial à direção de propagação do feixe. Apenas um ajuste pequeno era ainda necessário para que a pinça óptica concretizasse todo seu potencial: operar com um laser que provocasse menor quantidade de danos a espécies biológicas. Para isso, existe uma faixa adequada de espectro de luz considerada segura para tratar com biomoléculas, chamada de janela biológica. Nesta faixa a absorção é baixa e não danifica as espécies. Para a manipulação de células, vírus, bactérias e moléculas como o DNA, um laser infravermelho é considerado perfeito [6–9].

3.2 Teoria e Princípios Físicos

Nesta seção iremos abordar os itens mais relevantes que levam à compreensão da sequência de eventos que geram o pinçamento ótico. Para que o confinamento das partículas por pinçamento ótico seja possível muitos requisitos devem ser atendidos. Estes requisitos estão centrados nos vários elementos envolvidos que compõem o processo de confinamento, desde os elementos óticos até os objetos aprisionados. Além da exposição acerca dos requisitos citados acima, também abordaremos os pontos principais sobre as teorias que explicam o confinamento de partículas pela luz.

3.2.1 Requisitos sobre elementos óticos

Quanto aos elementos óticos, são importantes as características do laser e do microscópio com seus itens constituintes. O laser precisa ser suficientemente intenso para proporcionar ordens de forças condizentes com as partículas. Além disto, o confinamento por um único feixe laser precisa ser fortemente focalizado, passando por uma lente de alta abertura numérica para que forças de gradiente (direcionadas ao centro do laser) superem forças de espalhamento (direcionadas ao longo da propagação). Um item importante a se saber é que devido a um formato com grau de esfericidade das lentes que compõem a objetiva e à refração entre as interfaces: óleo de imersão ¹, vidro da lamínula do porta-amostra e solução aquosa, surge um efeito denominado “aberração esférica”, que proporcionará uma região focal ao invés de um foco único.

¹O óleo de imersão é usado entre a lente objetiva e a superfície do porta-amostra. Ele atua com uma função dupla: proteger contra arranhões a área de contato da objetiva e diminuir refração entre diferentes interfaces. O óleo possui praticamente o mesmo índice de refração que os vidros da lente e da lamínula.

Então a formação controlada de uma região focal torna-se benéfica ao aprisionamento das partículas. Parte do controle é feito pelos fabricantes de lentes que tornam mínimo o efeito da aberração esférica através da forma e da conjugação adequada das lentes internas à objetiva. Outra parte é feito através do uso do óleo de imersão, diminuindo o excesso da refração entre interfaces.

Questões relacionadas ao comprimento de onda e ao modo de operação do laser são quesitos necessários para otimizar a operação. Um destes é o fato de o laser possuir um perfil gaussiano, uma particularidade que contribui para que as forças resultantes possam ser direcionadas à região de interesse. A figura 3.1 mostra os detalhes mencionados e ajuda a visualizar como atuam em conjunto.

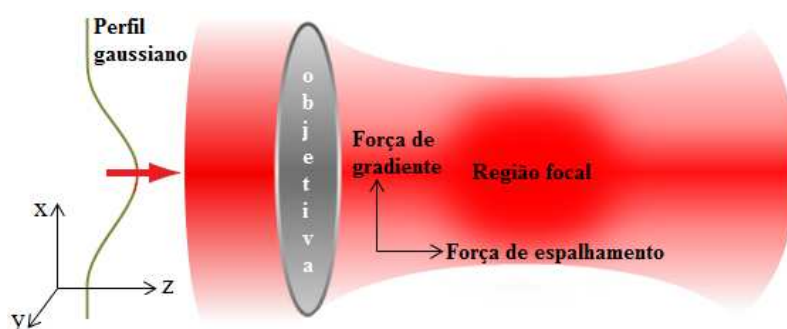


Figura 3.1: **Detalhes dos elementos óticos.** Observe a entrada de um laser em perfil gaussiano, a focalização pela objetiva, a direção das forças de gradiente e de espalhamento e a região focal.

Outros detalhes das características operacionais em nossas instalações serão apresentados na subseção de montagem da pinça (3.3).

3.2.2 Requisitos sobre partículas dielétricas

Demandas referentes às partículas dielétricas que serão aprisionadas, obrigam-nas a terem tamanhos e propriedades ópticas bem definidas. O tamanho das partículas dielétricas é fundamental para a faixa de intensidade de forças necessárias e para o embasamento das teorias de espalhamento que explicam o aprisionamento. Relacionadas às propriedades ópticas destas partículas, há fatores limitantes devido à refletividade e refratividade. Absorção, reflexão e refração ocorrem durante todo o tempo em que há incidência de luz sobre corpos e as propriedades de reflexão e refração são fundamentais. Para que ocorra o aprisionamento o índice de refração das partículas dielétricas deve ser maior que o índice de refração do meio e as partículas não

podem ter alta refletividade, ou seja, o laser precisa se propagar no interior das partículas mais que ser refletido por elas. Com a consideração do ponto de vista da óptica geométrica, a reflexão é responsável pelo surgimento de uma força espalhadora; ela empurra a partícula na direção de propagação do feixe. A refração por sua vez implica no aparecimento de uma força de gradiente, que direciona as partículas para o local onde o laser possui maior intensidade. Logo a força de gradiente contribui com o fortalecimento da região focal e deve ter maior intensidade que a força de espalhamento. Em nossos experimentos as partículas dielétricas são microesferas de poliestireno e deste ponto em diante iremos sempre tratar as partículas dielétricas como as microesferas de poliestireno, ou simplesmente microesferas. Outras características de interesse das microesferas de poliestireno ainda serão apresentadas em metodologias experimentais (3.5).

3.2.3 Teorias do pinçamento ótico

Nesta seção abordaremos os principais aspectos englobados pelas teorias que explicam o confinamento de partículas pela incidência de luz sobre elas. Estes aspectos são essenciais para uma boa compreensão do confinamento de partículas usando luz. Nesta abordagem se prioriza um caráter didático elucidativo, pois o aprofundamento de tais teorias exigiria detalhes do eletromagnetismo que não é o foco deste trabalho.

Citaremos três entre as muitas teorias que tratam dos princípios físicos de uma pinça ótica. Para qualquer das teorias, podemos compreender o aprisionamento como consequência da criação de um poço de potencial pelas forças devido à focalização do laser. Este poço de potencial possui um formato tridimensional e sua curvatura resulta das características do laser. A curvatura do poço indica o quão forte é a *armadilha ótica* e é expressa pela chamada *constante de força da pinça*, representada por k . As teorias são capazes de exprimir o valor da constante de força de uma pinça (k), com condições específicas referentes aos tamanhos dos centros espalhadores de luz e dos comprimentos de onda envolvidos. Inicialmente tomaremos as condições tratadas pelo regime de Rayleigh, em que os raios dos centros espalhadores são muito menores que os comprimentos de onda da radiação incidente. Depois veremos o caso tratado pelo regime Mie, onde o raio dos centros espalhadores e os comprimentos de ondas são aproximadamente do mesmo tamanho. Finalmente focalizaremos atenção no regime da óptica geométrica, onde o raio dos centros espalhadores são muito maiores que os comprimentos das ondas. A figura 3.2 ilustra a faixa de domínio dos três regimes.

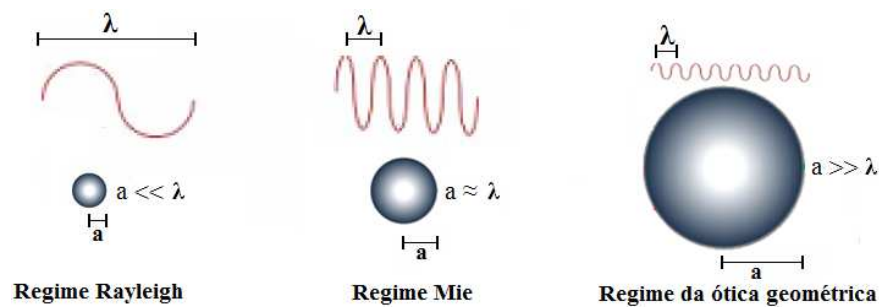


Figura 3.2: Regimes de espalhamento.

É digno de nota que a teoria mais completa na atualidade é de um grupo brasileiro. O grupo de pesquisa da UFRJ, do Laboratório de Pinças Ópticas (LPO), no Rio de Janeiro, conseguiu desenvolver, na chamada *teoria MDSA+*, aspectos físicos que englobam todas as faixas de tamanho dos objetos confinados, ou seja, objetos cujo raio (a) é menor, igual e maior que o comprimento de onda (λ) da radiação incidente. Esta teoria é de grande e elaborado rigor matemático e seu nome leva em consideração os efeitos de espalhamento de luz causados pelo centro espalhador, que abrange a teoria de espalhamento Mie (M), a focalização além da objetiva na representação de Debye (D), os efeitos da aberração esférica da luz devido à refração em interfaces (SA do inglês *Spherical Aberration*) e os efeitos devido ao astigmatismo (+) [40,41].

As duas teorias das quais citaremos os princípios cobre faixas limitadas do tamanho do raio (a) do centro espalhador (microesferas) em relação ao comprimento de onda (λ) da radiação incidente.

Considerando a situação na qual os raios são muito menores que o comprimento de onda da luz ($a \ll \lambda$), falamos sobre a teoria de espalhamento Rayleigh, que em termos de limites significa o limite inferior. Aqui a microesfera comporta-se como um dipolo elétrico induzido que está imerso numa região de campo elétrico, devido à presença da onda eletromagnética (laser) [23, 42]. Neste caso, a força proporcional ao gradiente do campo elétrico atua na microesfera direcionando-a para o local de maior intensidade do campo, ou seja, para o centro da região focal. Os detalhes deste cálculo podem ser acompanhados na literatura [23, 43].

Analisar o confinamento através da condição em que o raio da microesfera é muito maior que o comprimento de onda da radiação incidente ($a \gg \lambda$) torna o entendimento simples e intuitivo, pois pode-se aplicar a teoria da ótica geométrica. Os princípios básicos de propagação da luz através do estudo de trajetórias de raios de luz, explica de maneira satisfatória o pinçamento ótico e é excelente para que se possa pintar uma imagem do aprisionamento [8, 44].

Assim aproximamos a radiação incidente por raios que irão interceptar a microesfera. Na incidência da radiação laser sobre as microesferas, sempre haverá parcelas da radiação incidente que serão absorvidas, refletidas e refratadas. Considerando insignificantes as parcelas

absorvidas, simbolizaremos, para cada caso das forças de atuação da pinça, os raios refletidos e refratados. As figuras 3.3(a) e 3.3(b) realçam o comportamento dos raios quando incidem sobre as microesferas de poliestireno.

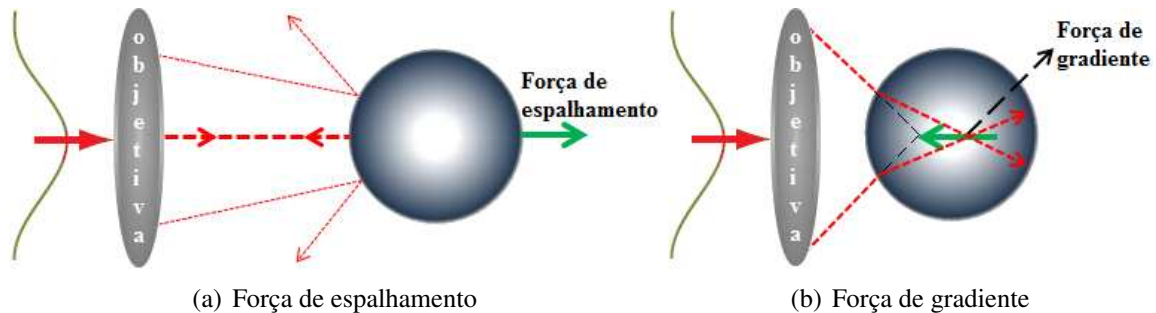


Figura 3.3: **As forças de espalhamento e de gradiente.** (a) Os raios incidem na microesfera e refletem gerando uma força resultante que empurra a microesfera na direção de propagação do feixe. (b) Os raios refratam pela microesfera gerando uma força resultante que direciona a microesfera para a região focal. **Obs.:** A geração de forças deve-se à transferência de momento dos raios para a microesfera.

Na figura 3.3(a) são destacados dois raios que refletem na superfície da microesfera e geram uma força resultante que empurra a microesfera na direção de propagação. Já a figura 3.3(b) evidencia a atuação de dois raios sofrendo refração e que direcionam a microesfera para o foco. Nesta última a microesfera encontra-se depois da região focal, mas é importante elucidar que a força de gradiente atua levando a microesfera para a região focal, nos casos em que ela esteja próxima pela esquerda, direita, acima ou abaixo da região [44–46].

Na figura 3.4 são explicitados os desvios sofridos pelos raios de luz ao interagirem com a microesfera e as forças de espalhamento e gradiente com a consequente força resultante. Na figura 3.4 (a) destaca-se um raio que passa pela região mais externa da lente objetiva e em sua trajetória em direção ao foco interage com a microesfera, tendo uma porção refletida e outra refratada, gerando as forças de espalhamento e gradiente. Observe que para o raio em questão a força de espalhamento é paralela ao raio incidente original, enquanto a força de gradiente é perpendicular ao mesmo. Nesta figura, a soma vetorial das forças de gradiente e espalhamento gera uma resultante apontando para cima e para a esquerda. As figuras 3.4 (b) e (c) mostram dois raios em diferentes situações que são desviados pela microesfera, mas que por conservação de momento linear provocam o desvio da microesfera no sentido oposto [45, 46].

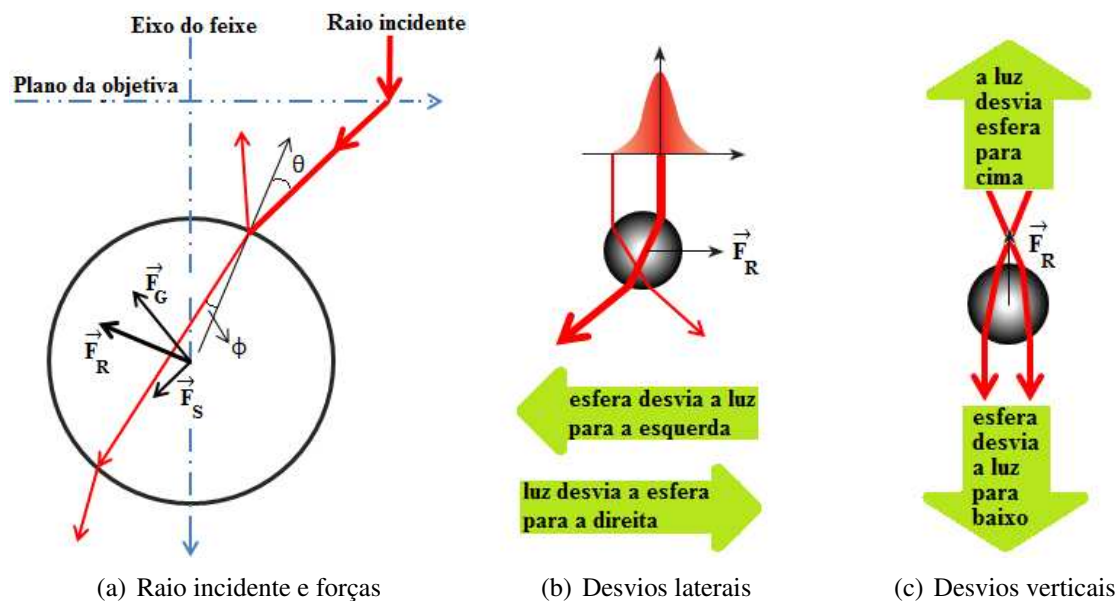


Figura 3.4: **Desvios dos raios e da microesfera.** (a) Um raio incide na microesfera após passar pela lente refletindo e refratando na microesfera e gerando as forças de espalhamento e gradiente e a consequente força resultante. (b) Os raios e a microesfera sofrem desvios laterais. (c) Os raios e a microesfera sofrem desvios para baixo e para cima, respectivamente.

A transferência de momento do feixe luminoso para a microesfera ocorre pela incidência dos fótons, que, pelos efeitos de interações da radiação com a matéria, sofrem alterações de suas trajetórias. As trajetórias alteradas dos fótons são compensadas desviando a microesfera de sua posição original. Contabilizar a transferência de momentos do número total de fótons que incidem sobre a microesfera possibilita uma estimativa aproximada da ordem de grandeza das forças envolvidas. Para uma aplicação da pinça óptica envolvendo material biológico, normalmente o laser possui potência de alguns miliWatts (mW) e com esta potência a ordem de grandeza das forças é estimada em alguns piconewtons (pN). Esta estimativa é simples e está demonstrada na referência [46].

A análise do pinçamento pelo ponto de vista da óptica geométrica também possibilita um melhor entendimento da formação da região focal. Dois raios que atravessam a lente em sua parte mais externa irão se cruzar em diferentes pontos em relação a dois raios que atravessam a lente em sua região central, uma situação que se repetirá para quaisquer pares de raios tomados de lados opostos da lente com relação ao centro. Esta situação pode ser visualizada na figura 3.5.

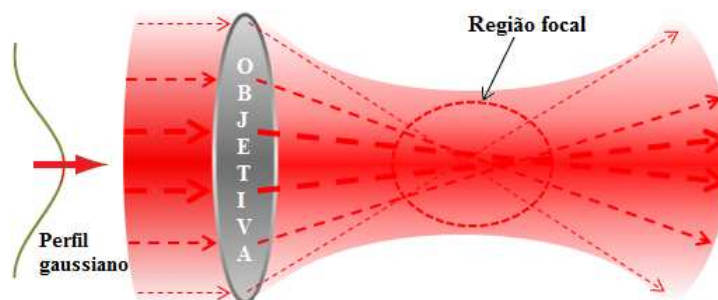


Figura 3.5: **Região focal da objetiva.** Note que raios mais externos (partindo dos dois lados da lente) se cruzam em local diferente daquele onde se cruzam os raios que atravessam a lente mais ao centro.

Por todo o exposto, concluímos que as forças de gradiente devem superar as forças de espalhamento para gerar uma armadilha estável, definida como um poço potencial em torno do qual quaisquer objetos dielétricos que reunirem as características adequadas estarão sujeitos à ação de forças restauradoras, do tipo Lei de Hooke, que os manterão oscilando em torno da posição de equilíbrio do poço. As oscilações dos objetos dentro da região focal admitem apenas pequenos deslocamentos (normalmente na ordem de nm), devido ao fato de que a ordem de forças envolvidas no aprisionamento é também de baixa magnitude (pN). Os objetos sofrem sucessivos choques caso estejam em solução aquosa. As forças sofridas por ação dos choques com o meio juntamente com a força restauradora do poço potencial atuam como um “oscilador harmônico Browniano” [47].

Pelo que vimos, a pinça óptica é percebida como um instrumento poderoso para a manipulação de objetos em escalas nano e micrométrica, tendo um alcance importantíssimo em várias áreas da ciência e múltiplas possibilidades de aplicação.

3.3 Esquema de montagem da pinça e da videomicroscopia

Na figura 3.6 está esboçado muito resumidamente os principais equipamentos usados na montagem que compõem a pinça, bem como onde se dá o pinçamento no interior do microscópio óptico em nossos experimentos. Um aparelho da IPG Photonics estimula a emissão do laser de fibra dopada com itérbio (IV). O laser é uma radiação infravermelha que possui comprimento de onda $\lambda = 1064 \text{ nm}$ e é enviado com perfil gaussiano e formato cilíndrico para o microscópio, com potência máxima de $5,8 \text{ W}$, operando no modo TEM_{00} . As linhas pontilhadas delimitam a região do microscópio invertido Nikon Ti-S, que possui correção óptica no infinito e proporciona aumento de $100X$. Após emitido, o laser percorre um caminho óptico

passando por um conjunto de elementos ópticos, onde se incluem espelhos, cubos e filtros. Tais elementos são responsáveis por direcionar e alinhar a radiação laser, além de garantir a potência específica.

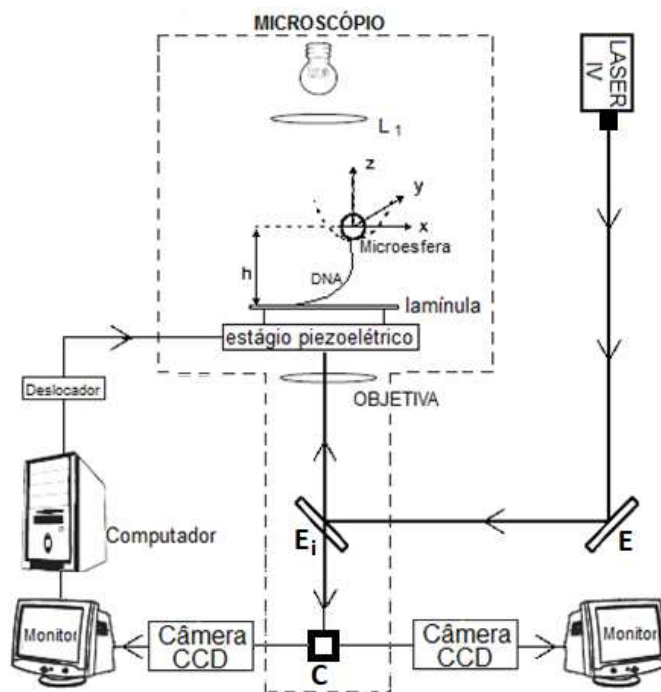


Figura 3.6: Montagem experimental

Após a entrada no microscópio, a radiação passa por um espelho interno (E_i), onde também incide a luz de iluminação do microscópio. Ele é um espelho dicróico e possui alta transmitância para a luz visível e alta refletância para a radiação infravermelha. O feixe laser é direcionado pelo espelho E_i até uma lente objetiva de alta abertura numérica ($NA = 1,4$), e então atinge a região de interesse. Pela interação laser-microesfera será gerado um poço de potencial na região focal, que será responsável pelo aprisionamento óptico. Uma fonte luminosa lança luz a um condensador, representado por L_1 , que iluminará a região onde está o porta-amostra no qual ocorrerá o experimento. Dentro do porta-amostra estarão os materiais imediatos ao experimento, como o DNA, as microesferas de poliestireno e a substância a ser testada na interação com o DNA, todos dentro de uma solução aquosa. Foi representado na figura o esquema de um DNA preso a uma microesfera, cujo centro de massa se encontra a uma altura h da lamínula de vidro, que é o fundo do porta-amostra. O espelho dicróico envia a iluminação do microscópio a um cubo óptico que a direciona a duas câmeras CCD, que são responsáveis pela formação de imagens do monitor de acompanhamento do experimento e do computador onde se realizará a aquisição de dados da videomicroscopia.

Além de registro dos dados, o computador também controla a movimentação no experi-

mento. Através de um estágio piezoelétrico ele comanda um deslocador e controla deslocamentos e velocidades com precisão nanométrica nas direções desejadas.

3.4 A constante de força: calibrando a pinça óptica

É por meio da calibração que se obtém o valor da constante prevista pela força restauradora da pinça óptica. A obtenção do valor da constante de pinça é necessária para se alcançar precisão da intensidade da força de aprisionamento da armadilha óptica.

Nossa ação experimental engloba um sistema de variáveis capazes de exprimir forças à partícula alvo, que neste caso é a microesfera de poliestireno. Retida pela armadilha óptica, a microesfera atingirá equilíbrio em solução submetida a forças advindas do movimento browniano da solução e de arraste caso esta solução se movimente. Na figura 3.7 é esboçada uma microesfera aprisionada num poço potencial tridimensional de uma armadilha óptica. Na figura 3.7(a), visualizamos a partícula submetida à pinça e ao movimento browniano, pois a solução não está em movimento. Entretanto, nas figuras 3.7(b) e (c), visualizamos o caso em que a solução possui diferentes módulos de velocidades, representados por V_1 e V_2 .

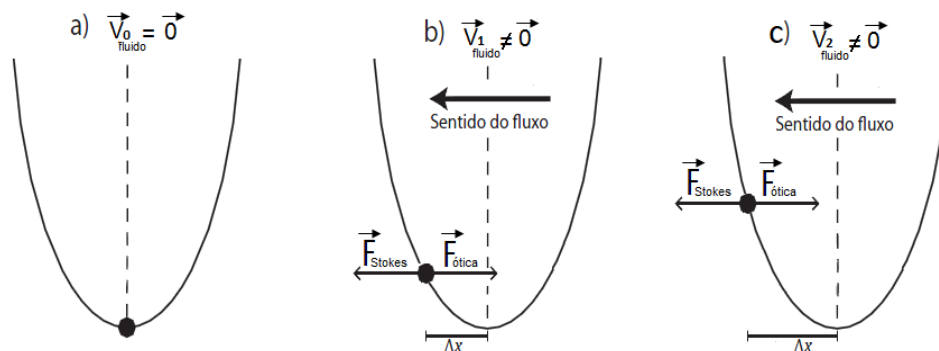


Figura 3.7: **Poço potencial de aprisionamento da pinça óptica.** (a) Microesfera aprisionada pela pinça sem fluxo da solução. (b) e (c) Microesfera aprisionada pela pinça em novo equilíbrio devido a diferentes velocidades da solução.

Da observação da figura concluímos que é estabelecido um equilíbrio entre as forças levando a microesfera a ocupar diferentes posições dentro do poço, o que ocorre devido aos fluxos estabelecidos na solução. Por causa disto, a microesfera sofre deslocamentos ao longo do eixo x , representados por Δx . Outra conclusão é a de que os choques com as partículas do meio tendem a tirar a partícula do poço potencial, ou seja, as partículas do meio induzem uma força de arraste sobre a microesfera, denominada Força de Stokes. Assim, fica claro que o equilíbrio exige equiparação das forças da pinça e da força de arraste da solução, pois, na presença de um

fluxo, a média dos movimentos brownianos é nula. Além disso, observa-se que nestes casos o poço é basicamente um potencial aproximadamente harmônico, sendo do tipo $\frac{1}{2}kx^2$.

A força da pinça é uma força restauradora e proporcional ao deslocamento sofrido pela microesfera, ou seja, é do tipo $F_{otica} = k\Delta x$, sendo k a constante de pinça a ser determinada. Já a força de Stokes é uma força de arraste e é proporcional a propriedades físicas da solução e à velocidade da mesma, sendo seu módulo expresso por:

$$F_s = \gamma v, \quad (3.1)$$

onde v é a velocidade do fluxo e γ é o coeficiente de atrito viscoso sobre a microesfera em solução aquosa cujo valor é estimado por [23]:

$$\gamma = 6\pi\eta a \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{a}{h}\right) + \frac{1}{8} \left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{a}{h}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{a}{h}\right)^5 + \dots \right]^{-1}, \quad (3.2)$$

em que $a = 3 \mu m$ é o diâmetro da microesfera, $h = 5 * 1.33/1.5$ em μm é a altura do centro da microesfera em relação ao fundo do recipiente em que está a solução e é encontrada movimentando-se o foco do laser. O raio e a altura são ambos uma constante no movimento. E ainda temos η como a viscosidade da solução aquosa e que é calculado por [23]:

$$\eta = 10^{-3} \left[0,26 + 1,51 \exp\left(\frac{-t_c}{29}\right) \right], \quad (3.3)$$

onde t_c , a temperatura em graus Celsius, é determinada simultaneamente no ambiente durante a calibração e passa a ser uma constante durante os experimentos de estiramento do DNA, a fim de garantir maior precisão na intensidade da força óptica.

No equilíbrio a força óptica se igualará à força de Stokes ($F_{otica} \cong F_{Stokes}$) e usaremos este fato para calibrarmos a pinça pelo *método de Stokes*. O método é simples e consiste na geração de um fluxo, com velocidade conhecida, numa solução contendo as microesferas. A partir do fluxo, mede-se o deslocamento da microesfera Δx em relação à situação inicial com a solução em equilíbrio hidrostático. O fluxo é proporcionado pela movimentação do estágio piezoelétrico do microscópio, em que está preso o porta-amostra com a solução.

Escrevendo, então, as expressões das forças consideradas na calibração e isolando a constante de força para a pinça, teremos;

$$k = \frac{\gamma v}{\Delta x}. \quad (3.4)$$

Agora o que temos a fazer é encontrar o valor de Δx . Podemos calculá-lo fazendo uma filmagem do experimento, com auxílio do programa *StreamPix*. O valor que calcularemos para Δx será um valor médio, obtido por meio de repetições do procedimento descrito a seguir em diferentes velocidades e com diferentes microesferas:

- i*- Preparamos uma solução tampão aquosa (Phosphate Buffer Saline (PBS)) e nela colocamos certa quantidade das microesferas.
- ii*- Levamos essa solução ao microscópio prendendo-a ao estágio piezoelétrico que tem controle de velocidade feito pelo computador.
- iii*- Filmamos inicialmente a microesfera no mínimo (fundo) do poço potencial por ≈ 10 segundos.
- iv*- Colocamos o estágio em movimento e filmamos por ≈ 10 segundos.
- v*- Ao parar, filmamos novamente na nova posição por ≈ 10 segundos.

Repetimos as filmagens para um grande número de velocidades diferentes até atingir uma velocidade na qual a microesfera escapa do poço. Após as filmagens, convertemos *pixel* e *frame* para unidades de micrômetro e segundo, usando uma relação padrão de equilíbrio *pixel*/micrômetro e da taxa de captura da câmera. Tal conversão é feita com o auxílio do programa *ImageJ*. Assim, determinados Δx e v . Substituindo esses valores na equação 3.4 obtemos a constante de força da pinça. Ainda, de posse dos dados de diferentes velocidades e diferentes deslocamentos, pode-se chegar ao valor da constante por um gráfico de V por Δx , como esboçado na figura 3.8.

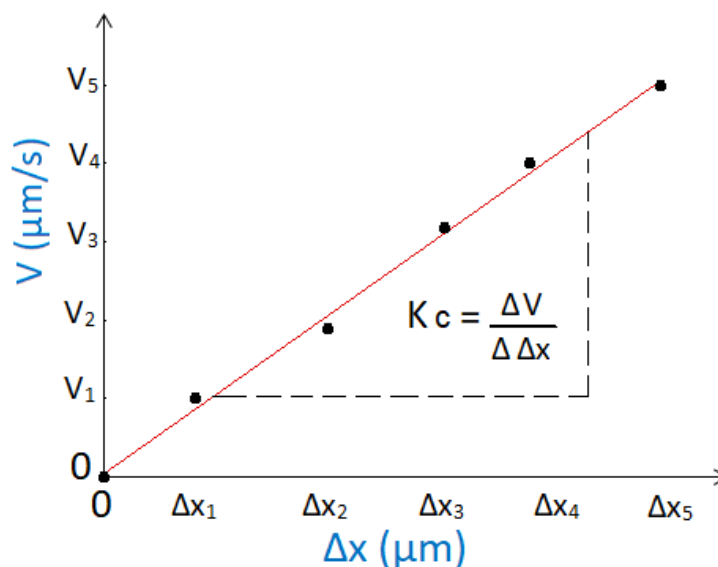


Figura 3.8: **Gráfico de V por Δx .** A inclinação do gráfico fornece o valor da constante da pinça k , multiplicada pelas constantes do sistema.

A calibração da pinça óptica pelo método de Stokes gera um valor de constante de excelente precisão, além de possuir simplicidade e rapidez de execução.

3.5 Metodologias Experimentais para a pinça óptica

Esta é uma seção dedicada a transmitir alguns passos importantes seguidos na rotina laboratorial a fim de garantir dados confiáveis do experimento de pinça óptica. Será descrito o procedimento de preparação das nossas amostras, abordando detalhes que deixam claros os cuidados com a própria amostra, bem como os cuidados com a preparação a fim de evitar contaminação biológica. Os cuidados com os materiais que compõem a amostra são necessários para evitar danificá-los, como em casos de movimentos bruscos com o DNA que podem fragmentá-lo. Os cuidados com a contaminação são necessários pois amostras biológicas são muito sensíveis a “*sujeiras*”, como no caso de proliferação de bactérias e também a interações indesejadas devido a contato não previsto, como no caso do próprio material e procedimento de limpeza. Além disso, também será descrita a metodologia de obtenção direta dos dados, de onde extraímos parâmetros mecânicos do DNA e dos complexos com o DNA que são estudados.

3.5.1 Procedimento experimental - pinça óptica

O procedimento experimental consiste da análise de amostras onde estão juntos DNA e o ligante alvo da pesquisa. No entanto, para chegar à análise em si, há que se cumprir uma série de etapas de preparo das amostras, manipulação do equipamento e de uma série de programas de controle do equipamento e dos dados gerados. Vamos inicialmente focalizar atenção nos processos de estiramento do DNA e complexos com ele formados, para depois descrevermos os passos de preparação das amostras. Assim se fará para sequenciar as seções anteriores. Neste ponto portanto, serão abordados assuntos relacionados à prática operacional de uma pinça óptica.

3.5.1.1 Os dados do estiramento do DNA e do complexo DNA-ligante

Do modo como operamos a pinça óptica, ela nos proporciona o objetivo experimental de observar e extrair o comportamento mecânico do DNA e dos complexos DNA-ligantes. Observamos o DNA e complexos em uma solução aquosa, que é formulada com acuidade para que se aproxime ao máximo de condições fisiológicas. Assim se faz necessário, pois todo DNA

em condições “*naturais*” possui propriedades mecânicas bem definidas, que possuem variabilidade na extensão, mas, possuem elasticidade compatível nos mais diversos tipos de seres vivos. Desta forma, ao complexarmos o DNA com possíveis ligantes, os parâmetros mecânicos sofrerão alterações, refletidos pela físico-química da interação. Muitas vezes, é possível estabelecer uma conexão entre o comportamento mecânico com a físico-química que governa a interação entre o DNA e o ligante [19]. Para executar a extração dos dados mecânicos devemos proceder de forma cautelosa, pois ambicionamos obter dados que refletem a estruturação e/ou conformação de equilíbrio de um DNA e suas mudanças quando no interior celular. Para tanto, é fundamental que tomemos o cuidado de trabalhar dentro de um regime de forças baixas, chamado regime entrópico, pois existem evidências experimentais e teóricas de que assim ocorre no interior das células [48]. Desta forma, disponibilizaremos estudos confiáveis e capazes de contribuir nas mais diversas áreas relacionadas às ciências físicas, químicas e biológicas.

Pela descrição de como atua a pinça óptica e também pela descrição do método de cálculo da constante de força da pinça, deixou-se claro a importância do objeto dielétrico, no caso as microesferas de poliestireno, para experimentos como o nosso. É a microesfera que permanecerá aprisionada no poço potencial da pinça durante o estiramento do DNA. A força capaz de estirar o DNA atua sobre ele de maneira indireta. Portanto, o DNA alvo de nossa observação estará preso à microesfera de poliestireno e o processo no qual ocorre este aprisionamento será descrito adiante. Na nossa montagem de pinça, o poço potencial não é deslocado, ele possui um posicionamento fixo. É necessário então, que, além de afixado à microesfera, o DNA esteja também afixado ao ponto que terá movimentação durante o experimento. Como já dito antes, a movimentação ocorre através de um estágio piezoelétrico, onde também prendemos o porta-amostra com todo o material a ser testado. Assim fica também definido que o DNA alvo estará afixado a uma lamínula de vidro, que por sua vez é o fundo do porta-amostra. A fixação do DNA à lamínula também será descrita mais à frente.

Na figura 3.9, está esquematizado simploriamente o que pode ocorrer com todo o material que compõe a solução aquosa que é a amostra de trabalho. Nesta solução estão contidas as microesferas, o DNA, a solução tampão e muitos outros elementos que pertencem a alguma etapa de realização do experimento. No experimento real a maior parte das microesferas estarão soltas em solução e somente uma pequena parte delas terá uma ponta do DNA afixado nelas. Para que consigamos tensionar o DNA, devemos fazer uma busca por uma configuração onde o DNA esteja duplamente afixado e que ainda tenha um DNA com todas as características padrões preservadas. Esta busca pode durar por quase todo um dia de experimento, ou até mesmo vários experimentos para ser encontrada. É nessa busca que se encontra o maior gasto de tempo e material de trabalho, podendo tornar difícil e de alto custo a realização do experimento.

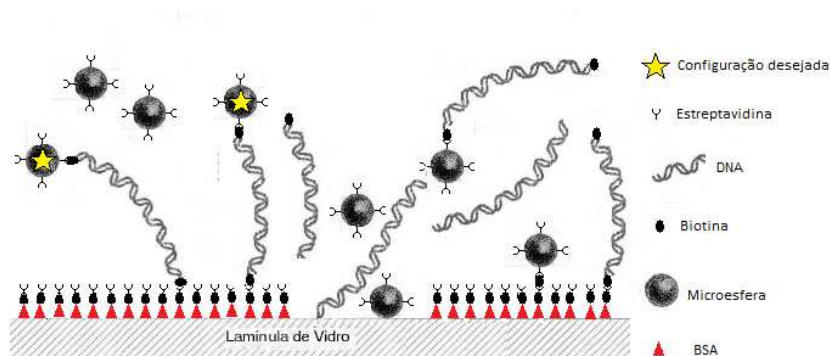


Figura 3.9: Possíveis configurações da solução no porta-amostra. Adaptada da referência [23]

A figura 3.9 evidencia também que pode haver muito DNA solto em solução, microesferas agarradas ao fundo da lamínula, DNA's presos pelas extremidades a duas microesferas e outras configurações não desejadas. Uma só microesfera pode também conter mais de um DNA fixado a ela e ao fundo da lamínula, o que também inviabiliza esta configuração para o experimento, já que nosso experimento é de molécula única. Ainda podemos ver na figura algumas representações de proteínas e vitaminas que otimizam o processo de fixação do DNA à lamínula e à microesfera; tais elementos estarão descritos nas próximas seções.

Começamos manualmente nossa busca, movimentando o estágio piezoelétrico ao girar seus parafusos micrométricos, até que uma microesfera seja pinçada. Após o pinçamento, movimentamos o estágio e, se a microesfera contiver DNA na condição ideal, ou em perfeito estado, o DNA exercerá sobre a microesfera uma força, como se fosse uma mola distendida, e a fará escapar da pinça. Quando o conjunto microesfera-DNA for encontrado, verificamos se há indícios de que uma única molécula de DNA está presa à microesfera. O melhor método para testarmos esta possibilidade é fazer a microesfera escapar da pinça por vários lados diferentes, observando se a distância percorrida pela microesfera é sempre a mesma. A figura 3.10 ilustra bem essa situação.

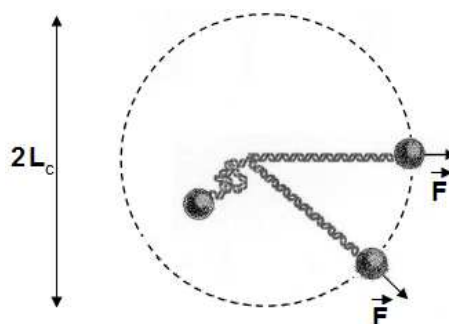


Figura 3.10: Direção de estiramento para testar uniformidade. Adaptada da referência [23].

O DNA com o qual realizamos nossas pesquisas é o DNA do bacteriófago λ , que tem como padrão um comprimento de contorno $L_c \cong 16,5 \times 10^{-6} \text{ m}$ e um comprimento de persistência $A \cong 50 \times 10^{-9} \text{ m}$. Após encontrarmos a microesfera com o DNA duplamente preso iremos estirá-lo para testar se seus comprimentos possuem as medidas padrões citadas. Neste momento faz-se um estiramento filmado do DNA, tendo os controles de toda a movimentação realizado pelo computador e pelo deslocador do piezoelétrico. Deve-se inclusive realizar a filmagem em uma velocidade baixa o suficiente para que a perturbação gerada no sistema possa ser desprezada. A gravação do filme possui dados em frames e pixels, conforme as características da câmera CCD, mas devem ser convertidos em micrômetros e segundos. Os dados com as medidas em unidades do SI são então resolvidos pela expressão de Marko e Siggia, dada pela equação 2.31, que pertence a um regime de forças no qual nossos dados se inserem [16, 29]. A força executada pela pinça possui duas componentes: transversal (no plano da lâmina) e axial (perpendicular à lâmina), com o eixo x sendo a componente no plano. Entretanto tomaremos apenas a componente x , pois o deslocamento será ao longo deste eixo. Na figura 3.11 pode-se perceber a direção do estiramento e acompanhar a decomposição da força.

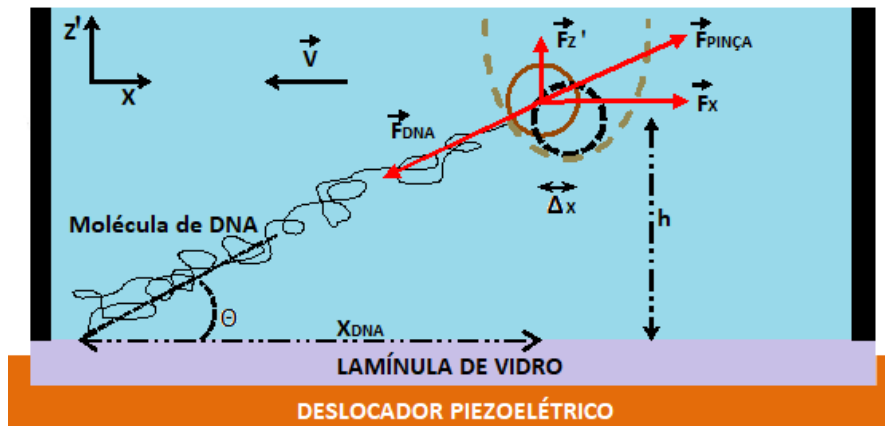


Figura 3.11: Estiramento do DNA ao longo de sua extensão. Note $F_x = F \cos \theta = F(x_{DNA}/z)$ e $z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}$. A microesfera sofre forças de módulos iguais pela pinça e pelo DNA.

Com a velocidade constante e com intensidade muito baixa ($v = 0,1 \mu\text{m}/\text{s}$) pode-se considerar que a solução não exerce força de arraste sobre a microesfera e também que em volta do DNA a perturbação é suficientemente pequena para considerarmos que o DNA passa por sucessivas posições de equilíbrio. Este arranjo dá ao sistema uma configuração de regime quase estático, onde a força de Stokes é desprezível e o DNA começará a exercer uma força significativa sobre a microesfera quando o deslocamento estiver próximo do valor do comprimento de contorno do DNA (L_c). Deste ponto em diante ele começa a exercer uma força sobre a microesfera que é de igual intensidade à força da pinça. A figura 3.12 representa uma curva de força por extensão típica do DNA em sua forma nativa e confirma as considerações acima.

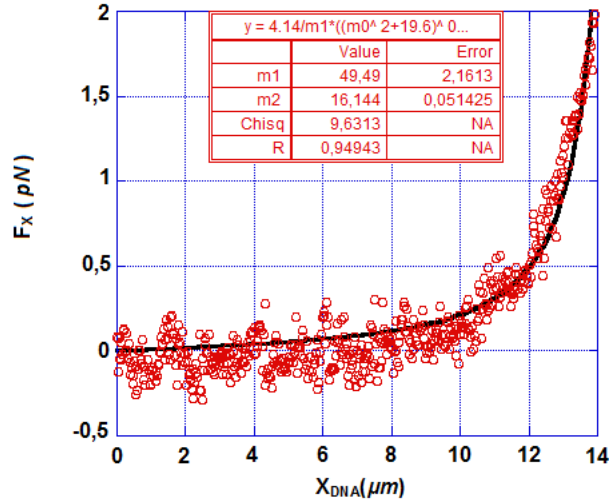


Figura 3.12: **Curva de força típica de um DNA em sua forma nativa.** Note o valor máximo de $2 pN$ para a força dentro do regime entrópico e também os valores de ajuste do KaleidaGraph no qual $m1$ representa o comprimento de persistência e $m2$ é o comprimento de contorno.

Os dados são ajustados pela equação de Marko e Siggia, que ao longo da direção x é escrita como:

$$F_x = F \cos \theta = F(x_{DNA}/z), \quad (3.5)$$

onde;

$$z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}, \quad (3.6)$$

e a equação se torna:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L_c} + \frac{1}{4(1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L_c})^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}, \quad (3.7)$$

em que h , k_B e T são constantes.

O ajuste da curva de F_x em função de x fornece com precisão os parâmetros mecânicos A e L_c . Realiza-se o ajuste usando o programa KaleidaGraph desde o tratamento dos dados nas conversões em dados no SI até a geração da curva e extração dos parâmetros de interesse. Como o exemplo da curva acima revelou dados de um DNA padrão do bacteriófago λ , este DNA pode ser então usado para as observações de mudanças de parâmetros mecânicos devido à interação com o ligante a se pesquisar. Entretanto, se um DNA encontrado não atende às exigências, todo o processo de busca deve ser reiniciado desde a etapa manual. Apesar de todos os cuidados citados acima, no processo de preparo das amostras a manipulação do DNA

leva à danificação de muitas unidades e este fato pode obrigar a que novas buscas por um DNA padrão sejam reiniciadas inúmeras vezes. Para maior confiabilidade dos dados, consideramos o DNA ideal para a continuidade do experimento, quando os ajustes levam aos valores padrões em pelo menos cinco repetições do estiramento. Os valores padrões devem atender à média de $L_c = (16,5 \pm 1,0)\mu m$ para o comprimento de contorno e $A = (45 \pm 5)nm$ para o comprimento de persistência, conforme estimativa citada na seção 2.5.

A partir do momento em que o DNA padrão é encontrado, começamos a fazer a troca da solução no porta-amostra. As novas soluções contém as alíquotas com as concentrações desejadas do ligante que irá interagir com o DNA. Para cada ligante temos que estabelecer diferentes critérios de concentração e tempo de reação com o DNA. Os valores iniciais para as concentrações são obtidos na literatura disponível, mas como para cada técnica pode haver comportamentos distintos devido a suas particularidades, devemos observar atentamente a faixa de concentração importante para nosso experimento. Fazemos os estiramentos desde o DNA puro até a alíquota final de interesse repetidas vezes, em média cinco vezes para cada DNA, e ainda repetimos o experimento com moléculas de DNA diferentes. Ao final tomamos o valor médio das diferentes moléculas e calculamos as barras de erro em função das médias de todas as moléculas.

A figura 3.13, esboça o esquema do porta-amostra utilizado, cujos detalhes de construção encontram-se mais à frente. Um momento muito delicado do experimento é o de troca da solução do porta-amostra. A figura mostra um modelo de pipeta com o qual realizamos tais trocas. Primeiramente devemos tentar retirar o máximo da solução do porta-amostra, mas sem comprometer a estrutura do DNA, o que exige muito cuidado. Fazemos isso retirando pequenas porções por vez, geralmente de 10 em 10 μL , para não perturbar excessivamente o sistema. Após a retirada inserimos também em pequenas porções a alíquota contendo a concentração desejada do ligante. Para cada alíquota este processo é repetido por três vezes para garantirmos uma troca total da solução. Cada experimento necessita da construção de um novo porta-amostra que recebe uma solução de volume aproximado de cem microlitros de solução ($V_i \approx 100 \mu L$). Se nesta troca de solução o DNA for perdido, devido a algum movimento brusco por exemplo, um novo experimento deve ser iniciado.

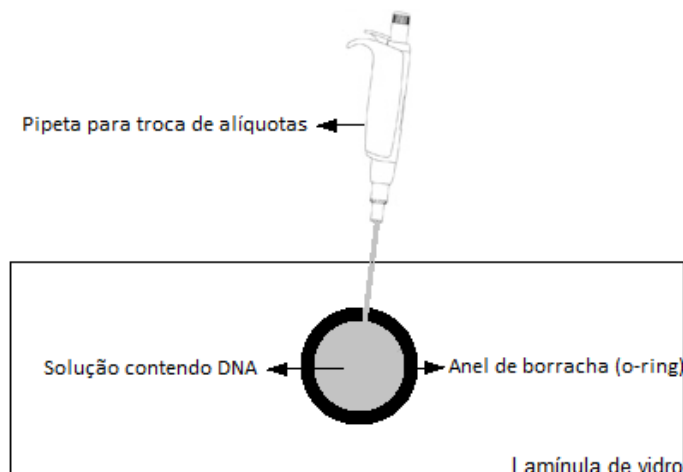


Figura 3.13: Esquema do porta-amostra e troca de alíquota. Na troca a microesfera deve permanecer pinçada e o DNA duplamente preso.

3.5.2 Preparo das amostras - pinça óptica

O DNA do bacteriófago λ com o qual trabalhamos passa por um processo de biotinizacão, ou seja, de marcação de suas extremidades com a vitamina biotina. Este processo é feito em nosso laboratório e é previamente executado para que se tenha sempre disponível o DNA biotinilado, o qual chamamos λ -biot. Ele é justificado pois trabalhamos com o protocolo de Smith e Bustamante [49], em que as extremidades do DNA são ligadas à microesfera e ao fundo da lamínula pela afinidade entre a vitamina biotina e a proteína estreptavidina. Trabalhamos num regime de forças da ordem de piconewtons (pN), e através do referido protocolo esse regime de forças não é suficiente para desprender as extremidades do DNA do fundo da lamínula ou da microesfera.

Para se ter um experimento bem sucedido o DNA deve permanecer duplamente afixado durante todos os estiramentos pelos quais passará, desde a busca manual até a última troca de alíquota, o que pode girar em torno de 50 estiradas. Se a ligação entre o DNA com a microesfera e/ou com a lamínula de vidro for fraca, haverá uma grande probabilidade de o mesmo se desprender durante o experimento. Adquirimos a microesfera já recoberta com estreptavidina pelo fabricante e com $3 \mu m$ de diâmetro. Já a lamínula de vidro passa por um processo de recobrimento durante a construção do porta-amostra e para este recobrimento da lamínula usamos o método de Amitani [50]. Simultaneamente preparamos a solução com microesferas e DNA e também procedemos à montagem do porta-amostra, como descrito.

3.5.2.1 Construção do porta-amostra

- i-* Uma lamínula de vidro de fina espessura é a base do porta-amostra. Sobre esta lamínula é colado um anel de borracha de raio 0,4 cm (*oring*). Ele é colado sobre a lamínula usando parafina derretida, que tem uma dupla função, ser a cola para fixação e vedar a área do anel para conter a solução.
- ii-* São inseridos na área interna do anel 20 μL de BSA-biotinilada (BSA-biot) em uma solução que chamamos de tampão A ², na concentração de 1,8 $\mu g/mL$. Esta solução permanece na área do anel de borracha por 20 *min* em temperatura ambiente e sob luz ultravioleta para evitar proliferação de bactérias. A BSA (proteína albumina de soro bovino) é uma proteína que tem a função de recobrir o fundo da lamínula de vidro. Uma de suas extremidades se liga ao vidro e a outra que está ligada à vitamina biotina ficará exposta à solução.
- iii-* Após os 20 *min* retira-se o excesso de solução de BSA-biot e lavamos a lamínula suavemente com 20 μL de tampão A.
- iv-* Coloca-se agora na área do anel 20 μL da proteína estreptavidina (STP) em solução tampão (PBS), na concentração de 0,1 mg/mL . Novamente, esta solução permanece na área do anel de borracha por 20 *min* em temperatura ambiente e sob luz ultravioleta para evitar proliferação de bactérias. A estreptavidina liga-se fortemente à biotina que está agarrada à BSA.
- v-* Após os 20 *min* retira-se o excesso de solução de estreptavidina e lavamos a lamínula suavemente com 20 μL de tampão PBS.
- vi-* Espera-se por 20 minutos em temperatura ambiente e ainda sob luz ultravioleta. Durante esta espera o fundo do porta-amostra é seco e a perda de moléculas de água entre as proteínas e vitaminas é importante para garantir uma ligação forte.
- vii-* Após a secagem do porta-amostra, ele é levado para o microscópio e preso ao estágio piezoelétrico, onde estará pronto para receber a solução contendo o DNA e as microesferas.

²O tampão A é uma solução tampão previamente preparada com 10 *mM* de $MgCl_2$, 40 *mM* de KCl , e 25 *mM* de $Tris HCl$ em *pH* 8,0.

Como dito antes, o DNA passa por um processo no qual tem suas extremidades biotinizadas e uma delas se ligará à microesfera e outra ao fundo da lamínula. Assim é necessário que as microesferas e o fundo da lamínula estejam recobertos com estreptavidina.

3.5.2.2 Preparo da solução de DNA - pinça óptica

- i-* Colocamos 20 μL do tampão PBS em pH 7.4 e concentração de 150 mM de NaCl em um microtubo (*ependorf*). Retiramos de uma solução estoque 2 μL de microesferas de poliestireno marcadas com estreptavidina e acrescentamos ao microtubo. Da solução previamente preparada de λ -DNA biotinizado, retiramos 5 μL e também acrescentamos ao microtubo, que é então levado a um banho térmico a 37 °C por uma hora. Esta é uma temperatura na qual haverá otimização das ligações das proteínas e vitaminas da extremidade do λ -biot e das microesferas.
- ii-* Completada a hora, acrescentamos 80 μL de PBS 7,4 e aguardamos mais 10 *min* para homogeneização da solução.
- iii-* Levamos a solução ao microscópio introduzindo-a ao porta-amostra com uma pipeta.
- iv-* Aguardamos aproximadamente entre 30 *min* e 1 *hora* para que uma extremidade livre do DNA, marcado com biotina, se ligue à estreptavidina do fundo da lamínula.

Capítulo 4

Eletroforese em Gel de Agarose

A eletroforese pode ser resumida como uma técnica que mede a mobilidade de partículas carregadas dentro de uma matriz porosa de um gel, impulsionadas pela ação de um campo elétrico externo. As partículas carregadas permanecem basicamente sob ação de duas forças, uma força elétrica e uma força de atrito. A força elétrica gera a movimentação e tem origem ao se estabelecer uma diferença de potencial nas extremidades do gel. A força de atrito dificulta a movimentação das partículas e tem origem na rede de poros do gel. É comum um tipo específico de matriz porosa para diferentes intervalos de tamanhos das partículas. Assim a matriz porosa acoplada ao campo elétrico atua separando partículas carregadas e/ou seus fragmentos. As partículas de maiores cargas, menores tamanhos e até com formatos apropriados se movimentam mais pelos labirintos do gel. A mobilidade torna a técnica adequada para manipulação, extração, purificação e identificação de macromoléculas como DNA's, RNA's e proteínas. A análise das imagens pode fornecer informações acerca de um processo pelo qual um agente modifica a conformação (condensação) do DNA em solução [27, 51, 52].

4.1 Metodologias Experimentais para a eletroforese

A metodologia para a eletroforese é relativamente simples, principalmente quando comparada aos passos de preparo, manipulação e controle da pinça óptica. Preparamos as amostras a serem analisadas e simultaneamente o gel de agarose, no interior do qual ocorrerá o deslocamento das amostras. O gel é preparado no mesmo tampão que será a solução eletrolítica a preencher a cuba da corrida eletroforética.

As amostras são preparadas de acordo com o material que se quer analisar e com o tipo de análise a se fazer. Elas podem ser soluções de DNA, RNA e proteínas. São também elementos dessas amostras alguns tipos de substâncias interagentes que podem modificar a configuração (estrutura, conformação, etc) daquelas. Durante o preparo das amostras devem ser observadas condições ideais de interação, como o tempo de interação, temperatura e o meio no qual se dará a interação.

Os equipamentos utilizados num experimento de eletroforese são poucos, exigem controles simples e são de rápida operação. Inicialmente há uma centrifugação, usada nos passos finais da etapa de preparo das amostras, depois uma fonte de tensão controla o campo elétrico em uma cuba onde ocorre a corrida eletroforética. Após a corrida utiliza-se um equipamento, chamado transiluminador, que fornece iluminação para excitação das amostras e também gera imagens a partir da fluorescência delas. A figura 4.1 resume bem os passos seguidos durante um experimento de eletroforese.

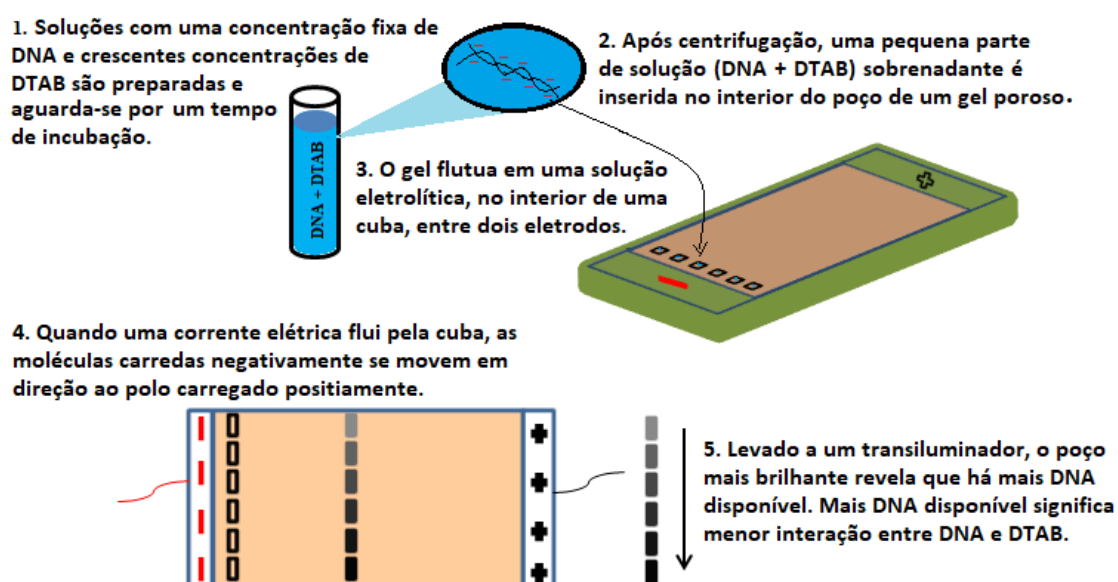


Figura 4.1: **Representação esquemática da Eletroforese.** Partículas carregadas se movimentam no interior de um gel, dentro de uma cuba eletrolítica, sob a ação de uma diferença de potencial externa.

Todas as corridas eletroforéticas de nossos experimentos tiveram um tempo de duração de uma hora e ocorreram sob uma diferença de potencial de 75 volts.

4.1.1 Preparo do gel e da solução eletrolítica

A mobilidade das amostras serão observadas no interior de um gel, que estará mergulhado em uma solução eletrolítica. A solução eletrolítica é uma solução condutora e foi preparada a partir do tampão TAE, diluído 10 vezes, em pH 7.4 e onde foi adicionado uma concentração de 150 *mM* de NaCl como eletrólito. O tampão é uma solução fisiológica que simula condições *in vivo*, em que se preserva a condição biológica das macromoléculas.

Para o preparo do gel é aquecida uma solução com agarose 1 % misturada na solução tampão. O formato do gel com os poços de alocação das amostras é alcançado moldando-o durante o resfriamento em um recipiente apropriado, como o representado na figura 4.2. Nestes experimentos utilizamos o gel com seis poços.

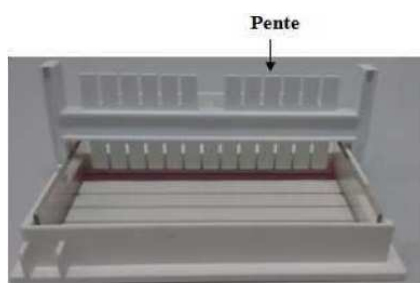


Figura 4.2: **Recipiente de preparo do gel.** Os dentes do pente formam os poços de alocação das amostras no gel. **Extraída da referência [51]**

4.1.2 Preparo das amostras - eletroforese

O material preparado descrito nesta seção refere-se àquele em que estarão juntos o DNA e o DTAB em solução para que seja estudada a interação. O DNA utilizado é o DNA do bacteriófago λ , porém na eletroforese ele não possui a marcação com biotina, e é adquirido na fornecedora Promega, na concentração de 465 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por sua vez, o DTAB utilizado foi fornecido pela SIGMA-ALDRICH. O DNA e o DTAB passam por uma diluição inicial para formar uma solução estoque, da qual serão novamente diluídos para formar as soluções experimentais. São preparadas seis (6) soluções com volume de 30 μl , sendo uma delas apenas com DNA para que forme o poço de comparação. Nas demais cinco (5) soluções estão contidas as devidas proporções entre DNA e DTAB de tal forma que o primeiro (DNA) sempre tenha uma concentração fixa de 2,4 μM de pares de base em cada solução. As quantidades de DTAB seguirão dois procedimentos diferentes. Para o primeiro seguiu-se a mesma proporção DTAB-DNA do estudo feito a respeito da interação via pinça óptica, o que ocorreu ainda de duas formas distintas, uma

com tempo de incubação de 30 minutos e outra com um tempo de incubação prolongado de 12 horas. Para o segundo procedimento, trabalhamos com concentrações bem mais altas de DTAB em relação aos mesmos 2, 4 μM de pares de base de DNA, mantendo o tempo de incubação de 30 minutos.

- i-* Retiramos da solução estoque 1 μL do λ -DNA fornecido pela Promega e distribuímos em seis microtubos (eppendorf).
- ii-* Acrescentamos quantidades diferentes de DTAB a cada microtubo de tal forma a atingir a concentração desejada para estudo.
- iii-* Completam-se os 30 μL de solução de cada microtubo com o tampão PBS em pH 7,4 e concentração de 150 mM de NaCl.
- iv-* Aguarda-se pelo tempo de incubação à temperatura de 20 °C.
- v-* Terminado o tempo de incubação os seis microtubos são levados para a centrifuga por 20 minutos a 14.000 rpm.
- vi-* Após a centrifugação retiramos 8 μL da solução sobrenadante e acrescentamos 1 μL do corante que dará à solução maior densidade que o tampão TAE¹ da cuba eletrolítica.
- vii-* Acrescentamos a cada microtubo 1 μL do marcador fluoresente Gel-Red para a visualização no transiluminador.

¹TAE: Tris-acetato (400 mM) e EDTA (10 mM). Usamos este tampão, diluído 10 vezes e acrescido de 150 mM de NaCl, como a solução eletrolítica.

Capítulo 5

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Podemos resumir o espalhamento dinâmico de luz como a técnica capaz de correlacionar fótons espalhados a partir do dinamismo de partículas iluminadas por uma fonte de luz. Por isso a técnica recebe também o nome de Espectroscopia de Correlação de Fótons.

Partículas suspensas num meio líquido estão sobre a constante composição dos movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais, os quais ocorrem generalizadamente em função do movimento browniano. Incidir luz sobre as partículas nestas situações as faz espalhar esta luz em diversas direções. Coletar e correlacionar a luz em determinado ângulo do espalhamento revela informações acerca do movimento difusivo da partícula no meio líquido em questão. [53–55]

Uma das privilegiadas informações reveladas é o raio hidrodinâmico das partículas, que é o raio do volume esférico ocupado devido à acomodação da partícula no meio líquido. Este volume está relacionado a condições estruturais da partícula e a condições do meio líquido, como a condição iônica, concentração, temperatura, etc. Como a técnica de DLS é uma técnica sobre média de conjuntos, o volume encontrado é a média do volume das várias partículas que estão presentes na solução. O raio hidrodinâmico é matematicamente definido por:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}, \quad (5.1)$$

onde k_B é a constante de Boltzman, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade do meio e D é o coeficiente de difusão.

O raio hidrodinâmico está então relacionado ao coeficiente de difusão pela equação 5.1, chamada equação de Stokes-Einstein. Esta relação entre R_h e D é de extrema importância, pois características da luz espalhada estão relacionadas com o coeficiente de difusão ¹, possibilitando

¹O coeficiente de difusão das partículas é o mesmo que teria uma esfera nessa mesma solução

a conexão entre o tamanho das partículas com a luz espalhada.

Os sinais espalhados pelo movimento das partículas flutuam temporalmente e da correlação deles é que se estabelece o vínculo entre o tamanho das partículas e o espalhamento da luz incidente. A função que relaciona os sinais chama-se função de autocorrelação e ela o faz pelo cálculo da intensidade média dos sinais entre um tempo t e $t + \tau$ posterior, sendo expressa matematicamente por;

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I^2(t) \rangle}. \quad (5.2)$$

onde τ é o incremento de tempo.

A função possui valor máximo num intervalo de tempo muito pequeno ($\tau \rightarrow 0$), mas tem um decaimento exponencial à medida que o intervalo de tempo aumenta, e portanto há maiores movimentações das partículas espalhadoras. Dependendo das características do sistema analisado o decaimento é dado por uma exponencial simples e nestes casos a função de autocorrelação pode também ser expressa na seguinte forma;

$$G(\tau) = \exp\left(-D \left(\frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2}\right)^2 \tau\right). \quad (5.3)$$

onde n é o índice de refração do meio, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, θ^2 é o ângulo entre a radiação espalhada e a incidente e D é o coeficiente de difusão. [53–55]

5.1 Metodologias Experimentais para o DLS

A metodologia de preparo e condução de um experimento DLS é bastante simples. Nos passos de preparo das soluções deve-se incluir um cuidado detalhado do recipiente (figura 5.1), uma cubeta de quartzo (ZEN 2112), em que estará a amostra de análise. Ela deve estar completamente livre de quaisquer contaminações, pois, elas serão também fontes de espalhamento de luz além, é claro, de contaminar as amostras biológicas, podendo conferir-lhes tamanhos impróprios e danificar suas estruturas.

²Veja figura 5.2

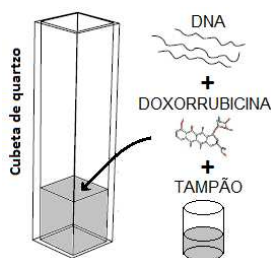


Figura 5.1: **Cubeta de quartzo e solução DLS.** Uma solução contendo a amostra é preparada e inserida numa cubeta de quartzo para análise no Zetasizer Malvern.

As cubetas são inseridas num instrumento de análise Zetasizer da Malvern, com ângulo de detecção a 173° , o qual possui como principais componentes um emissor para incidência da luz laser sobre as amostras, um detetor do sinal espalhado e um correlacionador, que faz a associação do grau de semelhança da luz espalhada. A figura 5.2 é uma ilustração do experimento de espalhamento de luz.

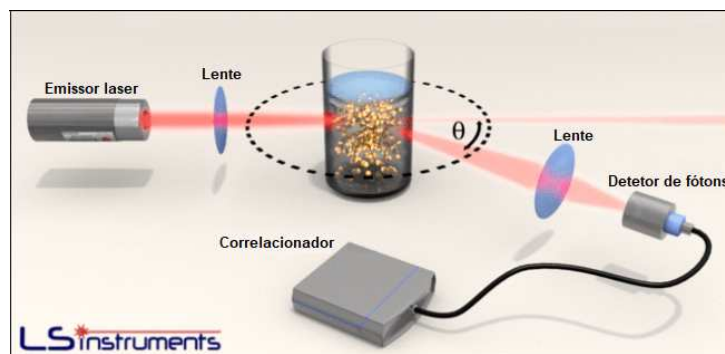


Figura 5.2: **Esquema de funcionamento DLS.** No interior do Zetasizer um emissor laser dispara luz sobre a amostra, que espalha esta luz. A luz espalhada é detetada num ângulo θ e correlacionada. **Figura extraída do site da Ls instruments** disponível no endereço https://www.lsinstruments.ch/technology/dynamic_light_scattering_dls/

As informações de análise são obtidas a partir de picos de intensidade da luz espalhada pelos objetos espalhadores. As curvas de flutuações de intensidades e da função de autocorrelação evidenciam a qualidade dos sinais e grau de pureza das amostras.

5.1.1 Preparo das amostras - DLS

Foram estudadas três tipos de amostras pelo espalhamento dinâmico de luz. Duas delas para retirarmos informações sobre a autoagregação da doxorubicina em soluções sob diferentes condições iônicas. Na terceira amostra, estudamos a interação DNA-Doxorubicina numa solução tampão [Tris-HCl (10) mM sem sal], pelo espalhamento, com propósito de compararmos com o comportamento obtido pelas técnicas de pinça óptica e microscopia de força atômica (AFM).

O preparo das amostras para o DLS consiste em preparar soluções com diferentes concentrações. Para estudarmos o processo de autoagregação da doxorubicina preparamos amostras com faixa de concentração de $0,73 \mu M$ até $7,3 mM$, variando essas concentrações em solução tampão Tris-HCl (10 mM sem sal) e PBS (150 mM de NaCl) em pH 7,4.

Para a amostra de comparação com pinça e AFM variamos as concentrações de acordo com a faixa estudada nestas duas últimas. O DNA utilizado foi o DNA de 3000 pares de base (3 kbp) fornecido pela Thermo SCIENTIFIC, pois, como queríamos comparar com os resultados do AFM, usamos o mesmo DNA. Já a doxorubicina foi fornecida pela Sigma Aldrich.

Capítulo 6

Resultados e Discussões

Neste capítulo estão organizados em seções os resultados e suas consecutivas análises e discussões, sobre cada tipo de molécula ligante testada. As interações foram observadas muitas vezes pela óptica de mais de uma técnica de trabalho e estes dados foram organizados aqui de forma que aquele que os ler possa acompanhar suas sequências sem a necessidade de entrar a fundo nos detalhes das técnicas e das metodologias de trabalho.

6.1 Estudos da formação do complexo DNA-Proteína $C_4S_{10}K_{12}$

A motivação para pesquisarmos a interação DNA- $C_4S_{10}K_{12}$ deveu-se à possibilidade de se ter o complexo DNA-proteína funcionalizado como um vírus artificial, que então pudesse transportar algum material de interesse para o interior celular. Esta possibilidade foi amplamente justificada nos artigos do grupo holandês desenvolvedor da proteína (Hernandez-Garcia e equipe) [56, 57]. Como apontado por eles, a alteração de propriedades do DNA pelo encobrimento viabilizado pela proteína pode ser fundamental para passagem do mesmo pela membrana celular. Este fato proporciona tratamentos quimioterápicos, terapia gênica, etc.

Com o objetivo de detectar as alterações das propriedades mecânicas do complexo formado a partir da interação alcançada pela proteína $C_4S_{10}K_{12}$, realizamos experimentos tendo somente a proteína em contato com o DNA e também a proteína em conjunto com a doxorubicina para formarem um complexo com o DNA. No entanto, os dados obtidos pela técnica de pinça óptica não são totalmente conclusivos e outros experimentos são fontes de dados necessários para a conclusão dos trabalhos e uma posterior publicação do entendimento da interação. Tais tra-

balhos estão sendo e/ou foram realizados por diferentes grupos, inclusive na UFV, através do laboratório de Cultura de Células no Departamento de Física.

6.1.1 A proteína $C_4S_{10}K_{12}$

A proteína $C_4S_{10}K_{12}$ é produzida biosinteticamente por um grupo de pesquisa da universidade de Wageningen na Holanda. Ela é composta por uma longa cadeia hidrofílica de 400 aminoácidos, um bloco de dez repetições de octapeptídeos e um bloco de doze aminoácidos de lisina, que é o bloco que se liga ao DNA. A figura 6.1 mostra esquematicamente a montagem da proteína.

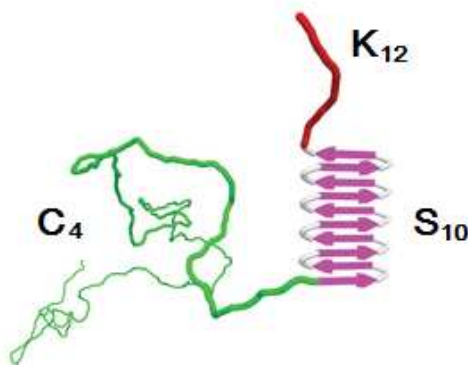


Figura 6.1: **Esquema da proteína** São três blocos que formam a proteína $C_4S_{10}K_{12}$. O bloco C_4 que são 400 aminoácidos formando a cauda da proteína, o bloco S_{10} que é formado por 10 repetições de octapeptídeos e o bloco K_{12} que contém 12 aminoácidos lisina. **Figura extraída da referência [57]**

6.1.2 Apuração das propriedades mecânicas

Nesta seção são apresentados os dados mecânicos da interação DNA- $C_4S_{10}K_{12}$. Primeiramente iremos observar o comportamento da mudança de elasticidade entrópica da molécula de DNA quando ela estiver complexada com diferentes concentrações da proteína $C_4S_{10}K_{12}$. Em seguida discutiremos as mudanças no comprimento de contorno do complexo, de onde pode-se levantar algumas hipóteses acerca da interação.

6.1.2.1 O comprimento de persistência

Como podemos observar na figura 6.2, a proteína $C_4S_{10}K_{12}$ tem ação imediata sobre o comprimento de persistência do DNA, logo nas primeiras alíquotas o complexo DNA- $C_4S_{10}K_{12}$ apresenta tendência a forte flexibilização. O gráfico mostra a persistência em função da concentração de proteína dividida pela concentração de pares de base do DNA.

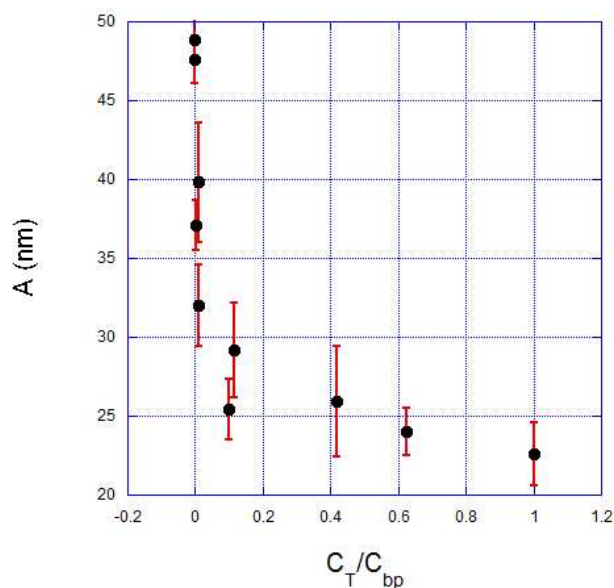


Figura 6.2: **Persistencia por concentração total de proteína normalizada pela concentração de pares de base** O complexo DNA- $C_4S_{10}K_{12}$ torna-se cada vez mais flexível com o aumento de concentração de $C_4S_{10}K_{12}$ por concentração de pares de base disponíveis do DNA.

6.1.2.2 O comprimento de contorno

Ao contrário do ocorrido com o comprimento de persistência, ao observamos gráficos que mostram comportamentos do comprimento de contorno dos complexos DNA- $C_4S_{10}K_{12}$, vistos na figura 6.3, notamos que a proteína não muda muito o comprimento de contorno do DNA, quando ela está em muito baixa concentração. Contudo, assim que está em quantidade suficiente ocorre uma mudança completa na conformação do complexo, o que deixa o sistema com duas fases bastante distintas. Uma delas cujo comprimento de contorno dos complexos parece preservado à mesma forma do DNA puro e outra cujos complexos estão completamente com-

pactados. Na figura 6.3 (a) temos o comprimento de contorno do complexo normalizado pelo comprimento de contorno do DNA puro em função da concentração de proteína normalizada pela concentração de pares de base do DNA. Já na figura 6.3 (b), num gráfico de força por extensão dentro do regime entrópico, temos uma representação dos tamanhos do DNA puro ($L_{C,0}$) e do tamanho do complexo compactado (L_C), revelando que o complexo DNA- $C_4S_{10}K_{12}$ atinge aproximadamente 1/3 do tamanho do DNA puro.

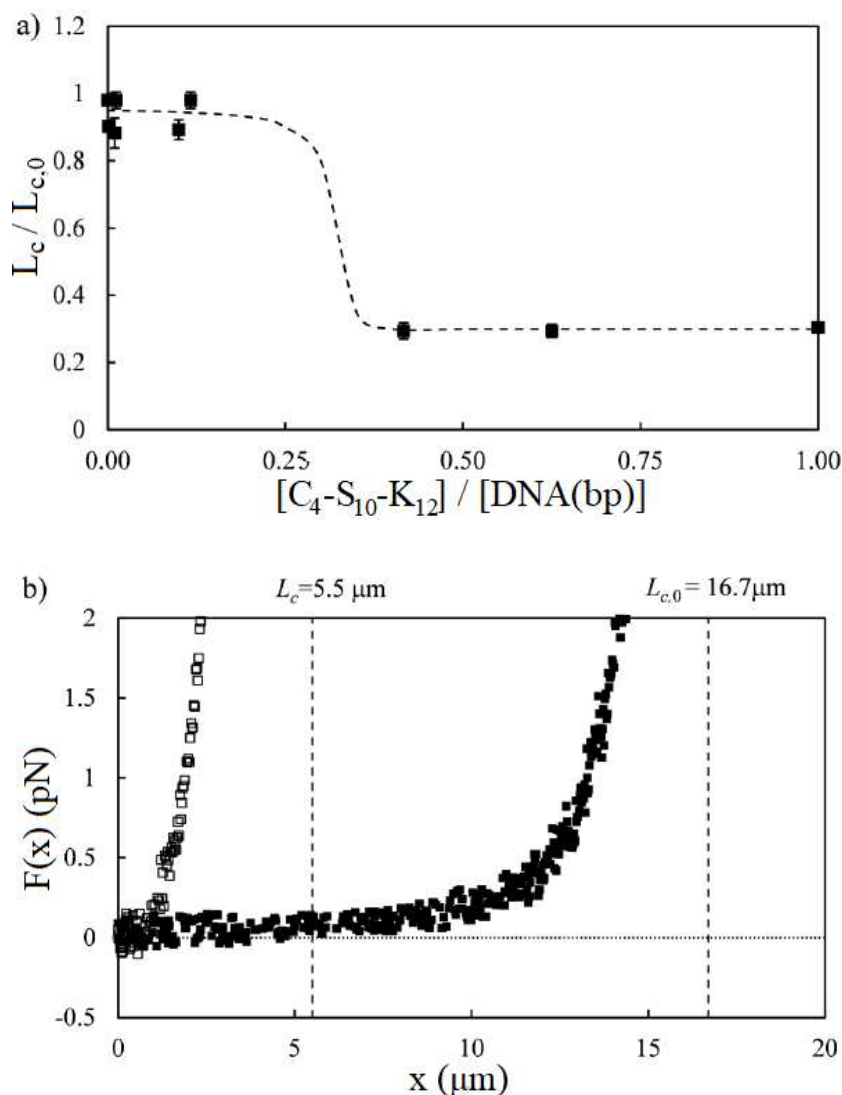


Figura 6.3: **Gráficos: Comprimento de contorno dos complexos DNA- $C_4S_{10}K_{12}$.** (a) Comprimento de contorno (normalizado por $16.5 \mu m$) versus concentração de proteína (normalizada pela concentração de pares de base do DNA). O contorno é bastante alterado a partir de determinada concentração. (b) Gráfico de força por extensão. A primeira curva (\square) representa o contorno final do complexo (L_C), que alcança $\approx 1/3$ do comprimento do DNA puro ($L_{C,0}$), representado na segunda curva (\blacksquare).

Um dos itens almejados a se conhecer quanto a interação de um ligante compactador do DNA é quanto ao processo de compactação. Deseja-se saber sobre a organização estrutural

da molécula compactada. Para compreender os resultados alcançados em nossas pesquisas é importante saber que a proteína tem facilidade de se agregar em solução e por isso ela pode estar na forma monomérica e/ou agrupada em solução. No entanto, cada um destes formatos é capaz de compactar o DNA. A partir da figura 6.4, onde temos gráficos que representam curvas de força por extensão em regimes de altas forças, pode-se obter informações características do processo de compactação.

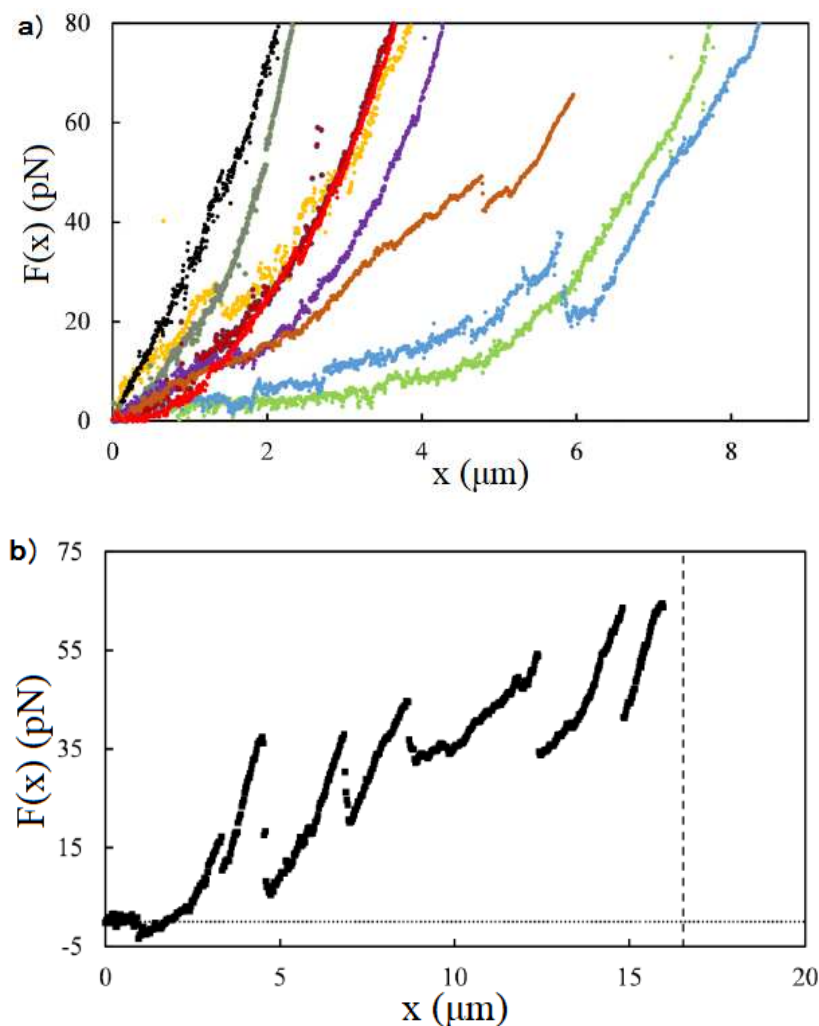


Figura 6.4: **Força por extensão em regime de altas forças.** (a) $C_4S_{10}K_{12}$ interagindo em formato monomérico, onde cada cor representa o desenrolar de um complexo DNA- $C_4S_{10}K_{12}$ diferente. (b) $C_4S_{10}K_{12}$ interagindo agregada. Note que há dois processos de descompactação. Em um deles há um desenrolar suave do complexo e no outro uma ruptura de blocos.

Os estiramentos em regime de alta força do complexo DNA- $C_4S_{10}K_{12}$ já compactados são estiramentos que obrigam o sistema a se descompactar e nos revelam as informações desejadas. Na figura 6.4 (a) o DNA foi complexado com a proteína na forma monomérica. As curvas, em diferentes cores, são referentes a vários DNA's e todas elas referem-se à mesma taxa de

proteína por par de base do DNA. Ela indica que o complexo DNA-proteína, na condição de proteína monomérica, é compactado de forma muito organizada e em estruturas bem pequenas. Na figura 6.4 (b) o DNA foi complexado com a proteína agregada mostrando que a proteína primeiramente compacta alguns segmentos do DNA e depois agrupa algumas quantidades de segmentos em blocos, o que é sugerido pelo padrão “dente de serra”.

Da junção das análises destes dados e de outros dados obtidos na Holanda pelo grupo desenvolvedor da proteína, o professor responsável pelo desenvolvimento destas proteínas, Renko De Vrie, elaborou algumas hipóteses sobre os passos de como a proteína estaria atuando para condensar o DNA. As imagens na figura 6.5 retratam a interpretação estimada;

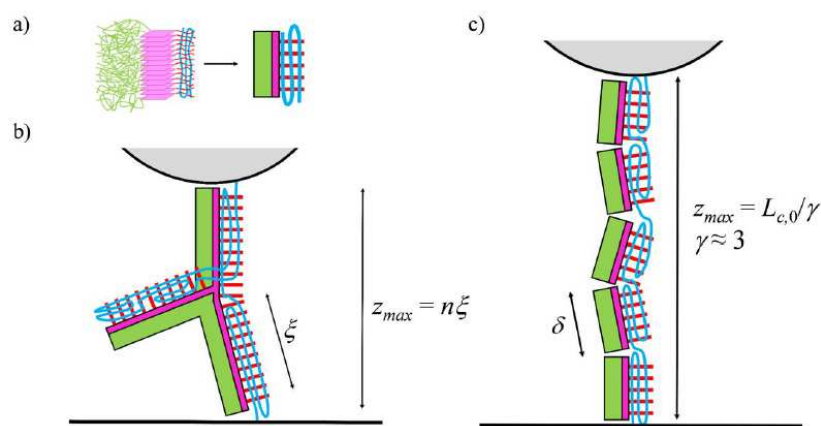


Figura 6.5: **Estrutura hipotética do λ -DNA em processo de compactação pela $C_4S_{10}K_{12}$.** (a) $C_4S_{10}K_{12}$ auto-agregada interagindo com o λ -dna. (b) Com um tempo de incubação prolongado, a $C_4S_{10}K_{12}$ monomérica interage com o λ -dna, com distância característica de $\xi \approx 300 \text{ nm}$ entre os blocos agregados. A extensão máxima seria $z_{max} = n\xi$ e n depende da estrutura dos blocos. (c) Curto tempo de incubação com a proteína auto-agregada apresenta formato linear do λ -dna. A extensão máxima neste caso chega a $z_{max} \approx L_{c,0}/\gamma$, em que $L_{c,0} = 16,5 \mu\text{m}$ e $\gamma \approx 3$ é o fator de empacotamento.

A figura 6.5 (a) retrata uma imagem hipotética da proteína $C_4S_{10}K_{12}$ auto-agregada numa forma de bloco, tendo em sua porção de interação, o λ -DNA todo envolto. Já a figura 6.5 (b) retrata uma hipótese de como o λ -DNA se envolve na proteína ao interagir com ela no formato monomérico e deixada por um tempo prolongado de interação (24 horas). Nesta imagem pode-se inclusive estimar as distâncias entre os blocos, de aproximadamente 300 nm (ξ), e também a extensão máxima aproximada (z_{max}) dependente da estrutura dos blocos (n). Na figura 6.5 (c) tem-se por fim uma hipótese de que ao interagir por um curto período de incubação (30 minutos), a $C_4S_{10}K_{12}$ auto-agregada atuará deixando o λ -DNA condensado num formato linear que atinge uma extensão máxima de aproximadamente 1/3 de seu comprimento de contorno inicial.

Além do que já foi discutido, também foram feitos experimentos para observar uma in-

teração tripla entre o DNA, a proteína viral e o fármaco antitumoral doxorubicina (*DNA* – $C_4S_{10}K_{12}$ – *doxo*). A doxorubicina, como veremos à frente, é um ligante do DNA que interage por intercalação. Por esta razão, poderia ser possível que a adição do intercalante ao complexo compactado *DNA* – $C_4S_{10}K_{12}$ pudesse descompactar o complexo, ou ainda, que uma vez que o DNA tivesse a doxorubicina intercalada, pudesse não mais ser compactado pela proteína. Qualquer uma das hipóteses anterior seria um grande entrave na formação de um carreador. Fizemos os testes para averiguar se o complexo compactado sofreria descompactação com a adição de doxorubicina. Testamos esta possibilidade com altas concentrações da doxo, mas não foram detectados quaisquer sinais de descompactação, o que é um grande sinal de que o complexo possa se tornar um bom carreador. Entretanto, não conseguimos fazer os testes para averiguar compactação pela $C_4S_{10}K_{12}$ do complexo DNA-doxorubicina.

Todos estes dados apurados estão em vias de serem aproveitados para a confecção de um artigo científico para publicação destas importantes observações da interação, entretanto eles estão sob a responsabilidade do grupo desenvolvedor da proteína, na Holanda.

6.2 Estudos da formação do complexo DNA-Doxorubicina

Esta seção destina-se a apresentar algumas características da interação do ligante conhecido como Doxorubicina com o DNA. Informamos sobre algumas evidências desta interação, obtidas através de anos de pesquisa, sob o olhar de diferentes técnicas e perscrutado por grupos de pesquisa em todo o mundo. Revelamos nossos resultados, obtidos por três diferentes técnicas, e comparando-os com as indicações até então divulgadas podemos apontar fatos e aspectos importantíssimos da interação. Nossos resultados foram capazes de apurar peculiaridades físico-químicas e lançar luz sobre certo desconhecimento até então existente no trato DNA-Doxorubicina.

6.2.1 A Doxorubicina

A doxorubicina (doxo), também denominada *Hidroxi-daunorubicina*, comercialmente mais conhecida como *Adriamicina*, é um destacado agente antineoplásico que pertence a uma família de antibióticos denominadas antraciclinas. As antraciclinas formam uma família de antibióticos naturalmente fluorescentes capazes de atuar na inibição da topoisomerase II, uma

enzima extremamente presente nos processos metabólicos e de estruturação do DNA, como transcrição, replicação, recombinação, etc.

A doxorubicina sofre excitação no comprimento de onda de $\sim 480 \text{ nm}$ e exibe emissão máxima de fluorescência por volta de $\sim (560 - 590) \text{ nm}$ quando livres, mas a eficiência fluorescente sofre extinção gradativa à medida que a interação com o DNA ocorre [58]. Ela é designada pela IUPAC como $(8S, 10S) - 10 - (4 - \text{amino} - 5 - \text{hidroxi} - 6 - \text{metil} - \text{tetrahidro} - 2H - \text{piran} - 2 - \text{iloxi}) - 6, 8, 11 - \text{trihidroxi} - 8 - (2 - \text{hidroxiacetil}) - 1 - \text{methoxi} - 7, 8, 9, 10 - \text{tetrahidrotetraceno} - 5, 12 - \text{diona}$. É um composto de dois radicais diferentes, sendo um formado por um grupo aglicona, composta por anéis tetracíclicos, e um radical açúcar denominado daunosamina. Ela possui fórmula molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}$, consoante com a estrutura molecular vista na figura 6.6.

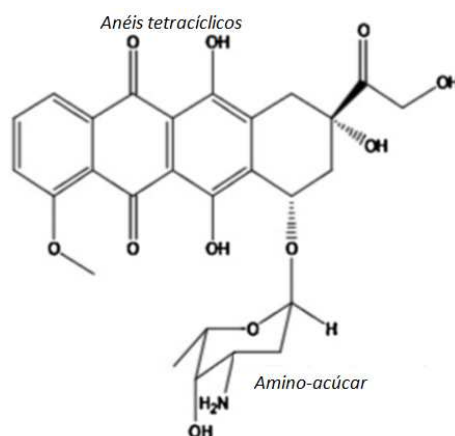


Figura 6.6: **Estrutura molecular da doxorubicina.** Este ligante possui dois radicais; um radical formado por um grupo de quatro anéis aglicônicos e um radical amino-açúcar. Adaptada da referência [59].

Desde sua descoberta, há aproximadamente seis décadas, a doxo vem sendo amplamente utilizada em tratamentos quimioterápicos. Ela é efetiva no combate a leucemia, linfoma, cancer de pulmão e muitos outros. Além do importante uso, a doxo tornou-se também alvo de intensos estudos sobre sua ligação com a dupla hélice. No entanto, as pesquisas não têm apontado com total certeza qual é o modo de interação predominante. A doxo é um ligante que possui como característica mais comumente detectável a intercalação. No entanto, dados experimentais de diferentes tipos de técnicas, em geral, desviam-se um pouco daqueles apresentados por típicos intercalantes. Em função destes desvios alguns pesquisadores conduziram seus trabalhos com a intenção de perceber possíveis traços de outros modos interativos. Há trabalhos que propõem um segundo modo de interação como ligação de fenda, outros que assinalam para um processo de intercalação sequencial e ainda há alguns que discutem a importância do radical amino-açúcar durante o processo, seja por interação eletrostática pura ou ligação nas fendas [59–61].

Na pesquisa conduzida por Airoidi e equipe [61], por exemplo, foi discutida a possibilidade da não-seletividade de ligação da doxo por sítios do DNA. Eles conduziram seus experimentos por uma sorte de técnicas sobre várias moléculas, como dicroísmo circular, espectro de absorção no ultra violeta - visível, fluorescência e outras, e apontaram dados que evidenciam ser indistinguível a afinidade da doxo por regiões do DNA ricas em pares GC ou AT.

Assim como para toda a família das antraciclínas, é reconhecido que a doxorubicina possui alta toxicidade para as células, sendo capaz de provocar uma série de efeitos colaterais. Esta citotoxicidade, especialmente a cardiotoxicidade, é extremamente danosa ao organismo e é dose-dependente, podendo conduzir o paciente da quimioterapia a outros males algum tempo após a exposição às antraciclínas. Visando a redução da citotoxicidade, há uma série de propostas de alterações na família antraciclínica, porém poucos compostos frutos de tais alterações foram aprovados para uso clínico [62]. Esta família de quimioterápicos também tem elevada facilidade de auto-agregação. Condições de temperatura, concentração e força iônica (como mostraremos mais adiante) parecem ser fundamentais para o tamanho dos agregados, sendo mais comumente reportada a dimerização. É sugerido por vários trabalhos que essa auto-agregação compete com a ligação com o DNA [63], que como veremos nos resultados deste trabalho, interfere fortemente nas mudanças mecânicas e conseqüentemente na caracterização físico-química do sistema, apontando claramente uma excelente explicação para o processo de interação.

6.2.2 Propriedades mecânicas e físico-químicas do complexo DNA-Doxorrubicina

Nesta seção mostramos os resultados gerados pela interação DNA-Doxo via pinça óptica e espalhamento dinâmico de luz. Estes dados foram também confirmados via microscopia de força atômica através dos trabalhos da pesquisadora Raniella Bazoni, à época integrante do nosso grupo de trabalho. Através de alterações detectadas nos comprimentos de contorno e persistência do DNA, por meio de complexação com ligantes, é possível estabelecer as relações físico-químicas da interação. Nos experimentos com a doxorubicina usamos os dados do contorno para a caracterização físico-química, pois os resultados da persistência apresentaram forte dependência com a força externa, conforme será evidenciado e discutido mais a frente.

6.2.2.1 Comprimento de Contorno e seu uso para deduzir as propriedades físico-químicas da interação

Extraímos os dados mecânicos da interação DNA-doxo em experimentos com pinça óptica, variando a concentração total de doxorubicina (C_T) entre $C_T = 1 \mu M$ e $C_T = 12 \mu M$ e mantendo fixa a concentração de pares de base do DNA (C_{bp}), a qual é $C_{bp} = 2,4 \mu M$. A concentração total de doxorubicina é definida como a soma da concentração de ligantes livres (C_f) mais a concentração de ligantes ligados (C_b) em solução. Tal faixa de concentrações de doxo foi suficiente para detectarmos as mais relevantes alterações na mecânica da interação. Os complexos DNA-doxo foram observados sob duas diferentes soluções iônicas, sob o tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline - PBS) de concentração $[NaCl] = 150 \text{ mM}$ e também sob o tampão tris(hidroximetil)aminometano-HCl de concentração $[Tris - HCl] = 10 \text{ mM}$. Na figura 6.7 nós mostramos dois gráficos com curvas de força por extensão para três concentrações de doxorubicina, sendo um sistema gráfico para cada tampão.

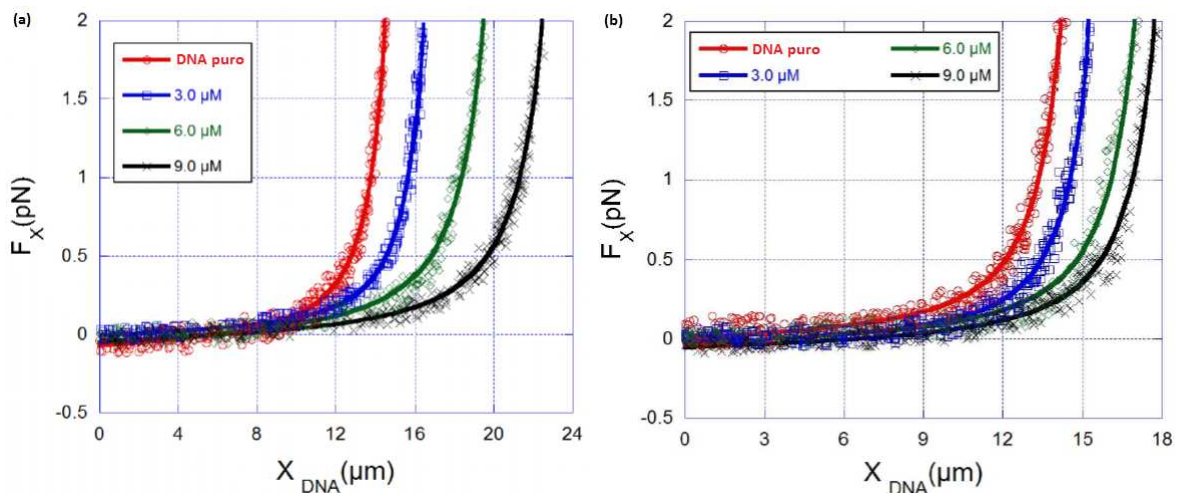


Figura 6.7: Curvas de força por extensão dos complexos DNA-Doxo para três diferentes concentrações (C_T) de doxo. (a) no tampão Tris-HCl e (b) no tampão PBS.

- : $C_T = 0$, DNA puro;
- : $C_T = 3 \mu M$;
- ◇: $C_T = 6 \mu M$;
- ×: $C_T = 9 \mu M$, representam a solução já saturada com doxorubicina.

Estão presentes nos gráficos os dados experimentais e seus devidos ajustes pelo modelo WLC. Os círculos vermelhos são os dados experimentais para o DNA na forma nativa, ou com concentração nula de doxorubicina $C_T = 0$. Os quadrados azuis representam o DNA interagindo com $C_T = 3 \mu M$ referindo-se a uma taxa de $C_T/C_{bp} = 1,25$. Os losangos verdes com

$C_T = 6 \mu M$ correspondem à taxa de $C_T/C_{bp} = 2, 5$, e os “x’s” pretos representam a solução já saturada com doxorubicina, na qual $C_T = 9 \mu M$ equivale a uma taxa de $C_T/C_{bp} = 3, 6$. As curvas apresentam análise com valores de forças dentro do regime entrópico de até $2 pN$.

Observamos que a extensão máxima dos complexos DNA-doxo, dentro da referida faixa de concentrações totais de doxo, aumenta à medida que aumentamos a concentração de doxorubicina na solução. Na tabela 6.1 a seguir, enumeramos os valores do ajuste de nossos dados experimentais (usando o modelo WLC) para os comprimentos de contorno (L_c) para as curvas acima. Além do que pode ser observado graficamente, a tabela evidencia o aumento do contorno para maiores concentrações de doxo e também realça que para o tampão PBS o aumento do contorno é menor que aquele obtido no tampão Tris-HCl.

Tabela 6.1: Valores do contorno (L_c), pelo WLC, para as curvas da figura 6.7.

Comprimentos (tampão)	DNA puro	$3 \mu M$	$6 \mu M$	$9 \mu M$
$L_c(\text{Tris} - \text{HCl})$	$16.9 \mu m$	$18.7 \mu m$	$22.6 \mu m$	$25.7 \mu m$
$L_c(\text{PBS})$	$16.7 \mu m$	$17.6 \mu m$	$19.6 \mu m$	$20.3 \mu m$

Na figura 6.8 apresentamos o comportamento do comprimento de contorno relativo ($\Theta = (L - L_0)/L_0$) em função da concentração total de doxo, normalizada pela concentração de pares de base do DNA (C_T/C_{bp}). Os quadrados azuis apontam os efeitos no comprimento relativo para inserções do ligante no tampão Tris-HCl, enquanto os círculos pretos mostram a interação do ligante no tampão PBS. As barras de erro foram calculadas pelo erro padrão da média e os ajustes, representados pelas curvas em vermelho, foram feitos empregando-se um modelo de aproximação pelo comprimento de contorno [19], o qual viabiliza a extração de parâmetros físico-químicos a partir de parâmetros puramente mecânicos. Tal metodologia possibilita análises de interações com o DNA, para quaisquer tipos de ligantes, utilizando um número reduzido de técnicas experimentais [15–17, 19, 64–66]. Observamos que há um comportamento monotonicamente crescente para os complexos doxo-DNA nas duas soluções tampões ao aumentar-se a taxa de doxo por par de base do λ -DNA. No entanto, o aumento é notavelmente maior em Tris-HCl, no qual a interação atinge a saturação para $\Theta \sim 0.28$, enquanto que a saturação é atingida em $\Theta \sim 0.21$ para o tampão PBS. Desde que aumentos no comprimento de contorno são relacionados diretamente a processos intercalativos, podemos inferir que a intercalação é favorecida para os complexos formados em Tris-HCl, tampão no qual a força iônica é consideravelmente menor ($[NaCl] = 0$). Além disso, nitidamente observamos que a forma da curva para o complexo em Tris-HCl é aquela típica para a maioria dos intercalantes [17, 18, 65, 67–70], ao passo que os dados observados no tampão PBS, apresentam uma forma suavemente sigmoideal, indicando possibilidade de existência de algum outro modo de ligação além da intercalação, ou

que pode haver significativa cooperatividade entre as moléculas da doxorubicina [19]. O professor Márcio Santos Rocha e equipe, em estudo recente da também antraciclina daunomicina interagindo com o DNA, sob as mesmas condições experimentais (em tampão PBS), revelou comportamento sigmoidal idêntico para o comprimento de contorno em função da concentração total de daunomicina [69].

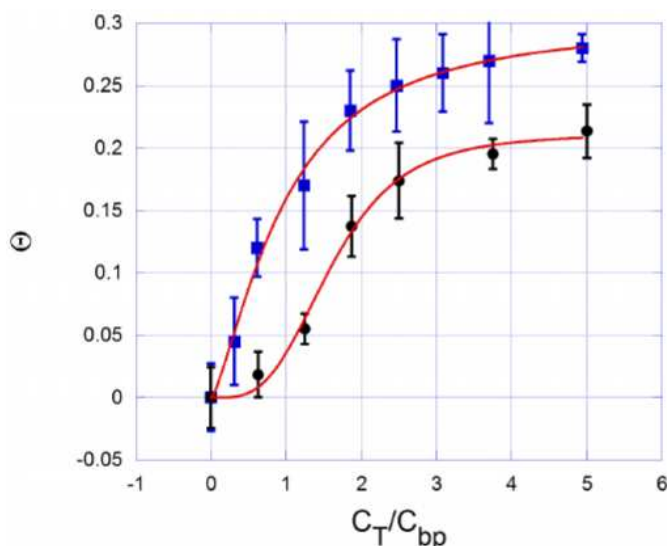


Figura 6.8: **Comprimento de contorno relativo ($\Theta = (L - L_0)/L_0$) em função da concentração total de doxo normalizada pela concentração de pares de base do DNA (C_T/C_{bp}).** Dados obtidos por pinça óptica para ambas as soluções tampão, em que:

- : para o tampão PBS;
- : para o tampão Tris-HCl.

Recentemente, Arnaiz e sua equipe publicaram um trabalho no qual demonstraram evidências de que as moléculas da doxo podem se ligar pelo lado externo da dupla fita do DNA, interagindo umas com as outras através de uma molécula prévia e parcialmente intercalada [59]. Esta revelação deve-se à existência da autoagregação em solução da família das antraciclina, em que é mais forte em soluções de alta concentração iônica, provavelmente devido à diminuição da repulsão eletrostática efetiva entre moléculas de doxo (que são monocatiônicas) [63, 71].

O modelo de análise pelo comprimento de contorno, usado no ajuste dos dados, é perfeitamente capaz de descrever físico-quimicamente a interação do DNA com ligantes, desde que tenhamos o cuidado de interpretar estes dados por meio de uma conveniente isoterma de ligação [15]. Uma vez que tenhamos escolhido cuidadosamente tal isoterma, estaremos aptos a compreender o efeito da força iônica sobre a ligação da doxo com o DNA e extrair todos os parâmetros físico-químicos, interpretando-os adequadamente. Intercalantes obedecem a uma

equação muito bem estabelecida para o contorno relativo, em que;

$$\Theta = (L - L_0)/L_0 = \gamma r, \quad (6.1)$$

onde γ é uma constante típica e aproximadamente igual à unidade ($\gamma \approx 1$ é a taxa na qual o DNA sofre um alongamento por ligante que interage e a distância que separa dois pares de base consecutivos ($\gamma = \delta d/\Delta d$)) e r é a fração de ligantes ligados por pares de base do DNA ($r = C_b/C_{bp}$), cuja saturação ocorre quando $r = r_{max}$ [17–19, 65, 66, 68–70]. Neste ponto temos um trabalho essencial que é o de adequar a melhor isoterma de ligação para esta interação, pois a fração de sítios ligados r pode ser expressa por esta isoterma e desta conexão teremos o ajuste capaz de capturar as propriedades físico-químicas da interação.

Há moléculas que interagem com o DNA de múltiplas formas e há aquelas que interagem de modo único. Quando determinada molécula interage somente por intercalação simples, dispomos de dois modelos de isoterma de ligação que podem ser escolhidas adequadamente para o processo de ajuste: o modelo de exclusão de vizinhos de McGhee - von Hippel e/ou o modelo de Hill, ambos descritos no capítulo 2, nas páginas 22 e 26. Os dois modelos são capazes de descrever eximamente o comportamento monotonicamente crescente do contorno relativo (Θ) observado no tampão Tris-HCl; no entanto, a clássica isoterma de ligação de McGhee - von Hippel (sem cooperatividade) não consegue considerar a forma sigmoideal de Θ obtida para o complexo no tampão PBS (veja figura 6.8).

Tem-se neste ponto uma questão importante quanto ao uso de dois tampões diferentes, assunto que necessita de elucidação para que a análise tenha toda confiabilidade necessária. Primeiramente essa utilização deve-se ao fato de que diferentes técnicas foram empregadas para observar a referida interação. Na microscopia de força atômica (*AFM*) o tampão utilizado é o Tris-HCl por questões de maior efetividade de deposição do DNA à placa de mica, detalhes que podem ser conferidos na tese de doutorado da pesquisadora e colaboradora deste trabalho Raniella Bazoni. Já para os trabalhos com pinça óptica é mais comumente utilizado o tampão PBS com maior proximidade às condições fisiológicas. Entretanto devido ao uso do Tris-HCl no *AFM*, foram repetidos os experimentos com ele também na pinça óptica. O pesquisador Evstigneev e equipe [72] conduziram pesquisa sobre o comportamento da antraciclina daunomicina em diferentes tampões e concluíram que ele é independente do tipo de tampão. Devido à estrutura similar das antraciclinas, eles estendem suas conclusões a todo o grupo antraciclínico. Sendo assim, além do previsto pelo nosso grupo, o trabalho de Evstigneev e equipe deixa claro, portanto, que a doxo comporta-se do mesmo modo em soluções de diferentes tampões, sendo apenas dependente da força iônica.

Com maior clareza, podemos agora realizar uma comparação característica e robusta entre os dados obtidos nos dois diferentes tampões. Foi escolhida a isoterma de ligação de Hill para ajustar ambos os conjuntos de dados, evitando assim erros sistemáticos relacionados ao uso de

diferentes isotermas de ligação. Tal modelo, com sua formulação detalhada no capítulo 2, na página 21, é capaz de considerar a agregação do ligante ao longo da dupla hélice, característica marcante para as antraciclina devido a sua auto-associação. Para nossa visualização, a isoterma de Hill é dada por:

$$r = \frac{r_{max}(k_i C_f)^n}{1 + (k_i C_f)^n}, \quad (6.2)$$

onde k_i é a constante intrínseca de associação no equilíbrio, n é o expoente de Hill, um parâmetro que mede o limite inferior de cooperatividade entre as moléculas do ligante presentes na reação e C_f é a concentração de ligantes livres na solução.

A tabela 6.2 mostra os valores dos parâmetros físico-químicos, obtidos via modelo de análise pelo comprimento de contorno [15, 19], referentes aos processos de ajuste dos dados do comprimento de contorno L_c e vistos na figura 6.8 através das linhas sólidas. Para reduzir o número de parâmetros ajustáveis, o valor de $\gamma = 1$ foi fixado, o qual é o valor esperado para monointercalantes simples, como no caso das antraciclina.

Tabela 6.2: Parâmetros físico-químicos ajustados dos gráficos da figura 6.8.

Tampão	k_i	n	r_{max}
(Tris – HCl)	$(5,3 \pm 1,3) \times 10^5 M^{-1}$	$1,4 \pm 0,4$	$0,30 \pm 0,04$
(PBS)	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^5 M^{-1}$	$3,6 \pm 0,7$	$0,21 \pm 0,02$

Iniciemos comparando os resultados das constantes de ligação (k_i). Elas são as informações que aludem sobre a afinidade do ligante pelo DNA e pelos valores obtidos percebemos que a constante referente ao tampão Tris-HCl é duas vezes maior do que aquela observada para o tampão PBS. Este resultado está relacionado ao fato de que em mais baixas concentrações de sal (10 mM) fortalece-se a interação eletrostática entre os grupos fosfatos (negativos) da estrutura externa do DNA e as monocatiônicas moléculas de doxo, portanto privilegiando a intercalação. Os valores que obtemos para estas constantes de ligação concordam, em ordem de magnitude, com aqueles encontrados para outros membros da família antraciclínica [67, 71].

Já os expoentes de Hill estão mais diretamente relacionados a auto-associação sofrida pela doxo em solução e irão nos permitir estimar o tamanho dos agregados randomicamente espalhados e ligados ao longo da dupla fita do DNA [15, 19, 64]. Como para o tampão Tris-HCl foi obtido um valor de $n = 1,4 \pm 0,4$, tem-se aqui uma indicação de que as moléculas de doxo interagem com o DNA neste tampão, intercalando em monômeros, ou no máximo através da formação de dímeros. Esta conclusão é compatível com a explicação dada por Arnaiz e equipe, que alcançaram usando técnicas de microcalorimetria e diferentes tipos de espectroscopia, também em um tampão de força iônica muito baixa ($[NaCl] = 2,5 mM$) [59]. Estes autores

propõem que os dímeros são uma composição de uma molécula de doxo parcialmente intercalada, que também interage e agrega com outra molécula de doxo que permanece do lado de fora da dupla hélice. Em nossa análise esta é a única configuração possível uma vez que duas ou mais moléculas agregadas de doxo não poderiam intercalar juntas, já que as antraciclínicas são classificadas como monointercalantes. Esta configuração pode ser visualizada na figura 6.9.

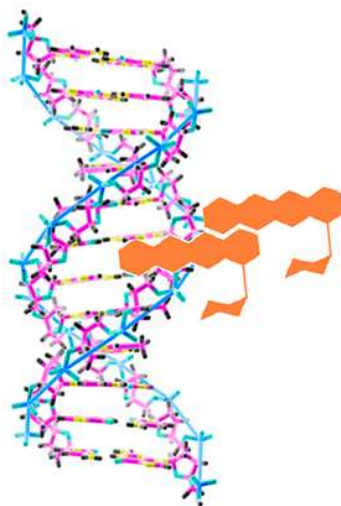


Figura 6.9: **Proposição de dímeros ligados ao DNA por Arnaiz e equipe.** Há uma molécula de doxo parcialmente intercalada que está agregada a outra molécula de doxo que por sua vez permanece no lado de fora da dupla hélice. Adaptada da ref [59]

Por outro lado, o valor encontrado de $n = 3,6 \pm 0,7$ indica que, na situação propiciada pelo tampão PBS, a doxo possui maior facilidade de agregação e os agregados ligados ao DNA são compostos em média por três a quatro moléculas. Mesmo nesta situação, somente uma molécula de doxo é parcialmente intercalada, enquanto as demais permanecem do lado de fora da dupla hélice. Chaires e equipe encontraram resultados compatíveis aos nossos para a também antraciclína daunomicina, alegando que mais altas ordens de agregação da daunomicina ocorre sob alta força iônica ($[NaCl] = 185 \text{ mM}$), a princípio explicando bem seus dados de ligação com os agregados de doxo formados por quatro moléculas. Interpretando os dados proporcionados pelos dois tampões através de interações eletrostáticas, pode-se compreender melhor esta formação de agregados pelo grupo antraciclínico. O comprimento de Debye, que pode ser visto como a informação de uma distância na qual determinada carga é neutralizada por íons numa solução, é quatro vezes maior no tampão Tris-HCl do que no tampão PBS. Em função de uma fraca ação repulsiva de suas moléculas moncatiônicas, uma maior taxa de agregação da doxo é esperada neste último. Frequentemente encontram-se trabalhos reportando agregação de moléculas interagindo com o DNA. Um comportamento similar de agregação foi recentemente encontrado para a molécula de ciclodextrina; no entanto, tais moléculas tinham como fator mo-

dulante da agregação uma repulsão eletrostática baseada na distribuição de cargas superficiais do próprio ligante [64]. Outros trabalhos podem ser encontrados na literatura reportando agregação de ligantes ao longo da dupla hélice [17, 66, 71, 73, 74]. Também podem ser encontradas referências de trabalhos nos quais a força iônica é preponderante e modula o modo pelo qual as moléculas do ligante irão interagir com o DNA [75].

Reforçando a análise descrita até este ponto, está a comparação feita para os valores de r_{max} . Ele representa a saturação da fração de ligantes ligados e possui um valor consideravelmente maior no tampão Tris-HCl ($0,30 \pm 0,04$) em relação ao encontrado para o tampão PBS ($0,21 \pm 0,04$). Este resultado é devido ao fato de que os trímeros e/ou tetrâmeros de doxo encontrados no tampão PBS, ocupam mais espaço e alargam a faixa na qual o próximo agregado não consegue interagir com o DNA, quando comparado com o monômero e/ou dímero ocorridos em Tris-HCl. Os agregados maiores reduzem o número efetivo de sítios disponíveis para a intercalação. De fato, o tamanho efetivo dos sítios ocupados pode ser estimado tomando-se o inverso do valor saturado da fração de ligantes ligados ($1/r_{max}$) [19]. Este cálculo gera um número de 3,3 pares de base no tampão Tris-HCl e de 4,8 pares de base no tampão PBS. Deve ser observado que somente a parte da doxo parcialmente intercalada (e não todo o agregado juntamente com a parte que permanece do lado de fora da dupla fita) irá contribuir para o aumento no comprimento de contorno do complexo DNA-doxo. Por isso, espera-se um aumento menor no comprimento de contorno do complexo sob altas forças iônicas.

6.2.2.2 Comprimento de persistência e a dependência da força externa

Nossa experiência tem mostrado que, para ligantes que interagem com o DNA tendo como principal modo a intercalação, a conexão aos parâmetros físico-químicos não atinge a precisão desejada ao usar as mudanças ocorridas pelo comprimento de persistência. A razão se deve ao fato de que o comprimento de persistência tem apresentado expressiva dependência da força externa que é aplicada aos estiramentos dos complexos DNA-intercalantes, característica que será discutida mais a frente. Dados obtidos pela pinça óptica, retratados na figura 6.10, mostram o comprimento de persistência A do complexo DNA-doxo em função da concentração total C_T de ligante normalizada pela concentração de pares de base C_{bp} , ambos presentes na amostra. As barras de erro foram calculadas pelo desvio padrão da média.

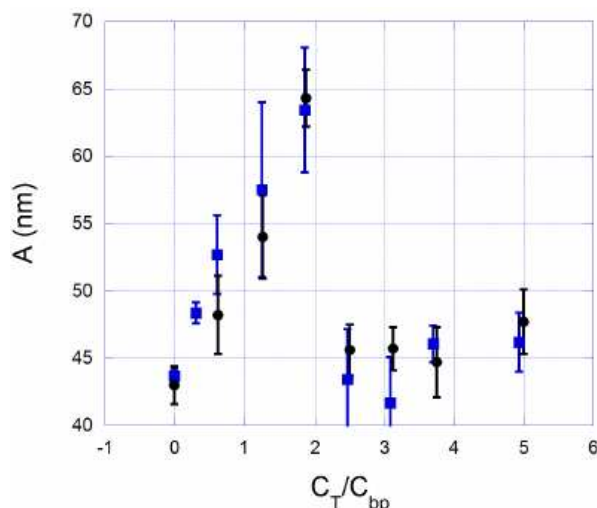


Figura 6.10: **Comprimento de persistência A do complexo em função da concentração total C_T de ligante na amostra.** Note que o comprimento de persistência cresce para baixas concentrações ($C_T < 4,5 \mu M$) e então apresenta queda abrupta para concentrações a partir de ($C_T > 4,5 \mu M$). Esta característica é observada em ambos os tampões, sendo:

- : para o tampão PBS;
- : para o tampão Tris-HCl.

Nitidamente observa-se que o comportamento é o mesmo para ambos os tampões (Tris-HCl representado pelos quadrados azuis e PBS pelos círculos pretos). O comprimento de persistência inicialmente aumenta a partir do valor médio obtido para o DNA puro ($A_0 \approx 43 \text{ nm}$) até determinada concentração ($C_T < 4,5 \mu M$ ou $C_T/C_{bp} \approx 1,9$), quando atinge um valor máximo ($\approx 64 \text{ nm}$) e apresenta uma queda abrupta. A partir desta queda, para mais altas concentrações do ligante ($C_T > 4,5 \mu M$ ou $C_T/C_{bp} > 1,9$) nota-se uma tendência de estabilização do parâmetro “comprimento de persistência” ($A \approx 45 \text{ nm}$), pelo menos dentro das barras de erro e também dentro da faixa de concentrações estudadas neste trabalho.

Ao estudar a figura 6.7, apresentada na página 71, sabe-se que a inclinação das curvas indica o comprimento de persistência, mas naqueles gráficos é difícil concluir o quanto a persistência é sensível à mudança de alíquotas. Entretanto a tabela 6.3 e a figura 6.10 deixam claro que há um aumento inicial considerável seguido por um decréscimo evidente neste parâmetro. Aquelas curvas apresentam na concentração de $C_T = 3 \mu M$ a situação imediatamente antes da transição abrupta e para $C_T = 6 \mu M$ a situação após a mesma, o que é facilmente comprovado pelos dados da tabela 6.3. Em ambos os casos de nossas experimentações, para Tris-HCl e PBS, observamos a queda abrupta em torno da concentração de $C_T \approx 4,5 \mu M$.

Tabela 6.3: Valores da persistência (A), pelo WLC, para as curvas da figura 6.7.

Comprimentos(tampão)	DNA puro	$3 \mu M$	$6 \mu M$	$9 \mu M$
A(Tris – HCl)	46.2 nm	59.9 nm	38.4 nm	43.6 nm
A(PBS)	45.4 nm	62.7 nm	42.3 nm	45.1 nm

Quanto a esta transição de valores na persistência é importante ressaltar alguns detalhes. É característico o aumento nestes valores até que se atinja a saturação em torno de um valor máximo, em casos onde a interação DNA-intercalante é observada por experimentos nos quais não há aplicação de estiramentos do complexo (induzidos pela aplicação de forças externas). Uma constatação que pode ser confirmada pela análise da figura 6.11, obtida em experimentos por AFM pela pesquisadora Raniella Bazzoni e colaboradores [76] ao se estudar a interação DNA-doxo. Nela, temos um gráfico no qual se pode notar que a persistência apresenta aumento monotônico a partir do valor do DNA puro, até atingir o valor aproximado de 110 nm e saturar, mesmo a taxas muito elevadas de moléculas de doxo por par de base do DNA ($C_T/C_{bp} \approx 50$).

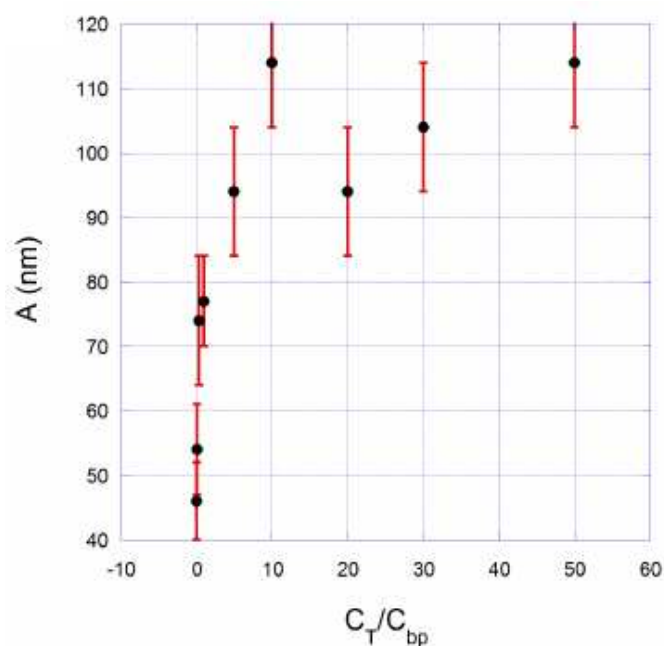


Figura 6.11: Comprimento de persistência A do complexo em função da concentração total C_T de ligante na amostra, obtido em AFM. O gráfico do crescimento da persistência em função da concentração. Note que o comprimento de persistência cresce monotonicamente. **Extraída e adaptada da referência [77].**

Esta situação ainda pode ser observada na figura 6.12, onde estão presentes quatro imagens sequenciais nas quais se pode observar o enrijecimento do DNA por estar submetido a maiores

concentrações de doxo, conclusão observada pelo menor número de dobras da dupla fita.

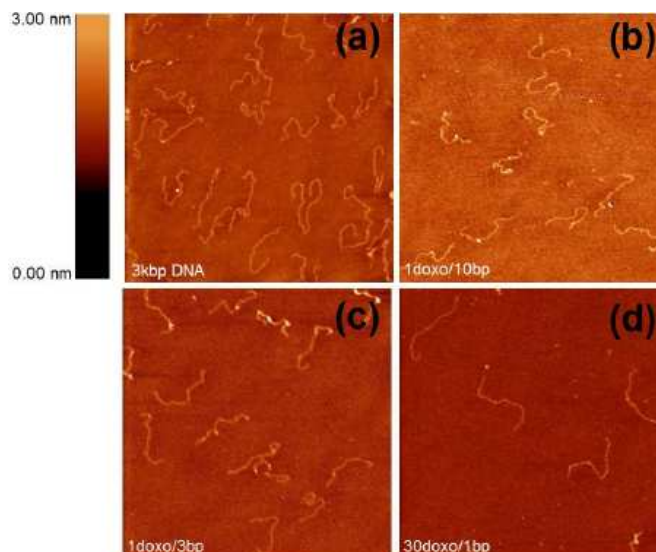


Figura 6.12: **Imagens AFM.** As imagens mostram menores dobras ao se aumentar a concentração de doxo, onde em (A) se tem o DNA puro e em (D) a maior concentração de doxo. **Extraída e adaptada da referência [77].**

Em geral a literatura reporta que, para técnicas em que não são empregadas forças externas para estirar o DNA, a tendência geral dos intercalantes é provocar o aumento no valor do comprimento de persistência dos complexos DNA-intercalantes, como resultado das estruturas locais arranjadas ao longo da dupla hélice, as quais são estabilizadas devido a ligações hidrofóbicas formadas entre as moléculas do intercalante e os pares de base adjacentes do DNA.

No entanto, para experimentos nos quais há aplicação de forças externas aos complexos DNA-intercalantes, a persistência torna-se dependente da força e revela uma queda abrupta em determinada concentração. Dentro das nossas condições experimentais, qualitativamente estes mesmos comportamentos foram verificados para os casos dos intercalantes: brometo de etídio [65,69], psoralen [69], daunomicina [70], diaminobenzidina [68] e o bis-intercalante gel-red [65]. Como observado e discutido de forma aprofundada e clara por Raniella Bazzoni e equipe [76], tal comportamento depende das características experimentais e também da faixa de forças empregadas, normalmente para forças menores que $5 pN$, região na qual se dá o regime entrópico.

Portanto, devido a aplicação de forças externas, fica clara uma diferença drástica do comportamento da persistência nos experimentos onde há e onde não há estiramento do complexo. Tal discrepância pode ser explicada, basicamente, pelo entendimento de que o comprimento de persistência dos complexos DNA-intercalantes é, em geral, dependente da força. É importante considerar que a intercalação provoca um desenrolamento local da dupla fita, pois ela é capaz de exercer um torque que distorce a ligação de hidrogênio ao redor do sítio de ligação. Portanto,

dependendo da concentração de intercalante e do regime de forças de estiramento aplicado, a discussão proposta por Raniella Bazzoni e equipe, conduz à compreensão de que ocorre uma desnaturação parcial ao longo da cadeia do DNA, devido a um processo de aplicação de forças externas à já distorcida dupla hélice. Esta desnaturação parcial é resultado da ação conjunta da intercalação e da aplicação de força externa. A tensão nos sítios ao redor da intercalação leva a uma mudança estrutural local, gerando bolhas de desnaturação ao longo da cadeia de dupla hélice, sendo estas as responsáveis pela diminuição do valor do comprimento de persistência.

Além da suposição de desnaturações parciais locais, outra importante questão está no fato de que a aplicação de forças externas para estirar o complexo DNA-intercalante pode alterar o equilíbrio químico entre as moléculas do intercalante e do DNA. Com efeito, a pesquisa desenvolvida por Ioana Vladescu e equipe [78], mostrou que parâmetros de ligação tais como, constante associativa de equilíbrio e tamanho do sítio de ligação são dependentes da força externa aplicada aos complexos DNA-ligantes. Em particular, eles demonstraram que a constante associativa de equilíbrio aumenta exponencialmente em função da força aplicada. Como esta constante está conectada à concentração de ligante ligado, é de se esperar que as propriedades mecânicas do complexo DNA-ligante sejam realmente dependentes da força aplicada. Além deste, Camunas-Soler e equipe recentemente desenvolveram um outro trabalho no qual evidenciam tais conclusões [73]. Entretanto é difícil explicar o comportamento não-monotônico do comprimento de persistência somente com esta suposição, uma vez que um ou mais parâmetros de ligação poderiam sofrer mudanças abruptas em seus valores na concentração crítica, onde o comprimento de persistência inverte sua tendência. Além disso, como nós aplicamos neste trabalho um regime de baixas forças ($F < 5 pN$), concluímos que as mudanças nos parâmetros de ligação não são relevantes. Logo, acreditamos que somente a mudança estrutural tal como a desnaturação parcial, ou formação de bolhas de desnaturação, pode explicar a queda abrupta detectada no comprimento de persistência, medida pela pinça óptica.

Com intenção de creditar os resultados obtidos pelos dois diferentes tipos de experimentos, com (OT) e sem (AFM) aplicação de forças externas, a interação doxo-DNA foi também submetida a um terceiro tipo de experimento. Até este ponto, os resultados indicam serem factíveis, as discussões sobre desnaturação parcial e geração de bolhas de desnaturação ao longo do complexo doxo-DNA. Usamos como prova para estas discussões a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para coletar informações sobre o comportamento médio sobre várias moléculas, em solução, dos complexos formados por doxo e DNA.

Na figura 6.13, representado pelos círculos pretos, apresentamos o comportamento do raio hidrodinâmico (R_h) obtido pelo experimento de espalhamento dinâmico de luz (DLS), em função da concentração total de ligante normalizada pela concentração de pares de base do DNA (C_T/C_{bp}). Observe que o raio hidrodinâmico cresce monotonicamente em função da concentração total de doxorrubicina, indicando um aumento no tamanho efetivo das moléculas de

doxo-DNA em solução.

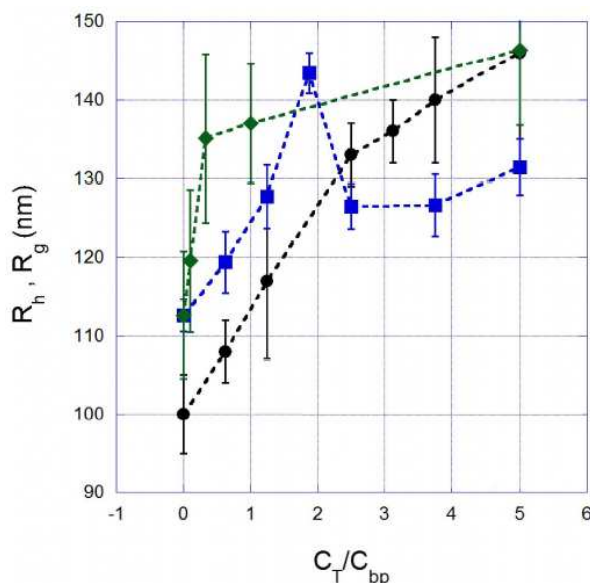


Figura 6.13: Comparação dos raios de giro e hidrodinâmico (R_g , R_h) em função da concentração total (C_T) de ligante na amostra. Note que o raio hidrodinâmico (R_h), obtido por DLS cresce monotonicamente (●), bem como o raio de giro (R_g) dado pelo AFM (◆). Contrariamente o raio de giro R_g dado pela pinça óptica (■), apresenta a queda abrupta.

Neste experimento teve-se como objetivo somente apurar a razoabilidade do argumento a respeito do surgimento das bolhas de desnaturação ao longo do complexo doxo-DNA. Como elas são fruto da ação conjunta da intercalação e da aplicação de força externa para alongar o complexo, num experimento relacionado ao tamanho médio das moléculas em solução, no qual não há aplicação de forças externas, é de se esperar que não haja modificações estruturais suficientes para interferir nos tamanhos médios das moléculas.

Para propósito de comparação, são também apresentados os comportamentos dos raios de giro (R_g) dos complexos doxo-DNA obtidos via pinça óptica (quadrados azuis) e microscopia de força atômica (losangos verdes). Os raios de giro são determinados através do emprego dos dados de comprimentos de contorno e persistência, pela relação 6.3;

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{3}AL \left(1 - 3\frac{A}{L} + \dots \right)}, \quad (6.3)$$

onde A é o comprimento de persistência e L é o comprimento de contorno do complexo. Esta equação diz que o raio de giro (R_g) aumenta em função de ambos os comprimentos de contorno e persistência, como intuitivamente era de se esperar. As reticências na expressão indicam a

existência de termos quadráticos e superiores, que em função dos de A e L tornam-se extremamente pequenos, podendo ser desprezados. Para obtenção dos dados do raio de giro para o experimento de pinça óptica, o qual utiliza o λ -DNA (48.500 pares de base), o comprimento de contorno foi multiplicado pelo fator de $3/48.5$ para ser mais justa a comparação com o DNA de 3.000 pares de base utilizados nos experimentos de AFM e DLS.

Os raios de giro e hidrodinâmico não representam as mesmas grandezas. Enquanto o raio hidrodinâmico é o raio de uma esfera de mesmo coeficiente de difusão que determinada molécula em solução, o raio de giro é obtido diretamente pelos parâmetros mecânicos e portanto é aproximadamente o raio de uma esfera na qual determinada molécula está contida. Devido a estas diferenças eles não podem ser quantitativamente comparados, mas por representarem as ordens dos tamanhos efetivos das moléculas no interior de suas soluções e exibirem o mesmo comportamento qualitativo em função da concentração total, eles podem ser comparados qualitativamente. Assim, retornando à análise da figura 6.13, concluímos que somente o raio de giro obtido pelo AFM concorda qualitativamente com o comportamento do raio hidrodinâmico, crescendo de forma monotônica com a concentração de doxorubicina. Já os dados do raio de giro fornecidos por pinça óptica, contrariamente, crescem até determinada concentração e então decrescem repentinamente, como resultado da queda abrupta sofrida pelo comprimento de persistência nos experimentos de pinça óptica. Como discutido, este comportamento resulta da desnaturação parcial sofrida pelo DNA, devido ao estiramento da molécula pela ação da força externa. Esta força não está presente nem nos experimentos de AFM nem nos de DLS, explicando a melhor concordância nestas duas técnicas. Em outras palavras, o resultado por DLS apresentado na figura 6.13 concorda com a suposição de desnaturação parcial do complexo doxo-DNA.

Por todas as informações prestadas nesta análise, percebemos que é sempre necessária muita cautela ao se comparar os resultados para o comprimento de persistência provenientes de técnicas que estiram e daquelas que não estiram o DNA, pelo menos quando o DNA estiver interagindo com intercalantes. Tais diferentes técnicas somente concordariam bem para valores de concentração do valor crítico, no qual ocorreria a queda abrupta nos experimentos em que existem os estiramentos. Esta condição procede desde que o regime de forças empregado seja o regime entrópico, com valores de 5 pN, pois nestas condições não haveria indução de desnaturação parcial dos complexos DNA-intercalantes. Sendo assim, os dados do comprimento de contorno são mais confiáveis para a elucidação físico-química do fenômeno de interação, exatamente como fizemos neste trabalho.

6.2.3 Conclusões sobre o estudo da interação DNA-doxo

A investigação da formação de um complexo tendo como molécula a ser modificada o DNA e por outro lado uma substância ligante modificadora o fármaco antitumoral doxorubicina, teve grande atenção neste trabalho. Contamos com três diferentes, adequadas e bem conceituadas técnicas, sendo duas delas técnicas de moléculas únicas (pinça óptica e microscopia de força atômica) e a terceira uma técnica de média sobre várias moléculas (espalhamento dinâmico de luz). Além disso, submetemos nossa investigação a duas condições extremas de força iônica, que foi de relevante importância para desvelar pormenores da interação, que permaneciam obscuros ainda que outros pesquisadores já tivessem rondado suas possibilidades de existência mas não deixaram claro sua essência.

Através de estiramentos de moléculas únicas, por meio da pinça óptica, nós determinamos as propriedades mecânicas básicas (comprimentos de contorno e persistência) em função da concentração total de doxorubicina em solução. Deste conjunto de medidas, utilizamos o comprimento de contorno para obter as propriedades físico-químicas da interação e para mostrar o papel da força iônica na ligação DNA-doxo. Encontramos que, sob baixa força iônica, a interação ocorre entre monômeros da doxo, ou no máximo dímeros, se ligando ao DNA por simples intercalação. Em compensação, sob alta força iônica, a autoagregação das moléculas de doxorubicina é preponderante em solução e proporciona a interação através da formação de agregados compostos por três a quatro moléculas de doxorubicina espalhados randomicamente ao longo da dupla hélice.

Os dados de comprimento de persistência, obtidos pelo estiramento na pinça óptica, exibiram um comportamento não-montônico em função da concentração de doxo na amostra. Este resultado contrasta fortemente com os obtidos pelo imageamento fornecido pela microscopia de força atômica, o qual apresentou valores crescentes monotônicos para este parâmetro mecânico. Tal discrepância é muito bem compreendida ao considerar a atuação de uma força externa para estirar o complexo durante o pinçamento ótico, o qual pode desnaturar parcialmente a já distorcida dupla hélice por causa da intercalação, gerando um decréscimo nos valores do comprimento de persistência.

Por último, a realização dos experimentos de espalhamento dinâmico de luz analisou as mudanças no tamanho efetivo dos complexos doxo-DNA, por meio do raio hidrodinâmico, como uma função da concentração de doxorubicina. Este parâmetro foi qualitativamente comparado ao raio de giro dos complexos, calculado pela relação deste com os comprimentos de contorno e persistência, obtidos pela pinça óptica e pelo AFM. Este último passo conecta os resultados das três técnicas e corrobora a proposta de desnaturação parcial.

Resumidamente, nós realizamos uma robusta caracterização a partir dos pontos de vista mecânico e físico-químico dos complexos formados pelo fármaco antitumoral doxorubicina e DNA, comparando resultados fornecidos por três técnicas distintas. Esta caracterização propor-

ciona uma importante melhora na compreensão da presente interação, revelando novas peculiaridades, tais como a dependência do tamanho dos agregados de doxorubicina ditados pela força iônica do tampão, as quais permitem modular físico-quimicamente a interação.

6.3 Estudos da formação do complexo DNA-DTAB

6.3.1 O surfactante catiônico DTAB

Generalizadamente, surfactantes são moléculas que possuem em sua constituição duas porções distintas, uma parte apolar (ou hidrofóbica) e uma parte polar (ou hidrofílica) e são denominados moléculas anfipáticas. Devido a esta interessante estrutura, eles formam um grupo químico de grande importância com muitas aplicações em diferentes setores industriais. O maior interesse industrial reside nas propriedades de solubilização, capacidade molhante, emulsificação, lubrificação e muitas outras correlatas. Por isso, eles são amplamente empregados nas indústrias de limpeza e cosméticos [79].

Os surfactantes interagem igualmente bem com materiais biológicos, como proteínas, DNA, etc. Em contato com o DNA, muitos são os fatores determinantes da interação surfactante-DNA e dos efeitos causados sobre a cadeia de DNA pela ação dos surfactantes. Nestes fatores estão inclusas as distribuições eletrônicas, pelas quais os surfactantes podem ser aniônicos, catiônicos, não iônicos ou ainda anfóteros. O tamanho da parte hidrofílica também pode influenciar na interação bem como no número de moléculas ligadas ao DNA. O tamanho das cadeias alifáticas também atua como fator preponderante de causa e efeito da interação. Os surfactantes podem interagir com o DNA de modo a causar diferentes efeitos, como aumentar ou diminuir a flexibilidade, alterar o tamanho, condensar, desnaturar e alterar a conformação. [80–82]

Dentre os inúmeros surfactantes existentes escolhemos o surfactante catiônico DTAB para ser o alvo de nosso estudo da interação de um surfactante com o biopolímero DNA. Ele é conhecido como Brometo de dodeciltrimetilamônio devido a sua estrutura e composição química. Como pode ser visto na figura 6.14, ele possui uma estrutura formada pelo grupo hidrofílico $[N(CH_3)_3 Br]^+$, o qual é moncatiônico, e pelo grupo hidrofóbico $CH_3(CH_2)_{11}$.

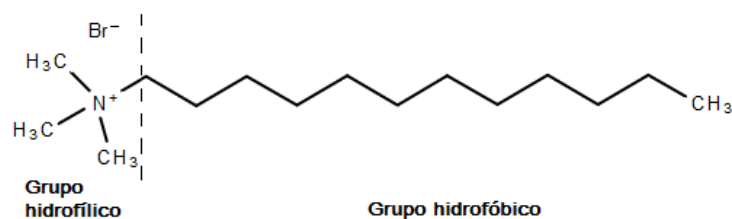


Figura 6.14: Composição e estrutura química do DTAB.

Nossa motivação para estudar o surfactante monocatiônico DTAB reside no fato de ele possuir a capacidade de condensar o DNA, sendo portanto de grande potencial nos usos de transportes de informação genética (*gene delivery*) e de carreamento de fármacos (*drug carrier*) [82–86]. Além disso, também temos o interesse de disponibilizar maior conhecimento sobre a interação de um biopolímero (DNA) com um surfactante, já que é apontado haver debates acerca do modo como os surfactantes interagem com o DNA. Por exemplo, há autores que sugerem ser necessário superar a concentração micelar crítica (CMC) para detectar a interação de um surfactante com o DNA e outros que afirmam a possibilidade da interação a partir de concentrações bem de tal valor [83, 84].

6.3.2 Propriedades mecânicas dos complexos DNA-DTAB

As propriedades mecânicas do DNA e dos complexos por ele formados com seus ligantes são de grande importância, como já visto nas análises anteriores. As mudanças nestas propriedades devido à complexação DNA-ligante são indicadoras do processo de formação do complexo. Desta forma, usou-se a pinça óptica para levantar dados do comportamento dos comprimentos de persistência e contorno dos complexos formados pela interação do DTAB com a molécula de DNA em função da concentração total do surfactante em solução. Este levantamento, junto com as perspicazes análises trazidas pelos textos referenciados, se mostrou capaz de ajudar a esclarecer alguns aspectos a mais na importante interação do surfactante monocatiônico DTAB com o DNA.

6.3.2.1 O comprimento de persistência

Como pode ser visto na figura 6.15, este importante parâmetro mecânico apresenta um comportamento não-monotônico, sendo que inicialmente o DTAB age sobre o DNA no sentido de torná-lo mais rígido e, após determinada concentração, em torno de 0.3 mM , ele atua flexibilizando o DNA até que a total compactação do complexo DNA-DTAB é atingida.

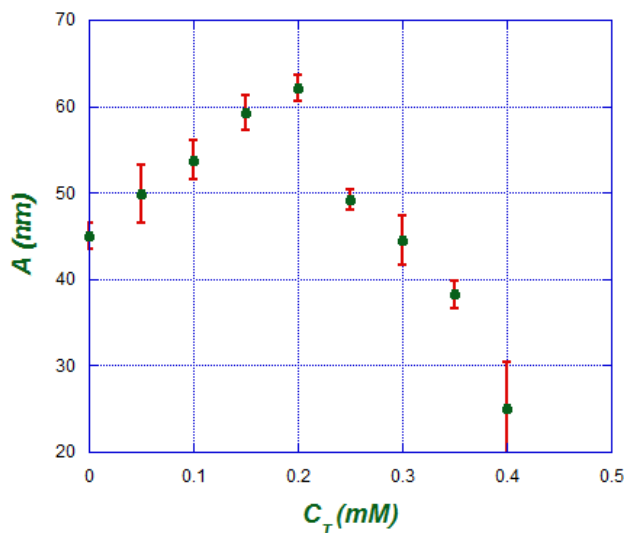


Figura 6.15: Comprimento de persistência dos complexos DNA-DTAB ($A(C_T)$) em função da concentração total C_T .

O pesquisador Sudhir Husale e sua equipe apontaram que surfactantes catiônicos que possuem longas cadeias alifáticas interagem com o DNA através de seus grupos hidrofílicos e têm suas caldas alifáticas apontando para fora da superfície do DNA [84, 87]. A compreensão desta característica interativa pode ser suficiente para que de início se explique o comportamento não monotônico do comprimento de persistência.

É sugestivo acreditar que o DTAB associa-se inicialmente ao DNA por interação eletrostática, sendo a atração dada entre cargas negativas presentes nos grupos fosfatos da dupla hélice e pelo cátion presente no grupo hidrofílico do DTAB. Evidências de que a interação de surfactantes moncatiônicos com o DNA são inicialmente dominadas pela interação eletrostática e depois por interação hidrofóbica foram apontadas pelos pesquisadores Katumitu e Bathaie e suas equipes [80, 88].

A princípio, a interação eletrostática deveria tornar o DNA mais flexível ao diminuir a repulsão dos grupos fosfatos, em função da anulação parcial de cargas ao longo da dupla hélice. Contudo, vemos na figura 6.15, que contrariamente o DNA de início se enrijece. Este fato pode

ser induzido pelo fato de o DNA em solução sofrer forças de compressão dadas pela entropia do sistema para que ele atinja sua conformação de equilíbrio, como ilustrado na figura 6.16 (a). Entretanto, com apenas algumas moléculas do surfactante ligadas ao DNA, suas caudas estando estiradas para fora da superfície do DNA tornam-se uma parte integrante do polímero e dificultam a ação das forças entrópicas e as dobraduras do DNA, aumentando portanto o comprimento de correlação da cadeia. Esta sugerida estruturação pode ser visualizada na figura 6.16 (b). Enquanto a concentração total de DTAB for suficientemente baixa em solução, para que apenas um número pequeno de suas moléculas sejam distribuídas aleatoriamente e também longínquas umas das outras ao longo da dupla hélice, o comprimento de persistência terá seu valor aumentado.

Contudo, disponibilizadas mais moléculas de surfactante em solução, através do aumento da concentração total de DTAB, as caudas hidrofóbicas se aproximam e o efeito hidrofóbico irá atuar com intensidade suficiente para induzir um maior número de dobras na cadeia. Esta nova estruturação diminui o comprimento de persistência, tal como simbolizado na figura 6.16 (c). Em qualquer solução, estando a concentração de surfactante suficientemente alta, haverá a tendência à formação de micelas na solução, como pode ser visto na figura 6.16 (d).

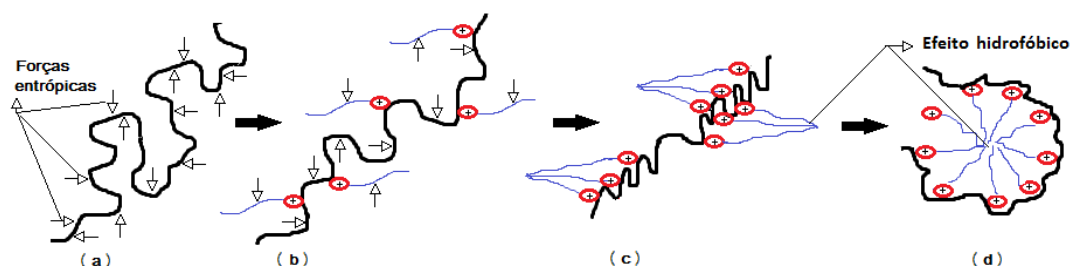


Figura 6.16: **Conformação do DNA e do complexo DNA-DTAB em solução.** (a) O DNA livre conformado pela entropia da solução. (b) Forças entrópicas atuando sobre o complexo DNA-DTAB com baixo número de moléculas ligadas ao DNA. (c) As caudas hidrofóbicas se aproximam com maior número de moléculas de DTAB ligadas ao DNA. O DNA é obrigado a se dobrar pela ação do efeito hidrofóbico. (d) O efeito hidrofóbico compacta o DNA devido à formação de micelas.

A formação de micelas com o surfactante conectado ao DNA irá induzir a compactação do complexo DNA-DTAB, alcançando valores muito baixos do comprimento de persistência. É importante notar que nessas condições não é necessário ter atingido a concentração micelar crítica (CMC) para que se formem as micelas, pois a proximidade das moléculas é causada pela interação com o DNA. Neste caso o DNA atua como um polietrólito negativo, que possui poder atrativo sobre as moléculas moncatiônicas do DTAB. Em solução aquosa com apenas surfactantes presentes, haverá formação de miscelas apenas quando a CMC for alcançada, entretanto na presença de um polímero polietrólito como o DNA, haverá uma concentração bem mais baixa que a CMC capaz de induzir a agregação do complexo formado pelo polietrólito-surfactante.

Esta concentração é chamada “Concentração de Agregação Crítica” (CAC) e é favorecida pela ligação entre o polímero e o surfactante. [89,90]

A sequência de ligação (primeiramente eletrostática e posteriormente hidrofóbica), já sugerida por outros autores, aliada à nossa sugestão da atuação das forças entrópicas sobre o biopolímero DNA puro e sobre um novo biopolímero complexado com moléculas do surfactante DTAB, parece esclarecer bem o enrijecimento inicial dos complexos e a flexibilização posterior que finalmente converge para a condensação dos complexos. Com certeza a interação hidrofóbica final diminui o comprimento de correlação da cadeia.

6.3.2.2 O comprimento de contorno

Nos estudos conduzidos por Mel’nikov e equipe, através de uma técnica de média sobre várias moléculas (microscopia de fluorescência), a condensação do DNA pela ação de um surfactante catiônico é concluída ser uma transição de primeira ordem. Os pesquisadores relataram observar em determinada concentração do surfactante apenas o formato de uma espiral alongada, mas após um valor maior de concentração apenas o estado globular compactado estava presente na solução. Porém, dentro de uma faixa intermediária muito estreita de concentrações do surfactante coexistiam as duas formas distintas, embora não houvesse uma passagem suave de uma forma à outra. [91]

Aparentemente, a figura 6.17, observada através dos nossos experimentos com a pinça óptica, indica concordância com aquela conclusão. Nela, ao se partir de uma concentração total tão baixa quanto 0.05 mM do surfactante DTAB, até atingirmos uma concentração ao redor de 0.35 mM , notamos que dentro das barras de erro o comprimento de contorno permanece praticamente inalterado, mesmo com um aumento tão expressivo da concentração do DTAB. Repentinamente na concentração de 0.4 mM de DTAB já é induzida a condensação do complexo DNA-DTAB, com uma diminuição brusca do comprimento de contorno. Entretanto, na análise do comprimento de persistência vimos que o DNA inicialmente enrijecido pela ação do DTAB, começa a se tornar mais flexível em torno da concentração de 0.25 mM e continua até atingir um valor muito baixo do comprimento de persistência. Este fato indica que nesta faixa de concentração ocorre uma passagem contínua, passo a passo, de um modo de conformação a outro.

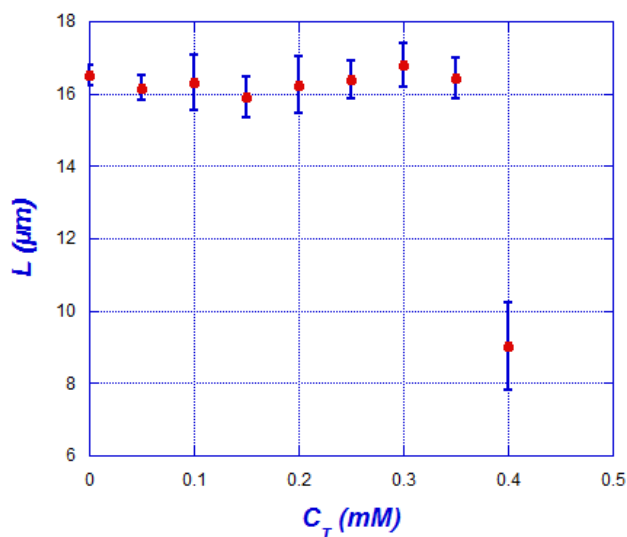


Figura 6.17: Comprimento de contorno dos complexos DNA-DTAB ($L(C_T)$) em função da concentração total C_T .

Assim sugerimos que neste pequeno intervalo de concentrações ($\sim 0.25 \text{ mM} \leq C_T \leq \sim 0.4 \text{ mM}$) pode estar ocorrendo uma transição suave entre as várias possíveis formas de uma compactação do DNA. O pesquisador Shi-Yong e sua equipe [82] também apontam um processo de condensação diferente do sugerido por Mel'nikov, apontando que o processo de condensação acontece a muitos pequenos saltos consecutivos e não de forma forte e instantânea. Diferentemente de Mel'nikov, Shi-yong e equipe estudaram a condensação do complexo DNA-DTAB por técnica de molécula única e usaram forças externas que distendiam o complexo, tal como ocorre em nossos experimentos de pinçamento ótico. Shi-Yong sugere que a força externa aplicada gera uma barreira de energia que impede a compactação tal como observada por Mel'nikov. Nossos experimentos pela pinça óptica corroboram a possibilidade de que a força externa pode ajudar para que a compactação ocorra de forma suave e em etapas.

Ainda observando a figura 6.17, o mesmo argumento que usamos para explicar o comportamento não-monotônico do comprimento de persistência pode assumir novamente um papel crucial para a compreensão do que ocorre ao comportamento do comprimento de contorno. Podemos supor que, enquanto a concentração do DTAB é baixa em solução, poucas de suas moléculas ligadas esparsadamente à molécula de DNA, por interação eletrostática, não são capazes de provocar mudanças no contorno. Entretanto, com um maior número de moléculas de DTAB ligadas, provoca-se a aproximação das caudas alifáticas, que, pelo efeito hidrofóbico são capazes de induzir dobraduras muito pequenas no DNA até que ele se condense. É importante ressaltar, porém, que essa afirmação só é possível do ponto de vista da molécula única, distendida na pinça. Não podemos indicar que deste modo acontece às outras moléculas de DNA que

estão na mesma solução e interagindo com o DTAB.

6.3.3 Resultados DNA-DTAB via Eletroforese

Estes experimentos tiveram como objetivo confirmar a compactação do complexo DNA-DTAB na interação de um grande número de moléculas de DNA. A eletroforese é uma técnica que enxerga uma média sobre um conjunto de moléculas. No capítulo 4 foi enfatizado que o material sobrenadante da interação DNA-DTAB foi tomado para análise via técnica de eletroforese. Sendo assim, é de se esperar que para baixas concentrações de DTAB tenham-se muitas moléculas de DNA na solução sobrenadante, pois o número pequeno de moléculas de DTAB são insuficientes para causar compactação de grande número de moléculas de DNA proporcional à concentração de DNA mantida fixa em $2,4 \mu M$. No entanto, com o aumento da concentração de DTAB, é esperado que proporcionalmente ocorra uma interação mais significativa. Como na etapa de centrifugação o complexo DNA-DTAB condensado permaneceu no fundo do microtubo, a solução sobrenadante ficou com um número pequeno de moléculas de DNA disponíveis para a interação com a molécula marcadora (fluorescente) do DNA, quando levada ao transiluminador. Por isso, espera-se a detecção menos brilhante em poços onde é alta a concentração de DTAB.

As figuras 6.18, 6.19 e 6.20 são algumas das imagens obtidas do experimento de interação DNA-DTAB e elas mostram boa concordância com a previsão. No entanto, além da dependência com a concentração, elas também revelam a dependência da interação DNA-DTAB com o tempo de incubação, conforme apontado por Shi-Yog Ran e equipe [82].

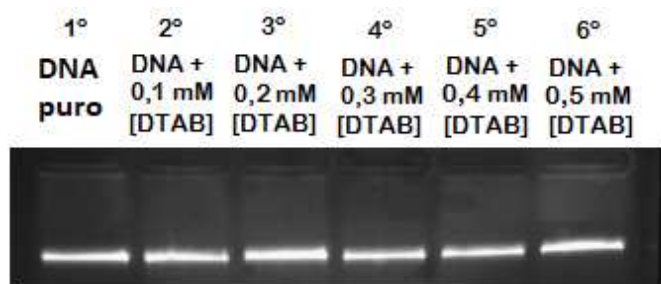


Figura 6.18: **Imagem eletroforética com baixo tempo de incubação e baixa concentração.** Observe que os poços apresentam sequência crescente de concentração de DTAB por concentração de DNA. Este é um resultado em que a incubação foi de 30 minutos antes da centrifugação.

A figura 6.18 mostra a imagem obtida por eletroforese em que a interação do DTAB com

o DNA seguiu exatamente a mesma ordem de concentração que a sequência analisada nos experimentos de pinça óptica. É importante que observemos também o tempo de incubação, que ocorre antes da centrifugação. Para as imagens da figura 6.18 este tempo foi também exatamente o mesmo de interação dos experimentos na pinça, ou seja, 30 minutos, que na pinça ocorrem após as trocas de alíquotas. Desta figura primeiramente concluímos que parece não haver interação em nenhuma faixa de concentração de DTAB. Deve-se então fazer a consideração que na pinça a molécula única de DNA, aprisionada no poço potencial, sofre estiramentos, o que a torna mais acessível às moléculas de DTAB. O comportamento é claramente diferente para o caso em que a mesma concentração de DTAB está em uma solução para interagir com as moléculas de DNA que permanecem na configuração de equilíbrio. Destas considerações conclui-se que em todos os poços haviam grandes quantidades de DNA disponíveis para, junto do agente marcador, fluorescerem no transiluminador. Portanto, com a faixa de concentração variando de $0,1 \text{ mM}$ até $0,5 \text{ mM}$ num tempo de incubação de 30 minutos não foi induzida condensação significativa do DNA.

Um outro experimento preservando a faixa de concentração idem à usada na pinça, mas prolongando-se o tempo de incubação, foi conduzido. O objetivo desta observação era constatar a ocorrência de condensação dos complexos DNA-DTAB mesmo para baixas concentrações de DTAB, desde que o intervalo de tempo fosse condizente com uma cinética mais lenta.

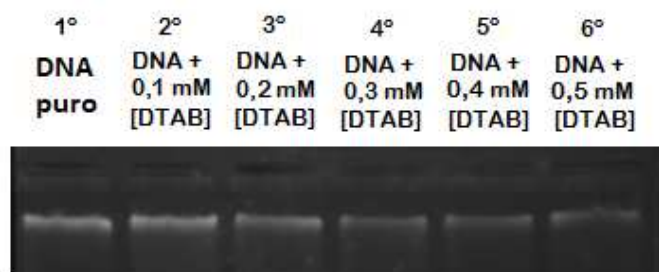


Figura 6.19: **Imagem eletroforética com alto tempo de incubação e baixa concentração.** Este é um resultado em que a incubação foi de 12 horas antes da centrifugação.

A figura 6.19 mostra a imagem de eletroforese em que o tempo de incubação foi bem superior, chegando a 12 horas. Neste caso, o tempo mais longo foi suficiente para que as primeiras ligações eletrostáticas ocorressem e que a partir delas pudesse haver o efeito hidrofóbico, que então condensou o complexo DNA-DTAB. Assim, durante a centrifugação os complexos condensados ficam fora do sobrenadante. Observa-se que o brilho diminui de poço a poço de acordo com o aumento da concentração de DTAB. O brilho menos intenso indica menor número de moléculas de DNA a serem marcadas, ou, mais interessantemente, maior número de moléculas de DNA condensadas ao interagir com o DTAB.

Para certificarmos a dependência com a concentração conduzimos um experimento em que aumentamos em muito o intervalo de concentração de DTAB e mantivemos o tempo de incubação idem ao da pinça (30 min). Como pode ser constatado na figura 6.20, há forte indicação de que a interação com grandes quantidades de DTAB em solução, mesmo em tempo curto, é capaz de causar a condensação do DNA.

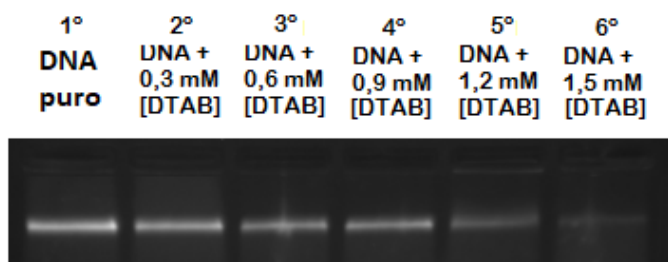


Figura 6.20: **Imagem eletroforética com baixo tempo de incubação e alta concentração.** Este é um resultado em que a incubação foi de 30 minutos antes da centrifugação.

6.3.4 Conclusões sobre o estudo da interação DNA-DTAB

Observamos a interação da molécula de DNA com o surfactante moncatiônico DTAB pelo foco de duas interessantes e bem conceituadas técnicas para a física biológica, sendo elas a pinça óptica e a eletroforese. É importante dizermos que observamos a interação sob condições de força iônica alta e para quantidades de DTAB em solução bem abaixo da concentração micelar crítica (CMC). Não fizemos nossas próprias medidas da CMC nessas condições iônicas, mas é conhecido que em solução aquosa sem sal a CMC ocorre em torno de $15,9 \text{ mM}$ e que este valor decresce com a força iônica [92], estando num valor aproximado de $13,5 \text{ mM}$ numa condição de $0,011 \text{ M}$. [93]

A pinça óptica proporcionou experimentos de estiramentos da molécula de DNA complexada com moléculas de DTAB e nos permitiu estudar as mudanças nos parâmetros mecânicos dos complexos. Esperamos que, do alinhamento das indicações preexistentes na literatura com nossas observações e análises das mudanças dos dados mecânicos, possamos auxiliar a comunidade científica a compreender um pouco mais desta importante interação. Além disso, sugerimos um modelo para o que ocorre com a molécula única durante a interação. Este modelo mostra-se razoável tanto ao comprimento de persistência quanto ao do contorno.

Através da técnica de eletroforese fomos capazes de observar o comportamento de muitas moléculas de DNA dispersas em solução e interagindo com as várias moléculas de DTAB também dispersas na solução. A partir destas observações, concluímos que a interação é fortemente dependente da concentração quanto o é também do tempo de incubação.

Capítulo 7

Conclusões finais e perspectivas

O plano de trabalho para a composição desta tese foi pensado com o intuito de ser o mais atual possível dentro da área de pesquisas em física biológica e que, ao mesmo tempo, tivesse uma motivação nobre. Assim escolhemos trabalhar em uma frente de pesquisa voltada para a formação de carreadores de fármacos. Os carreadores de fármacos tem notável destaque e interesse nas comunidades científicas. Suas formulações passam pelo casamento de muitas áreas da ciência, exigindo exploração da nanociência e são reforçados por grandes necessidades de avanços na área médica e de novos produtos farmacêuticos. Eles são capazes de proporcionar a inovadora terapia de genes, bem como levar os tratamentos de doenças a níveis mais satisfatórios devido a uma entrega local de medicamentos, especialmente os quimioterápicos.

Para cumprir nossa ambiciosa missão, trabalhamos com três distintas substâncias interagentes do DNA. Os agentes condensantes do DNA, proteína $C_4S_{10}K_{12}$ e surfactante DTAB, e o fármaco antitumoral doxorubicina. Pesquisamos os complexos formados entre o DNA e estes três ligantes através de diferentes técnicas. Do enfoque sobre moléculas únicas, com a técnica de pinça óptica, realizamos a grande parte das pesquisas e delas acompanhamos as mudanças nos parâmetros mecânicos dos complexos. Para ajuste e tratamento dos dados observáveis, usamos a equação de Marko e Siggia dentro da mecânica de polímeros. Foram também usadas as conceituadas técnicas de Eletroforese e Espalhamento de Luz para completar as informações do processo interativo e para estabelecer um paralelo entre o comportamento da molécula única e da média sobre conjuntos, já que estas últimas são técnicas que observam múltiplas moléculas.

Na análise da interação $DNA - C_4S_{10}K_{12}$, dentro do regime de baixas forças, foi detectada de imediato uma alteração na elasticidade entrópica do DNA a partir das primeiras e muito baixas concentrações da proteína viral. Quanto ao comprimento de contorno observou-se que dentro de uma pequena faixa não há alteração significativa, mas em certo ponto a tendência à compactação é basicamente instantânea. Do regime de altas forças conseguimos extrair impor-

tantes observações do modo como se organiza a condensação. Observamos também que uma vez que o DNA tenha sido compactado pela $C_4S_{10}K_{12}$ não sofre descompactação ao expor o complexo a concentrações altas do intercalante doxorrubicina. Juntas estas observações nos levam a concluir que a compactação do DNA por esta proteína é de alta eficiência e atinge uma conformação final tendo passado por processo organizado de estruturação, indicando ser de fato recomendado o uso destes complexos para a formação de um carreador. Em diferentes universidades e grupos no Brasil e na Holanda, ainda estão em desenvolvimento experimentos importantes sobre o complexo $DNA - C_4S_{10}K_{12}$, de modo a se alcançar constatações mais abrangentes e conclusivas. A proteína viral é um produto inovador, ainda não tem emprego no mercado e por esta razão toda pesquisa com ela possui grandes restrições. Entretanto, ela está atendendo a grandes expectativas por parte de seus idealizadores e acreditamos estar contribuindo muito a partir de nossos estudos. Futuras publicações prometem causar grande impacto no setor de produção de carreadores.

Da interação do DNA com o fármaco antitumoral doxorrubicina fizemos uma caracterização muito robusta e de relevante valor no descortinamento de peculiaridades desta interação. Este é um fármaco importantíssimo em tratamentos quimioterápicos e por isso uma das drogas mais usadas no combate ao câncer, sendo empregado no tratamento de vários tipos. Também por isto a interação já foi amplamente estudada por muitos e grandes grupos de pesquisa, mas, para nossa sorte, detalhes valiosos permaneciam obscuros e acreditamos ter contribuído muito com nossas análises. Ao detectarmos que pesquisas anteriores indicavam diferentes conclusões sobre modos da interação, procuramos pelas diferenças na condução dos estudos e percebemos diferenças de força iônica. Assim, trabalhamos com experimentos sob diferentes condições iônicas, e exatamente deste ponto descobrimos a conexão que faltava. Testamos esta interação pelo ponto de vista de moléculas únicas e por média sobre várias moléculas, tendo dados das técnicas de pinça óptica, microscopia de força atômica e espalhamento de luz. A partir das alterações no parâmetro mecânico “comprimento de contorno”, usamos um modelo previamente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, ajustando dados a partir do aumento relativo do comprimento de contorno. Deste ajuste conseguimos extrair importantes dados físico-químicos que governam a interação, a partir de medidas puramente mecânicas. Os resultados que obtivemos desta interação foram bem recebidos na comunidade científica através da publicação num importante periódico da área. [77]

Do complexo formado entre o surfactante monocatiônico DTAB e o DNA, fizemos avanços significativos nas nossas observações. Estudamos esta interação pelas técnicas de pinça óptica e eletroforese em gel de agarose. Particularmente o DTAB indica ter um mecanismo de grande organização na compactação da molécula de DNA. Verificamos que inicialmente o complexo DNA-DTAB se enrijece, e a partir de determinada concentração é que o complexo inicia grande flexibilização e se desenvolve a compactação. Em grande faixa de concentração

o comportamento do comprimento de contorno não é alterado, induzindo forte compactação numa concentração elevada do DTAB. Isto sugere a interação por dois modos distintos, que, como apontado por pesquisas anteriores, são a interação eletrostática em primeira instância e uma forte interação cooperativa hidrofóbica final. Concluímos que a interação é significativamente dependente da concentração e do tempo de incubação, com diferenças bem expressivas no comportamento de molécula única sob ação de uma força externa e entre o comportamento médio de múltiplas moléculas.

Esta tese, com todas as observações coletadas, desde sua elaboração, passando pelo processo de execução dos trabalhos e dos resultados alcançados, abre um caminho muito promissor de trabalho para o nosso grupo de pesquisa. O tópico de estudo é extremamente importante e possui muitas possibilidades para execução, desde um leque enorme de substâncias a serem testadas até a conversação de diferentes grupos de pesquisa e técnicas de análise. A formação de carreadores é uma preocupação muito atual e desbravadora, conectando a nanociência através de diferentes ramos científicos. Nosso trabalho não foi totalmente fechado nos processos que predisparamos a fazer com respeito à formação de carreadores, apesar de ter feito avanços de muita relevância. Assim, deixamos grandes perspectivas para trabalhos futuros. Dos ligantes condensadores do DNA que estudamos há uma lacuna a ser preenchida quanto a observações de complexos triplos, ou seja, agente condensante-DNA-fármaco. Especificamente no nosso caso, *DNA – C₄S₁₀K₁₂ – doxorubicina* e *DNA – DTAB – doxorubicina*, tendo estes que ser observados com ordem trocada entre agente condensante e fármaco no processo triplo de complexação do DNA. Particularmente no caso do condensante DTAB muito ainda deve ser feito, como as observações já citadas e também o levantamento da concentração micelar crítica (CMC) dentro da condição iônica trabalhada, um fator importante, pois, pode mostrar o quão expressivo é o papel do DNA, como eletrólito, para facilitar a formação de micelas mesmo abaixo da CMC. Um levantamento desta interação pelo olhar das técnicas de espalhamento de luz e/ou medidas do potencial Zeta podem contribuir enormemente para conclusões desta interação. Além disso, pela grande variedade de agentes condensantes existentes o trabalho mostra que existe grande continuidade nesta linha de pesquisa.

Apêndice A

Cálculo da média quadrática da distância entre as extremidades $\langle r_{ee}^2 \rangle$

Neste apêndice está descrita uma formulação matemática da média quadrática da distância ponta a ponta do polímero em solução. Ele se destina a ajudar a compreender a descrição do modelo matemático da mecânica de polímeros que estudamos no capítulo 2.

Para melhor compreensão, recorramos à construção gráfica de uma curva que represente generalizadamente certo polímero. Pela figura A.1 pode-se notar os vetores \vec{r}_0 e \vec{r}_L que indicam as extremidades inicial e final do polímero, respectivamente. Desta forma, define-se a extremidade inicial do polímero em $s = 0$ e a final em $s = L$, que ao longo da curva se estabelece a distância determinada como o comprimento de contorno L_c do polímero.

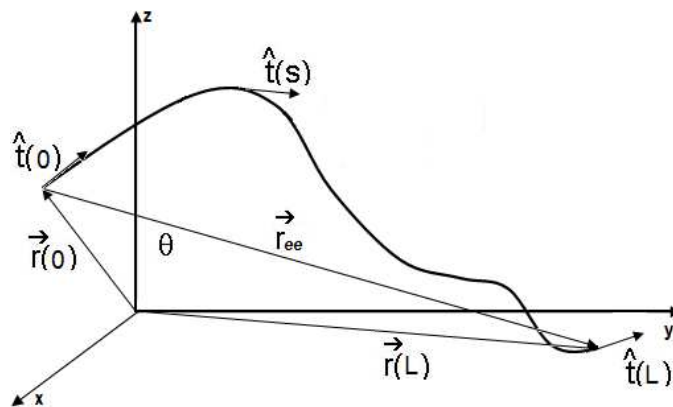


Figura A.1: Curva arbitrária de um polímero e seus vetores posição. Figura extraída da referência [77].

É evidenciado na figura um vetor nomeado como \vec{r}_{ee} , que une as extremidades do polímero.

O módulo deste vetor fornece a distância entre as extremidades do polímero e pode ser escrito como a diferença entre os vetores $\vec{r}_{s=L}$ e $\vec{r}_{s=0}$:

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}_L - \vec{r}_0 \quad (\text{A.1})$$

Por razões que se evidenciarão mais à frente, necessita-se do cálculo da média quadrática deste vetor ponta-a-ponta do polímero (\vec{r}_{ee}). Esta média é então:

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \langle [\vec{r}_L - \vec{r}_0]^2 \rangle. \quad (\text{A.2})$$

Do cálculo vetorial e também pelo que foi exibido no capítulo 2.4.1, sabemos que:

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \implies \int_0^s d\vec{r} = \int_0^s \hat{t}(s') ds' \quad (\text{A.3})$$

A solução da integral definida no primeiro membro fornece como resultado,

$$\vec{r}_s = \vec{r}_0 + \int_0^s \hat{t}(s') ds'. \quad (\text{A.4})$$

Trocando o “L” por “s” na equação A.2 e substituindo nela o resultado acima, teremos a eliminação de \vec{r}_0 e com \vec{r}_s elevado ao quadrado obteremos;

$$\begin{aligned} \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= \left\langle \left[\int_0^s \hat{t}(s') ds' \right] \cdot \left[\int_0^s \hat{t}(s'') ds'' \right] \right\rangle = \\ &= \int_0^L ds'' \int_0^L ds' \langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle. \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

Obtivemos então um produto escalar entre vetores unitários e teremos que calcular a média entre eles para prosseguirmos. Entre os dois vetores unitários há um ângulo, que denotar-se-á por θ . Com um dos vetores localizado na origem do polímero e o outro numa posição s qualquer, tem-se:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos \theta \rangle. \quad (\text{A.6})$$

Fazendo uma consideração em que ocorre apenas pequenas flutuações, o ângulo θ será limitado a pequenos valores, o que permite uma aproximação pela fórmula de meio ângulo na qual:

$$\cos \theta \sim 1 - \theta^2/2 \quad (\text{A.7})$$

e que, pelo valor obtido na equação 2.14, no capítulo 2, para a média de θ^2 , conduz a média do

produto escalar entre os vetores unitários ao seguinte valor:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A}, \quad (\text{A.8})$$

onde foi tomada apenas a aproximação em primeira ordem.

As últimas etapas levaram à obtenção de um resultado relevante e útil, pois o termo final do lado direito da equação A.8 corresponde à expansão em primeira ordem da função exponencial. Entretanto, se considerarmos todos os termos da expansão para a função exponencial, podemos então escrever a seguinte expressão:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong \exp\left(-\frac{s}{A}\right). \quad (\text{A.9})$$

Neste ponto, observamos que o resultado obtido é tomado como a interpretação geométrica do comprimento de persistência, em que é afirmado que o comprimento de persistência é um comprimento que mede a correlação da cadeia polimérica. Desta forma, entende-se o comprimento de persistência como a medida da distância, ao longo do polímero, na qual a cadeia passa a ter orientação descorrelacionada.

A partir deste resultado, podemos obter uma expressão geral fazendo uma mudança de origem do sistema, com $s = s'$ ao invés de $s = 0$. Desta forma obtém-se;

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle \cong \exp\left(-\frac{|s' - s''|}{A}\right). \quad (\text{A.10})$$

Substituindo a equação A.10 na equação A.5 a integral pode ser dividida em duas partes iguais como se segue;

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong 2 \int_0^{L_c} \exp\left(-\frac{s''}{A}\right) ds'' \int_0^{s''} \exp\left(-\frac{s'}{A}\right) ds' \quad (\text{A.11})$$

e a solução das integrais fornece;

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong 2AL_c - 2A^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{L_c}{A}\right)\right]. \quad (\text{A.12})$$

Analisando limites extremos entre os comprimentos de contorno e de persistência, que equivale a tomar limites extremos para a exponencial através de sua expansão, com $L_c \gg A$ e $L_c \ll A$, podemos chegar a uma interpretação para limites nos quais o polímero é de um lado flexível e por outro rígido, respectivamente. Uma interpretação que é escrita como:

i- Para $L_c \gg A$ (limite flexível):

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \cong 2AL_c, \quad (\text{A.13})$$

ii- Para $L_c \ll A$ (limite rígido):

$$\langle \overline{r_{ee}^2} \rangle \cong L_c^2, \tag{A.14}$$

que são os resultados usados na seção 2.4.3.1.

Apêndice B

Artigos publicados

Neste apêndice é apresentado o artigo publicado no decorrer do doutoramento. Além disso, também são citados os artigos publicados durante a formação acadêmica, dos quais um durante o período de mestrado e dois durante o doutorado em trabalhos de parceria com outros estudantes.

“DNA interaction with Hoechst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes”

Este artigo foi fruto do trabalho de mestrado e foi publicado na revista *The Journal of Physical Chemistry B* em 2013.

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

Este artigo faz parte da colaboração de trabalho com outros estudantes do laboratório de física biológica. Neste caso a parceria foi feita com o estudante de mestrado Wilson Bernal. O artigo foi publicado na revista *RSC Advances* em 2016.

“ β -Cyclodextrin polymer binding to DNA: modulating the physicochemical parameters”

Este artigo também faz parte da colaboração com outros estudantes. Neste caso, à época era o estudante Júlio César Barbosa Rocha que era pesquisador do laboratório de microfluídica do departamento de física da UFV. O artigo foi publicado na revista *Physical Review E* em 2017.

“DNA-doxorubicin interaction: new insights and peculiarities”

Este artigo é parte do trabalho de doutorado e foi publicado na revista *Biopolymers* em janeiro de 2017. Que é o artigo que está na tese.

Received: 15 June 2016 | Revised: 25 September 2016 | Accepted: 5 October 2016
DOI 10.1002/bip.22998

ORIGINAL ARTICLE

WILEY **Bio**polymers

DNA-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities

E. F. Silva | R. F. Bazoni | E. B. Ramos | M. S. Rocha

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

Correspondence

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

Funding Information

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

Abstract

We have investigated the interaction of the DNA molecule with the anticancer drug doxorubicin (doxo) by using three different experimental techniques: single molecule stretching, single molecule imaging, and dynamic light scattering. Such techniques allowed us to get new insights on the mechanical behavior of the DNA-doxo complexes as well as on the physical chemistry of the interaction. First, the contour length data obtained from single molecule stretching were used to extract the physicochemical parameters of the DNA-doxo interaction under different buffer conditions. This analysis has proven that the physical chemistry of such interaction can be modulated by changing the ionic strength of the surrounding buffer. In particular we have found that at low ionic strengths doxo interacts with DNA by simple intercalation (no aggregation) and/or by forming bound dimers. For high ionic strengths, otherwise, doxo-doxo self-association is enhanced, giving rise to the formation of bound doxo aggregates composed by 3 to 4 molecules along the double-helix. On the other hand, the results obtained for the persistence length of the DNA-doxo complexes is strongly force-dependent, presenting different behaviors when measured with stretching or non-stretching techniques.

KEYWORDS

doxorubicin, single molecule, physical chemistry, mechanical properties

1 | INTRODUCTION

Doxorubicin (doxo) is a well-known chemotherapeutic compound used to treat various cancers such as some types of leukemias, sarcomas, lymphomas, myelomas, neuroblastomas, as well as cancers in the breast, head, ovary, pancreas, prostate, stomach, liver, lung, and others. Along with the related compounds daunomycin, mitoxantrone and idarubicin, they constitute the class of the anthracycline antibiotics, a group of intercalators largely employed in chemotherapies.^[1]

In this work we have performed a robust characterization of the DNA-doxo interaction at single molecule level. We have used optical tweezers (OT) in the low-force entropic regime to stretch the DNA-doxo complexes in order to measure the changes on the basic mechanical properties (persistence and contour lengths) of such complexes as a function of the drug concentration in the sample. In addition, we have also performed single molecule imaging of the DNA-doxo

complexes by using atomic force microscopy (AFM). In these experiments, the DNA-doxo complexes deposited in a mica substrate were imaged and the same mechanical properties were obtained directly from the statistical analysis of the conformation of the complexes. Thus, the results obtained from single molecule stretching and imaging could be directly compared, bringing new insights on the mechanics of the DNA complexes formed with intercalators. In particular, we have found that the behavior of the persistence length of the DNA-doxo complexes obtained from these two techniques is very different, being strongly force-dependent.

On the other hand, an important aspect concerning the molecular basis of the chemotherapies is the physical chemistry of the DNA-drugs interactions, especially the information about the possible types of binding modes, drug affinity, selectivity, cooperativity, etc. Some of such information is currently known for the DNA-doxo interaction, albeit some aspects remain unclear. In particular, it is well established that intercalation is the main mode of interaction,^[2–5]

although some authors report the possibility of groove binding at AT-rich regions.^[3] Most of the available information was determined from ensemble-averaging techniques such as circular dichroism, fluorescence and infrared spectroscopy, microcalorimetry, etc.,^[3–5] and very few authors have used single molecule approaches to investigate the DNA-doxo interaction.^[2,6] Single molecule techniques such as optical and magnetic tweezers, AFM and fluorescence-based techniques usually allow one to obtain high-resolution information about DNA-ligand binding, revealing intrinsic details of the interaction that are otherwise inaccessible.^[7–20]

In the present work, besides the new mechanical insights on the DNA-doxo interaction, our single molecule measurements have allowed us to: (a) infer that different binding mechanisms can occur depending on the ionic strength of the buffer solution; and (b) determine the physicochemical parameters of the DNA-doxo interaction under different buffer conditions. In particular, we have found that in general doxo binds to the DNA molecule forming aggregates of a few molecules, which remain partially intercalated. The size of these aggregates, as well as the other binding parameters, can be controlled by changing the ionic strength of the buffer solution. In other words, the physical chemistry of the DNA-doxo interaction can be modulated by changing the surrounding buffer.

Finally, the data obtained from the single molecule techniques were compared to results obtained by an ensemble-averaging technique: dynamic light scattering (DLS). We have used DLS in order to evaluate the behavior of the hydrodynamic radius of DNA-doxo complexes as a function of drug concentration. This quantity can be qualitatively compared to the radius of gyration calculated from the persistence and contour lengths obtained from OT and AFM,^[21,22] thus connecting the results of all experiments performed here. All measurements and analysis performed here can be extended for other types of intercalators, thus providing new insights on the DNA interactions with this class of drugs.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Optical tweezers (OT)

In OT experiments the samples consist of λ -DNA molecules (New England Biolabs) end-labeled with biotin attached by one end to a streptavidin-coated bead of 3 μm diameter (Bangs Labs) and by the other end to a streptavidin-coated coverslip (Xenopore Corp.). The sample chamber consists of an o-ring glued in the coverslip surface. In order to evaluate the effects of the ionic strength in the DNA-doxo interaction, we have performed the measurements in two different buf-

fers, using a 10 mM Tris-HCl buffer with pH = 7.4 without NaCl and also a Phosphate Buffered Saline (PBS) buffer with pH = 7.4 and $[\text{NaCl}] = 140$ mM. Although the composition of the buffers is not exactly the same, the relevant parameter here is the difference between the ionic strengths ($>$ one order of magnitude), because the self-association of the anthracyclinic compounds strongly depends on this parameter^[23,24]. The doxo concentration in the sample was changed during the experiments by using micropipettes to exchange the buffer solution. The typical DNA concentration used in all OT experiments was 2.4 μM in base-pairs.

The optical tweezers consist of a 1064 nm ytterbium-doped fiber laser with a maximum output power of 5.8 W (IPG Photonics) mounted on a Nikon Ti-S inverted microscope with a 100 \times N.A. 1.4 objective. The DNA molecules are stretched by moving the microscope stage and consequently the coverslip with controlled velocity by using a piezoelectric device (PINano P-545, Physik Instrumente).

We start the experiment with only bare DNA molecules in the sample. We choose and test one of them by measuring 5 to 7 stretching curves, obtaining the mean values of the persistence and contour lengths for the bare DNA. These parameters were obtained by fitting the experimental force \times extension curves measured in the low-force entropic regime ($F < 5$ pN) to the Marko-Siggia WormLike Chain (WLC) expression.^[25] The average results obtained for the bare DNA in both buffers are $A_0 = (45 \pm 3)$ nm and $L_0 = (16.5 \pm 1)$ μm , which are within the expected values for the bare λ -DNA. Next we change the surrounding buffer solution, introducing the drug at a certain chosen concentration. We wait about ~ 20 minutes for drug equilibration, and then repeat the stretching experiments, performing 5 to 7 measurements and thus obtaining the average values and the error bars of the mechanical properties for each drug concentration. Finally, the entire experiments is repeated with other DNA molecules, in order to evaluate the variability of the mechanical parameters over different DNAs. The results reported here for the persistence and contour lengths correspond to an average over 4 to 6 different DNA-doxo complexes. All the error bars reported are the standard error of the mean (sem) calculated from the set of stretching experiments for each drug concentration.

All the details about the WLC fittings and some exemplifying figures can be found in the Supporting Information. The details about the OT sample preparation procedure and about the optical tweezers setup were previously described.^[26,27]

2.2 | Atomic force microscopy (AFM)

The samples here consist of 3 kbp DNA molecules (Thermo Scientific) in the same Tris-HCl buffer used in OT

experiments, except by the addition of 10 mM of MgCl_2 , which is needed in order to deposit the DNA molecules in mica substrates. The mixture was allowed to equilibrate for ~ 20 min. An aliquot of 20 μl was deposited on the substrate and completely dried out with nitrogen at ambient temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$). To compare the morphologies observed with the results obtained in the OT experiments, we have used similar ratios of drug concentration by DNA base-pair concentration. The 3 kbp DNA was used to allow the visualization of various different molecules in the scanned images and to avoid relevant volume-exclusion effects present for the λ -DNA, due to its long contour length (48.5 kbp).^[28] The PBS buffer could not be used here because the high NaCl concentration disturbs the DNA adsorption on the substrates.

The mica substrates were scanned with the AFM (model NTEGRA, NT-MDT-Russia) operating in the conventional semicontact mode at a scan rate in the range of 1.5–3.0 Hz. We have used NanoWorld tips with radius equal to 8 nm and a force constant on the order of a few N/m. The experiments were performed in air, at ambient temperature and with humidity $\sim 20\%$ – 30% . This experimental procedure has been shown suitable to visualize the deposited DNA and DNA-drug complexes in a reproducible and reliable way.^[27] In the Supporting Information we show some representative AFM images of the DNA-doxo complexes deposited in mica substrates.

To analyze the images of the deposited DNA-doxo complexes, we have determined the mean contour and persistence lengths and the error bars (sem) for each drug concentration (~ 70 different molecules for each concentration). The analysis was performed following the procedure of Rivetti et al.^[28] Basically, we measure the contour length L and the mean-squared end-to-end distance $\langle R^2 \rangle$ of the polymer chain directly from the images. The persistence length A can then be determined with the equation

$$\langle R^2 \rangle = 4AL \left[1 - \frac{2A}{L} \left(1 - e^{-\frac{L}{2A}} \right) \right], \quad (1)$$

which is valid for 2D worm-like chains.^[28]

2.3 | Dynamic light scattering (DLS)

All DLS measurements were performed in the apparatus ZetaSizer Nano-S (Malvern Instruments Ltd.) with a low volume quartz cuvette (ZEN2112, Hellma Analytics). The samples here consist of 3 kbp DNA molecules (Thermo Scientific) in the same PBS buffer used in the OT experiments (λ -DNA is difficult to be used in DLS due to the long contour length). The DNA molecules are equilibrated with a certain doxo concentration directly in the cuvette used. The DNA concentration used in all DLS experiments was 4.8 μM of base-pairs. This concentration is sufficiently low to

avoid entanglements and relevant interactions between different DNA molecules^[29]. We show the results of the experiments here only in PBS because the results obtained by this technique using our two different buffers are indistinguishable within the experimental error bars.

We have measured seven different samples with increasing concentrations of doxo, in order to investigate the effect of the ligand on the effective size of the DNA molecule, measured here by the hydrodynamics radius R_H , which is obtained directly from the intensity autocorrelation functions of the scattered light (representative raw data can be found in the Supporting Information). For each doxo concentration, we have performed ~ 70 measurements of 15 seconds each, in order to obtain the mean results and the error bars (sem). More experimental details can be found in Refs. 21 and 22.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | The contour length can be used to deduce the physical chemistry of the interaction

Optical tweezers experiments with DNA-doxo complexes were performed in order to determine the changes on the basic mechanical properties (persistence and contour lengths) as a function of the drug concentration in the sample. Recently, we have developed a methodology to extract the physical chemistry of the interaction from these mechanical parameters, such that a robust and nearly complete characterization can be performed with a very reduced number of experimental techniques.^[18,22,26,27,30–32]

In Figure 1 we show the relative increase of the contour length $\Theta = (L - L_0)/L_0$ of the DNA-doxo complexes as a function of doxo total concentration in the sample normalized by the DNA base-pair concentration (C_T/C_{bp}), obtained in Tris-HCl (blue squares) as well as in the PBS buffer (black circles). Observe that in both situations the contour length increases monotonically from the bare λ -DNA value ($\Theta = 0$) up to a saturation value ($\Theta \sim 0.28$ in Tris-HCl and $\Theta \sim 0.21$ in PBS). Since intercalative binding is directly related to the increase of the contour length,^[18] these data suggest that doxo intercalation into DNA is favored in the Tris-HCl buffer, which has lower ionic strength ($[\text{NaCl}] = 0$).

In addition, observe that the data obtained in the Tris-HCl buffer presents the typical shape observed for most intercalators.^[21,22,33–35] The data obtained in the PBS buffer, on the other hand, exhibits a slightly sigmoidal shape which indicates that another binding mode may exist besides intercalation or/and significant cooperativity can exist between the ligand molecules.^[18]

A recent work from Armaiz et al. demonstrated that the doxo molecules can also bind outside the DNA double-helix,

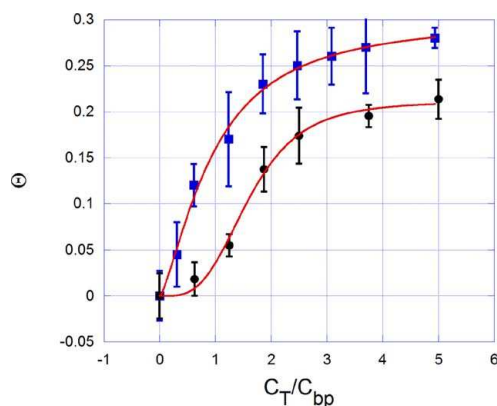


FIGURE 1 Relative increase of the contour length $\Theta = (L - L_0)/L_0$ as a function of doxo concentration in the sample normalized by the DNA base-pair concentration (C_T/C_{bp}), obtained with OT both in Tris-HCl (blue squares) as well as in the PBS buffer (black circles). The solid lines are fittings to the equation $\Theta = \gamma r$ expressing r as a Hill binding isotherm

interacting with a previously intercalated doxo molecule.^[3] Such result is related to the fact that many anthracycline antibiotics have a tendency to self-associate in solution,^[23,24] and such association is strengthened in high salt concentrations,^[23] probably due to the screening of the doxo-doxo electrostatic repulsion. A similar sigmoidal behavior of the contour length as a function of drug concentration was previously obtained by us for the closely related drug daunomycin under the same experimental conditions.^[33]

In order to understand the effect of the ionic strength on the doxo binding and to extract the physicochemical parameters of the interaction, we can fit the data of Figure 1 to a convenient binding isotherm.^[18] It is well established for intercalators that $\Theta = \gamma r$, where γ is a constant typically ~ 1 (the ratio between the extension elongated per ligand and the distance between two consecutive base-pairs) and r is the fraction of bound ligand per DNA base-pair, whose saturation value is r_{max} .^[21,22,27,33] To perform the fitting, the bound ligand fraction r can be expressed by a convenient binding isotherm that captures the physical chemistry of the interaction.^[18]

For molecules which interact to the DNA only by simple intercalation, there are some options to be chosen as the binding isotherm in the fitting process: the McGhee - von Hippel neighbor exclusion model^[36] or, alternatively, the Hill model.^[18] While both isotherms explain well the monotonic increase of Θ observed in the Tris-HCl buffer, the classic McGhee - von Hippel binding isotherm (without cooperativity) cannot account for the sigmoidal behavior of

Θ obtained in the PBS buffer (see Figure 1). Therefore, in order to perform a robust comparison between the data obtained in the two different buffers, we have chosen the Hill model to fit both data, thus avoiding systematic errors related to the use of different binding isotherms. Such model is capable to account for ligand aggregation along the double helix,^[30,32] a feature usually observed for anthracyclines due to their self-association.^[23,24] The Hill binding isotherm reads

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

where K_i is the equilibrium binding association constant, n is the Hill exponent—a cooperativity parameter which is a lower bound for the number of cooperating ligand molecules involved in the reaction,^[27,30] and C_f is the free (not bound) ligand concentration in solution.

The fittings were performed using the numerical approach detailed described in Ref. 18. To reduce the number of adjustable parameters, we have fixed $\gamma = 1$, the expected value for simple monointercalators such as the anthracyclines.^[18,22] The fittings are shown in Figure 1 (solid lines). From these fittings, we extract the physicochemical parameters of the interaction. For the Tris-HCl buffer, $K_i = (5.3 \pm 1.3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = 1.4 \pm 0.4$, and $r_{max} = 0.30 \pm 0.04$. For the PBS buffer, on the other hand, $K_i = (2.7 \pm 0.3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $n = 3.6 \pm 0.7$, and $r_{max} = 0.21 \pm 0.02$.

The values obtained for the equilibrium association constants are on the same order of magnitude of the results obtained for other anthracyclines.^[35,37] Observe that K_i is approximately twice higher for the interaction in the Tris-HCl buffer. Such result is related to the fact that a lower salt concentration strengthens the electrostatic interaction between the negative phosphate groups of the DNA backbone and the doxo molecules (which are monocationic), thus enhancing intercalation.

The Hill exponent allows us to estimate the size of the doxo aggregates bound along the double-helix.^[18,30,32] The value $n = 1.4 \pm 0.4$ obtained in the Tris-HCl buffer indicates that doxo interacts with DNA in this buffer by simple intercalation (no aggregation) and/or by forming bound dimers. Such conclusion is compatible to the results found by Arnaiz et al., who have achieved the same conclusion using microcalorimetry and various spectroscopies in a buffer with a very low ionic strength ($[\text{NaCl}] = 2.5 \text{ mM}$).^[3] These authors have proposed that the dimers are composed by a partially intercalated doxo molecule which interacts and aggregate with another doxo molecule that remains outside the double-helix.^[3] We think that this is the only possible picture here, since two or more aggregated doxo molecules cannot intercalate together. On the other hand, the value $n = 3.6 \pm 0.7$ obtained in the PBS buffer indicates that, in this situation, doxo aggregates bound to DNA are composed by 3 to 4

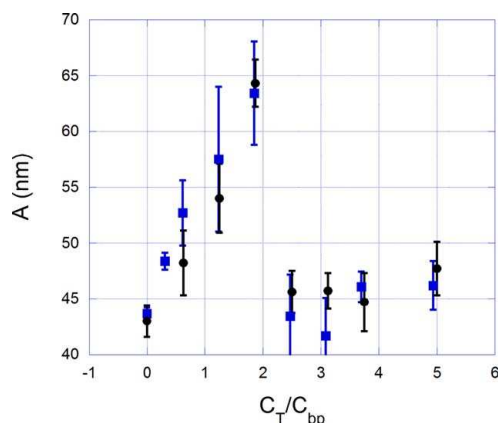


FIGURE 2 Persistence length A of DNA-doxo complexes as a function of drug total concentration in the sample normalized by the DNA base-pair concentration (C_T/C_{bp}), obtained with OT both in the Tris-HCl (blue squares) as well as in the PBS buffer (black circles). Observe that A initially increases from the bare DNA value (~ 43 nm) up to a maximum value (~ 64 nm) reached at $C_T/C_{bp} \sim 1.9$, and then abruptly decreases to around ~ 45 nm and remains constant within the error bars

doxo molecules in average. Here, again, only one molecule should be partially intercalated, while the others stay outside the double-helix. This result is compatible to the one found by Chaires *et al.* for the related anthracycline daunomycin.^[23] These authors have found that high order daunomycin aggregation occurs under $[NaCl] = 185$ mM, showing that a model with aggregates composed of four molecules can in principle explain their binding data.^[23] In fact, the Debye length is about ~ 4 times higher in the Tris-HCl buffer relative to the PBS buffer, and thus a much higher doxo aggregation is expected in the PBS buffer due to the screening of the electrostatic repulsion between the monocationic doxo molecules. A similar aggregation behavior was recently found for the cyclodextrin molecule when interacting with DNA, although in this case the electrostatic repulsion was modulated by changing the surface charge of the ligand.^[30,32] Other works can be found in the literature reporting ligand aggregation along the DNA double-helix.^[26,31,38,39]

Finally, the bound ligand fraction at saturation (r_{max}) is considerable higher in the Tris-HCl buffer (~ 0.3) than in the PBS buffer (~ 0.21). This result is due to the fact that a doxo trimer/tetramer occupy more space along the double-helix than a dimer or a single doxo molecule, which reduces the effective number of available intercalation sites in the PBS buffer. In fact, the effective binding site size can be estimated as $1/r_{max}$,^[18] being ~ 3.3 base-pairs in the Tris-HCl buffer

and ~ 4.8 base-pairs in the PBS buffer. Observe that only intercalated doxo molecules (and not the rest of the aggregate which remains outside the double helix^[3]) contribute to the increase of the contour length. Thus, we really expect a lower increase in the contour length under higher ionic strengths.

3.2 | The persistence length is strongly force-dependent

In Figure 2 we show the behavior of the persistence length A as a function of doxo total concentration in the sample (C_T) normalized by the DNA base-pair concentration (C_{bp}), obtained with OT. As mentioned before, the experiments were performed both in the Tris-HCl (blue squares) as well as in the PBS buffer (black circles), and the behavior found in the two situations is the same within the error bars. Observe in fact that in both situations the persistence length initially increases from the bare DNA value (~ 43 nm) up to a maximum value (~ 64 nm) reached at $C_T/C_{bp} \sim 1.9$, and then abruptly decreases to around ~ 45 nm and remains constant within the error bars at least for the concentration range studied here.

Such behavior of the persistence length appears to be a general property of DNA-intercalator complexes when stretched under the force regime of $F < 5$ pN.^[40] In fact, the same qualitative behavior was previously verified under our experimental

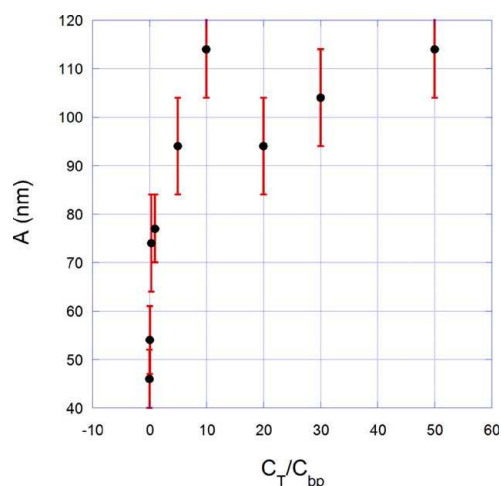


FIGURE 3 Persistence length A of DNA-doxo complexes as a function of drug total concentration in the sample normalized by the DNA base-pair concentration C_T/C_{bp} , obtained by AFM. Observe that A monotonically increases from the bare DNA value until the saturation value of ~ 110 nm, differing drastically from the behavior obtained in single molecule stretching experiments performed by optical tweezers

conditions for the intercalators ethidium bromide,^[22,33] daunomycin,^[33] psoralen,^[34] diaminobenzidine^[21] and for the bis-intercalator gelred.^[22] As detailed discussed in Ref. 40; however, such behavior depends strongly on some experimental features, especially on the force regime used to stretch the DNA-intercalator complexes.

In fact, in Figure 3 we show the behavior of the persistence length obtained from the AFM experiments for the DNA-doxo complexes under the experimental conditions previously discussed. Observe that here the persistence length increases monotonically from the bare DNA value until the saturation value of ~ 110 nm, differing drastically from the behavior obtained in the stretching experiments. In order to guarantee that no abrupt decrease on this parameter occurs in the AFM experiments, we have used doxo concentrations as high as $C_T/C_{bp} \sim 50$, i.e., 10 times higher than the saturation value found in OT experiments.

As mentioned before, such apparent discrepancy between the OT and AFM data can be understood on the basis of the extensive discussion found in Ref. 40. Basically, the persistence length of DNA-intercalator complexes is in general force-dependent. The general tendency of intercalators is to increase the DNA persistence length as a result of the various local structures formed along the double-helix upon drug binding, which are stabilized by hydrophobic stacking interactions between the drug molecules and the adjacent base-pairs. Nevertheless, depending on the drug concentration and/or the force regime used to perform the experiments with single molecule stretching techniques, a partial melting of the double-helix structure can occur due the stretching forces applied on the highly distorted double-helix structure of the DNA-intercalator complexes. It is well established that intercalators locally unwind the double-helix upon binding, exerting a torque that distorts the hydrogen bonds around the intercalation site. It was previously demonstrated that this kind of structural change, when under tension, can melt the double-helix locally,^[41] forming denaturation bubbles which induce a decrease on the effective persistence length.^[42,43] In the AFM experiments, there are no applied external forces, such that one should expect that the persistence length increases and saturates as the drug binds, which is exactly the behavior shown in Figure 3.

As discussed in Ref. 40, besides the partial melting assumption, an important issue related to the above results is the fact that the external force applied to stretch the DNA-drug complexes can change the chemical equilibrium between the drug and the DNA molecule. In fact, Vladescu *et al.* have shown that binding parameters such as the equilibrium association constant and the binding site size depend on the force applied on the DNA-drug complexes. In particular, the equilibrium constant increases exponentially as a

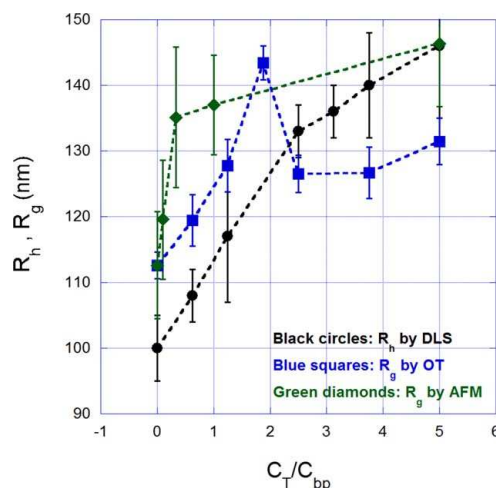


FIGURE 4 Black circles: hydrodynamic radius R_h obtained from the DLS experiments as a function of the normalized drug concentration in the sample (C_T/C_{bp}). For comparison purposes, it is also shown the radius of gyration R_g of such complexes obtained both from optical tweezers (OT) (PBS buffer) (blue squares) and AFM (green diamonds) data. The dashed lines are guides to the eyes

function of the applied force.^[44] Since this constant is closely linked to the concentration of bound drug, it is expected that the mechanical properties of the DNA-drug complexes are in fact force-dependent. Another work that evidences such conclusion was recently performed by Camunas-Soler *et al.*^[16] Nevertheless, it is difficult to explain the non-monotonic behavior of the persistence length only with this assumption, since one or more binding parameters should abruptly change their values at the “critical concentration” where the persistence length invert its behavior. In addition, since here we have used only very small forces to stretch the DNA-doxo complexes ($F < 5$ pN), the changes on the binding parameters are not relevant. Thus, we believe that only a structural change such as partial melting can explain the abrupt decrease observed in the persistence length measured by OT.

3.3 | DLS experiments corroborates with the partial melting proposal

In order to put into test the above discussion about the partial melting, a third experimental technique was used here. DLS was chosen because it is completely different from OT and AFM, being an ensemble-averaging technique which gives the mean behavior of a very high number of molecules.

In Figure 4 (black circles) we show the behavior of the hydrodynamic radius R_h obtained from the DLS experiments as a function of the normalized drug concentration in the sample (C_T/C_{bp}) (the dashed lines in this figure are only guides to the eyes). Observe that R_h increases monotonically as a function of the drug concentration, which indicates an increase on the effective size of the DNA-doxo complexes.

For comparison purposes, we also plot in Figure 4 the radius of gyration R_g of the DNA-doxo complexes obtained both from the OT (PBS buffer) (blue squares) and AFM (green diamonds) data. The radius of gyration was obtained from the corresponding persistence and contour lengths data by using the relation^[45]

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

where A is the persistence length and L is the contour length of the DNA-doxo complexes. This equation predicts that R_g increases with both A and L , as expected intuitively. In the case of OT experiments, which use λ -DNA (48,500 bp), the contour lengths were multiplied by the factor 3/48.5 in order to perform the comparison with the 3000 bp DNA used in the DLS and AFM experiments.

Although R_h and R_g cannot be quantitatively compared (R_h represents the radius of the equivalent sphere with the same diffusion coefficient and R_g is directly derived from pure mechanical parameters), they should exhibit the same qualitative behavior as a function of drug concentration, since both quantities are related to the effective size of the DNA-drug complexes.^[21] Nevertheless, Figure 4 shows that only the R_g data obtained by AFM agrees qualitatively with the R_h data, increasing monotonically with the drug concentration. The R_g data obtained by OT, on the other hand, increases until $C_T/C_{bp} \sim 1.9$ and then decreases, as a result from the abrupt decrease of the persistence length obtained in OT experiments (see Figure 2). As discussed, this behavior results from partial DNA melting due to the forces applied to perform the stretching experiments.^[40] Such forces are not present neither in AFM or DLS experiments, which explains the better agreement between these two techniques. In other words, the DLS results shown in Figure 4 agree with the partial melting assumption.

All these results together evidence that caution is needed when comparing persistence length data obtained from stretching and non-stretching techniques at least for DNA-intercalators complexes. In fact one should expect that such techniques agree well only for low drug concentrations, since in this case the stretching forces used in the entropic regime ($F < 5$ pN) are not sufficient to induce partial melting on the DNA-intercalator complexes.^[40] Thus, for these types of complexes, the contour length data is more reliable to be

used for extracting the physical chemistry of the interaction, as performed here.

4 | CONCLUSIONS

We have investigated the DNA interaction with the anti-cancer drug doxorubicin by using three very different experimental techniques: single molecule stretching performed by OT, single molecule imaging performed by AFM and ensemble-averaging DLS.

From the single molecule stretching experiments, we were able to determine the behavior of the basic mechanical parameters (persistence and contour lengths) as a function of the drug concentration in the sample.

The contour length data allowed us to extract the physical chemistry and to investigate the role of the ionic strength on the DNA-doxo binding. We have found that, at low ionic strengths, doxo interacts with DNA by simple intercalation (no aggregation) and/or by forming bound dimers. On the other hand, for high ionic strengths, doxo-doxo self-association is enhanced, giving rise to the formation of bound doxo aggregates composed by 3 to 4 molecules along the double-helix.

The persistence length data obtained from single molecule stretching exhibits a non-monotonic behavior as a function of the doxo concentration in the sample, in contrast with the results obtained by single molecule imaging, which suggest a simple monotonic increase for this mechanical parameter. Such discrepancy was interpreted in terms of the external forces applied in the stretching experiments, which can partially melt the highly distorted double-helix of the DNA-intercalator complexes, resulting in a decrease of the effective persistence length.

Finally, we have performed DLS experiments in order to evaluate the changes on the effective size of the DNA-doxo complexes, represented here by the hydrodynamic radius, as a function of drug concentration. This parameter was qualitatively compared to the radius of gyration of the complexes, obtained both from OT and AFM, thus connecting the results obtained from the three techniques and corroborating with the partial melting proposal.

In summary, we have performed a robust characterization of the DNA-doxo complexes from the mechanical and physicochemical points of view, comparing results obtained from three very different experimental techniques. Such characterization has allowed an improvement in the understanding of the present interaction, revealing new peculiarities such as the dependence of the size of doxo aggregates on the buffer ionic strength, which allows one to modulate the physical chemistry of the interaction. In addition, the methods used here can be applied to other DNA binding ligands, thus

providing clues about the mechanism(s) of action of important drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The DLS experiments were performed in “Laboratório de Microfluídica e Fluidos Complexos (LMFFC)” of Universidade Federal de Viçosa.

REFERENCES

- [1] www.cancer.org, *American Cancer Society* **2014**.
- [2] D. Salerno, D. Brogioli, V. Cassina, D. Turchi, G. L. Beretta, D. Seruggia, R. Ziano, F. Zunino, F. Mantegazza, *Nuc. Acids Res* **2010**, *38*, 7089.
- [3] C. Pérez-Arnaiz, N. Busto, J. M. Leal, B. García, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1288.
- [4] M. Airoidi, G. Barone, G. Gennaro, A. M. Giuliani, M. Giustini, *Biochem* **2014**, *53*, 2197.
- [5] D. Agudelo, P. Bourassa, G. Bérubé, H. Tajmir-Riahi, *Intern. J. Biol. Macromol* **2014**, *66*, 144.
- [6] F. Yao, J. Duan, Y. Wang, Y. Zhang, Y. Guo, H. Guo, X. Kang, *Anal. Chem* **2015**, *87*, 338.
- [7] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith, C. Bustamante, *Annu. Rev. Biochem* **2008**, *77*, 205.
- [8] I. de Vlaminck, C. Dekker, *Annu. Rev. Biophys* **2012**, *41*, 453.
- [9] K. R. Chaurasiya, T. Paramanathan, M. J. McCauley, M. C. Williams, *Phys. Life Rev* **2010**, *7*, 299.
- [10] F. Ritort, *J. Phys. - Condens. Mat* **2006**, *18*, R531.
- [11] K. C. Neuman, A. Nagy, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 491.
- [12] I. Heller, T. P. Hoekstra, G. A. King, E. J. G. Peterman, G. J. L. Wuite, *Chem. Rev* **2014**, *114*, 3087.
- [13] J. Zlatanovaa, S. M. Lindsayy, S. H. Leuba, *Prog. Biophys. Mol. Biol* **2000**, *74*, 61.
- [14] I. Amitani, B. Liu, C. C. Dombrowski, R. J. Baskin, S. C. Kowalczykowski, *Methods Enzymol* **2010**, *472*, 261.
- [15] K. Yoshikawa, S. Hirota, N. Makita, Y. Yoshikawa, *Phys. Chem. Lett* **2010**, *1*, 1763.
- [16] J. Camunas-Soler, M. Manosas, S. Frutos, J. Tulla-Puche, F. Albericio, F. Ritort, *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, 2767.
- [17] D. H. Paik, T. T. Perkins, *Angew. Chem. Int. Ed* **2012**, *51*, 1811.
- [18] M. S. Rocha, *Integr. Biol* **2015**, *7*, 967.
- [19] N. D. Fiori, A. Meller, *Biophys. J* **2010**, *98*, 2265.
- [20] H. S. Chung, I. V. Gopich, K. McHale, T. Cellmer, J. M. Louis, W. A. Eaton, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 3642.
- [21] L. A. Reis, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 14345.
- [22] F. A. P. Crisafuli, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *Eur. Biophys. J* **2015**, *44*, 1.
- [23] J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1982**, *21*, 3927.
- [24] M. Menozzi, L. Valentini, E. Vannini, F. Arcamone, *J. Pharm. Sci* **1984**, *73*, 766.
- [25] J. F. Marko, E. D. Siggia, *Macromolecules* **1995**, *28*, 8759.
- [26] F. A. P. Crisafuli, E. C. Cesconetto, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *Integr. Biol* **2012**, *2012*, 568.
- [27] E. C. Cesconetto, F. S. A. Junior, F. A. P. Crisafuli, O. N. Mesquita, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *Phys. Chem. Chem. Phys* **2013**, *15*, 11070.
- [28] C. Rivetti, M. Guthold, C. Bustamante, *J. Mol. Biol* **1996**, *264*, 919.
- [29] J. S. Hur, E. S. G. Shaqfeh, *J. Rheol* **2001**, *45*, 421.
- [30] L. Siman, I. S. S. Carrasco, J. K. L. da Silva, M. C. Oliveira, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, *Phys. Rev. Lett* **2012**, *109*, 248103.
- [31] E. F. Silva, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 7292.
- [32] P. S. Alves, O. N. Mesquita, M. S. Rocha, *J. Phys. Chem. Lett* **2015**, *6*, 3549.
- [33] M. S. Rocha, M. C. Ferreira, O. N. Mesquita, *J. Chem. Phys* **2007**, *127*, 105108.
- [34] M. S. Rocha, A. D. Lúcio, S. S. Alexandre, R. W. Nunes, O. N. Mesquita, *Appl. Phys. Lett* **2009**, *95*, 253703.
- [35] J. E. Coury, L. McFail-Isom, L. D. Williams, L. A. Bottomley, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12283.
- [36] J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol* **1974**, *86*, 469.
- [37] J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1982**, *21*, 3933.
- [38] J. Camunas-Soler, S. Frutos, C. V. Bizarro, S. de Lorenzo, M. E. Fuentes-Perez, R. Ramsch, S. Vilchez, C. Solans, F. Moreno-Herrero, F. Albericio, R. Eritija, E. Giral, S. B. Dev, F. Ritort, *ACS Nano* **2013**, *7*, 5102.
- [39] X. M. Hou, X. H. Zhang, K. J. Wei, C. Ji, S. X. Dou, W. C. Wang, M. Li, P. Y. Wang, *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, 1400.
- [40] R. F. Bazoni, C. H. M. Lima, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *Soft Matt* **2015**, *11*, 4306.
- [41] T. Hwa, E. Marinari, K. Sneppen, L. H. Tang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4411.

SILVA ET AL.

Biopolymers WILEY | 9 of 9

- [42] A. K. Dasanna, N. Destainville, J. Palmeri, M. Manghi, 1, *Phys. Rev. E* **2013**, 87, 052703.
- [43] F. Sicard, N. Destainville, M. Manghi, *J. Chem. Phys* **2015**, 142, 034903.
- [44] . D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nunez, I. Rouzina, M. C. Williams, *Nat. Methods* **2007**, 4, 517.
- [45] M. Daune, *Molecular Biophysics*, 1st ed.; Oxford University Press: Oxford, **1999**.

Reviewing Editor: Kenneth Breslauer

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

How to cite this article: Silva EF, Bazoni RF, Ramos EB, and Rocha MS. DNA-doxorubicin interaction: New insights and peculiarities. *Biopolymers*. 2017;107: e22998. doi:10.1002/bip.22998.

Referências Bibliográficas

- [1] ASHKIN, A.; “*Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*”. Phys. Rev. Lett., **24**, 156-159, 1970.
- [2] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; “*Optical levitation by radiation pressure*”. Appl. Phys. Lett. **19**, 283-85, 1971.
- [3] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; “*Optical levitation in high-vacuum*” Appl. Phys. Lett. **28**, 333-335, 1976.
- [4] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; “*Observation of resonances in radiation pressure on dielectric spheres*”. Phys. Rev. Lett., **38**, 1351-1354, 1977.
- [5] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; “*Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria*”. Science, **235**, 1517–1520, 1987.
- [6] ASHKIN, A., DZIEDZIC, J. M., BJORKHOLM, J. E., CHU, S.; “*Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*”. Opt. Lett., **11**, 288-290, 1980.
- [7] ASHKIN, A., DZIEDZIC, J. M. and YAMANE T. “*Optical trapping and manipulation of single cells using infrared-laser beams*”. Nature, **330**, 769-771, 1987.
- [8] ASHKIN, A.; “*Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime*”. Biophys. J. **61**, 569–582, 1992.
- [9] ASHKIN, A.; “*Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers*”. P. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 4853–4860, 1997.
- [10] WATSON, J. D. and CRICK, F. H. C.; “*Molecular Structure of Nucleic Acids - A Structure For Deoxyribose Nucleic Acid*”. Nature, **171**, (4356), 737–738, 1953.
- [11] WATSON, J. D. and CRICK, F. H. C.; “*Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid*”. Nature, **171**, (4361), 964–967, 1953.

- [12] NEUSA, M. J. S., NADIR, F. e DEMÉTRIO D.; “*A Construção Coletiva do Conhecimento Científico Sobre a Estrutura do DNA*”. *Ciência e Educação*, **11**, 223-233, 2005.
- [13] ADAMS, R. L. P., KNOWLER, T. J., LEADER, P. D.; “*The biochemistry of the nucleic acids*”. 11th Ed., Chapman & Hall Ltd, 1992.
- [14] WATSON, J., BAKER, T., BELL, S., GANN, A., LEVINE, M., LOSICK, R.; “*Molecular Biology of the Gene*”. 5^a Edition, Person Education, 2004.
- [15] SIMAN, L., CARRASCO, I. S. S., DA SILVA, J. K. L., OLIVEIRA, M. C., ROCHA, M. S., MESQUITA, O. N. “*Quantitative Assessment of the Interplay Between DNA-Elasticity and Co-operative Binding of Ligands*”. *Physical Review Letters*, **109**, 248103, 2012.
- [16] CESCINETTO, E. C, JUNIOR, F. S. A., CRISAFULI, F. A. P., MESQUITA, O. N., RAMOS, E. B., ROCHA, M. S.; “*DNA Interaction with Actinomycin D: Mechanical Measurements Reveal the Details of the Binding Data*”. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **15**, 11070-11077, 2013.
- [17] CRISAFULI, F. A. P., CESCINETTO, E. C., RAMOS, E. B., ROCHA, M. S.; “*DNA-Cisplatin Interaction Studied with Single Molecule Stretching Experiments*”. *Integrative Biology*, 568-574, 2012.
- [18] CRISAFULI, F. A. P., CESCINETTO, E. C., RAMOS, E. B., ROCHA, M. S.; “*DNA-Cisplatin Binding Mechanisms Peculiarities Studied with Single Molecule Stretching Experiments*”. *Applied Physics Letters*, **100**, 083701, 2012.
- [19] Rocha, M.S.: “*Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate dna interactions with drugs and proteins in single molecule experiments*. *Integrative Biology*. **7**, 967-986, 2015.
- [20] DAHM, R.; “*Friedrich Miescher and the discovery of DNA*”. *Developmental Biology*, **278**, 274-288, 2005.
- [21] DAUNE, M. ; “*Molecular Biophysics: Structures in Motion*”. InterEditions, Paris, 1993. Translated by Duffin, W. J., Oxford Universit Press, New York, US, 1999.
- [22] ZAHA, A., FERREIRA, H., SCHRANK, A. e PASSAGLIA, L.; “*A estrutura dos Ácidos Nucléicos*”. *Biologia Molecular Básica*, **3**, 33-58, 2003.
- [23] ROCHA, M. S.; “*Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*”. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2008.

- [24] FERREIRA, M. C. G. M.; “*Estudo da Transição Entrópica do DNA Induzida por Intercalantes Utilizando a Técnica de Pinçamento Óptico e Espectroscopia de Autocorrelação de Intensidades*”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2007.
- [25] CALLADINE, C. R., DREW, H. R., LUISI, B. F., TRAVERS, A. A.; “*Understanding the DNA: The Molecule & How It Works*”. Elsevier Academic Press, Third Edition, 2004.
- [26] NETO, J. C.; “*Medida da Elasticidade Entropica de Uma Molécula de DNA*”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2001.
- [27] NASCIMENTO, V. V.; “*Construção de um diagrama de fases para o complexo Sso7dC8 + DNA*”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2016.
- [28] MARKO, J. F. and SIGGIA, E. D., “*Stretching DNA*”. *Macromolecules*, **28** (26), 8759–8770, 1995.
- [29] CRISAFULI, F.A.P.; “*Caracterização da interação DNA-Cisplatina usando pinça óptica e videomicroscopia*” Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.
- [30] RAJAGOPALA, S. V., CASJENS, S., UETZ, P.; “*The protein interaction map of bacteriophage lambda*”. *BMC Microbiology*, **11**, 2011.
- [31] WANG, M. D., YIN, H., LANDICK, R., GELLES, J., BLOCK, S. M.; “*Stretching DNA with Optical Tweezers*”. *Biophys Journal*, **72**, 1335-1346, 1997.
- [32] STRICK, T., ALLEMAND, J. F., CROQUETTE, V., BENSIMON, D. “*Twisting and Stretching Single DNA Molecules*”. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **74**, 115-140, 2000.
- [33] MCGHEE, J. D.; von HIPPEL, P. H.; “*Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice*”. *J. Mol. Biol.*, **86**, 469-489, 1974.
- [34] ZANUTO, V. S.; “*Pressão de Radiação: sobre os efeitos das forças de radiação em água*”. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil, 2015.
- [35] MILES, J.P., JUSTIN, E.M., DAVID, M.C.; “*Óptical Tweezers: Methods and Applications*”. Chapman and Hall/CRC, Taylor and Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742, 2010.

- [36] ASHKIN, A.; “*History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules*”. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, **06**, 841-856, 2000.
- [37] LEBEDEW, P.; “*Untersuchungen über die Druckkräfte des Lichtes*”. (Do alemão: “*Estudos sobre as forças de compressão da luz*”). Ann.Phys., **6**, 433, 1901.
- [38] NICOHLS, E. F. and HULL, G. F.; “*A preliminary communication on the pressure of heat and light radiation*”, Phys. Rev. **13**, 307, 1901.
- [39] JONES, R. V.; “*Pressure of radiation*”. Nature, **171**, 1089, 1953.
- [40] MAZOLLI, A., NETO, P. A. M., and NUSSENZVEIG, H. M.; “*Theory of trapping forces in optical tweezers*”. Proc. R. Soc. Lon. **A 459**, 3021–3041, 2003.
- [41] DUTRA, R. S.; VIANA, N. B.; MAIA NETO, P. A. and NUSSENZVEIG, H. M.: “*Absolute calibration of optical tweezers including aberrations*”. Appl. Phys. Lett., **100**, 131115, 2012.
- [42] MAZOLLI, A.; “*Teoria das pinças ópticas: uma aplicação da teoria de espalhamento Mie*”. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.
- [43] ALVES, P. S.; “*Teoria e calibração de pinças ópticas*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.
- [44] ROCHA, M. S.; “*Pinças Ópticas: Experimento e Teoria*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2004.
- [45] SILVA, D. C. N.; “*Desenvolvimento de um sistema de pinças ópticas para estudo de interações celulares-aplicações em hemoterapia*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2010.
- [46] SILVA, E. F.; “*Interação DNA-Hoechst(33258) por pinçamento ótico*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2013.
- [47] NEUMAN, K. C.; BLOCK, S. M.; “*Optical trapping*”. Rev. Sci. Instrum, 2787, 75(9), 2004.
- [48] BLOSSEY, R. and SCHIESSEL, H.; “*The dynamics of the nucleosome: thermal effects, external forces and ATP*”, FEBS Journal, **28**, 3619-3632, 2011.

- [49] FULLER, D. N.; GEMMEN, G. J.; RICKGAUER, J. P.; DUPONT, A.; MILLIN, R.; RECOUVREX, P. and SMITH, D. E.: “A general method for manipulating DNA sequences from any organism with optical tweezers”. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2 : e15, 2006.
- [50] AMITANI, I., LIU, B., DOMBROWSKI, C. C., BASKIN, R. J., KOWLCZYKOWSKI, S. C. “Watching Individual Proteins Acting on Single Molecules of DNA”. *Methods Enzymol*, **472**, 261-291, 2010.
- [51] BATISTA, J. A. D.: “Estudo do encapsulamento de compostos DNA fármacos por um polipeptídeo recombinante”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2017.
- [52] OGDEN, R. C.; ADAMS, Deborah A.: “Electrophoresis in agarose and acrylamide gels”. *Methods in enzymology*, **152**, 61, 1987.
- [53] ROCHA, J. C. B.: “Estudo da formação de micelas reversas do copolímero tribloco ($EO_{13}PO_{30}EO_{13}$) em *p*-xileno: efeito da adição de solução salina”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.
- [54] ROCHA, J. C. B.: “Estrutura e termodinâmica de formação dos complexos de polímero de β -ciclodextrina com surfactantes iônicos e efeito da associação do polímero com cadeias de DNA”. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2010.
- [55] ARZENSEK, D.: “Dynamic light scattering and application to proteins in solutions”. University of Ljubljana (Liubliana), Eslovênia, May 19, 2016.
- [56] HERNANDEZ-GARCIA, A.; WERTEN, M. W.; STUART, M. C.; de WOLF, F. A.; de VRIES R.; “Coating of single DNA molecules by genetically engineered protein diblock copolymers”. *Small*, **19**, 8(22), 3491-3501, 2012.
- [57] HERNANDEZ-GARCIA, A.; KRAFT, D. J.; JANSSEN, A. F. J.; BOMANS, P. H. H.; SOMMERDIJK, N. A. J. M.; THIES-WEESIE, D. M. E.; FAVRETTO, M. E.; BROCK, R.; de WOLF, F. A.; WERTEN, M. W. T.; van der SCHOOT, P.; STUART, M. C.; de VRIES R.; “Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses”. *Nature Nanotechnology*, **9**, 698-702, 2014.
- [58] J.H.M. de Lange, N.W. Schipper, G.J. Schuurhuis, T.K. ten Kate, Th.H.M. van Heijningen, H.M. Pinedo, J. Lankelma, and J.P.A. Baak; “Quantification by Laser Scan Microscopy of Intracellular Doxorubicin Distribution”. *Cytometry*, **13**, 571-576, 1992.
- [59] PEREZ-ARNAIZ C., BUSTO N., LEAL M.J. and GARCIA B.; “New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction”. *The Journal of Physical Chemistry B*, **Vol. 118**, 1288-1295, 2014.

- [60] AGUDELO D., BOURASSA P., BÉRUBÉ G. and TAJMIR-RIahi H.-A.; “*Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications*”. International Journal of Biological Macromolecules, **66**, 144-150, 2014.
- [61] AIROLD M., BARONI G., GIUSEPPE G., GIULIANI A. M. and GIUSTINI M.; “*Interaction of Doxorubicin with Polynucleotides. A Spectroscopic Study*”. Biochemistry, **53**, 2197-2207, 2014.
- [62] LEHMANN, M.; “*Toxicidade genética das antraciclinas : associação entre estrutura química e ação inibitória sobre a topoisomerase II*”. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, RS, Brasil, 2003.
- [63] AGRAWAL, P.; BARTHWAL, S.K.; BARTHWAL, R.; “*Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry*”. European Journal of Medicinal Chemistry, **44**, 1437–1451, 2009.
- [64] Alves, P.S., Mesquita, O.N., Rocha, M.S.: “*Controlling cooperativity in β -cyclodextrin-dna binding reactions*”. Journal of Physical Chemistry Letters. **6**, 3549-3554, 2015.
- [65] CRISAFULI, F.A.P., RAMOS, E.B., ROCHA, M.S.: “*Characterizing the interaction between dna and gelred fluorescent stain*”. European Biophysics Journal. **44(1-2)**, 1-7, 2015.
- [66] SILVA, E.F., RAMOS, E.B., ROCHA, M.S.: “*Dna interaction with hoechst 33258: stretching experiments decouple the different binding modes*”. Journal of Physical Chemistry B. **117(24)**, 7292-7296, 2013.
- [67] COURY, J.E., MCFAIL-ISOM, L., WILLIAMS, L.D., BOTTOMLEV, L.A.: “*A novel assay for drug- dna binding mode, affinity, and exclusion number: Scanning force microscopy*”. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA **93(22)**, 12283-12286, 1996.
- [68] REIS, L.A., RAMOS, E.B., ROCHA, M.S.: “*Dna interaction with diaminobenzidine studied with optical tweezers and dynamic light scattering*”. Journal of Physical Chemistry B. **117(46)**, 14345-14350, 2013.

- [69] ROCHA, M.S., FERREIRA, M.C., MESQUITA, O.N.: “*Transition on the entropic elasticity of dna induced by intercalating molecules*”. Journal of Physical Chemistry. **127(10)**, 105-108, 2007.
- [70] ROCHA, M. S., LÚCIO, A. D., ALEXANDRE, S. S., NUNES, R. W., MESQUITA, O. N.; “*DNA-Psoralen: Single-Molecule Experiments and First Principles Calculations*”. Applied Physics Letters, **95**, 253703, 2009.
- [71] CHAIRES, J. B., DATTA GUPTA, N., CROTHERS, D. M.: “*Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid*” Biochemistry, **21**, 3933-3940, 1982.
- [72] EVSTIGNEEV, M. P.; KHOMICH, V. V.; DVVIES, D. B.: “*Self-Association of Daunomycin Antibiotic in Various Buffer Solutions*”. Russian Journal of Physical Chemistry, **80, 5**, 741–746, 2006.
- [73] CAMUNAS-SOLER, J.; MANOSAS, M.; FRUTOS, S.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F.; RITORT, F.: “*Single-molecule kinetics and footprinting of DNA bis-intercalation: the paradigmatic case of Thiocoraline*”. Nucleic Acids Research. **43**, 2767-2779, 2015.
- [74] CAMUNAS-SOLER, J.; FRUTOS, S.; BIZARRO, C. V.; DE LORENZO, S.; FUENTES-PEREZ, M. E.; RAMSCH, R.; VILCHEZ, S.; SOLANS, C.; MORENO-HERRERO, F.; ALBERICIO, F.; ERITJA, R.; GIRALT, E.; DEV, S. B.; RITORT, F.: “*Electrostatic Binding and Hydrophobic Collapse of Peptide–Nucleic Acid Aggregates Quantified Using Force Spectroscopy*”. ACS Nano, **7**, 5102-5113, 2013.
- [75] BERNAL, W. F. P.; SILVA, E. F.; ROCHA, M. S.: “*Unraveling the physical chemistry and the mixed binding modes of complex DNA ligands by single molecule stretching experiments*”, RSC Advances, **6**, 105631-105637, 2016.
- [76] BAZONI, R. F. ; LIMA, C. H. M. ; RAMOS, E. B. ; ROCHA, M. S.: “*Force-dependent persistence length of DNA-intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments*”. Soft Matter, **21**, 4306-4314, 2015.
- [77] SILVA, E. F.; BAZONI, R. F.; RAMOS, E. B.; ROCHA, M. S.: “*DNA-doxorubicin interaction: new insights and peculiarities*”, Biopolymers, **107 - (3)**, e22998, Março, 2017.
- [78] VLADESCU, I. D.; MCCAULEY, M. J.; NUNEZ, M. E.; ROUZINA, I.; WILLIAMS, M.C.: “*Quantifying force-dependent and zero-force DNA intercalation by single-molecule stretching*”. Nature Methods, **4**, 517-522, 2007.

- [79] NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.: “*Biosurfactantes: Propriedades e aplicações*”. Química Nova, **25**, 772-776, 2002.
- [80] HAYAKAWA, K.; SANTERRE, J. P. and KWAK, J. C. T.: “*THE BINDING OF CATIONIC SURFACTANTS BY DNA*”. Biophysical Chemistry, **17**, 175-181, 1983.
- [81] BHATTACHARYA, S., MANDAL, S. S.: “*Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity and surface charge on intercalation and DNA melting*”. Biochimica et Biophysica Acta, **1323**, 29-44, 1997.
- [82] RAN, S. Y.; WANG, Y. W.; YANG, G. C. and ZHANG, L. X.: “*Morphology characterization and single-molecule study of DNA-dodecyltrimethylammonium bromide complex*”. Physical Chemistry B, **115**, 4568-4575, 2011.
- [83] CHENG, C.; RAN, S. Y.: “*Interaction between DNA and trimethyl-ammonium bromides with different Alkyl chain lengths*”. The Scientific World Journal, **2014**, Article ID 863049, 9 pages, 2014.
- [84] HUSALE, S.; GRANGE, W.; KARLE, M., BURGI, S. and HEGNER, M.: “*Interaction of cationic surfactants with DNA: a single-molecule study*” Nucleic Acids Research, **36**, 1443–1449, 2008.
- [85] LASIC, D. D.: “*Liposomes in gene delivery*”. CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- [86] De SMEDT, S. C.; DEMEESTER, J.; HENNINK, W. E.: “*Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems*” Pharmaceutical Research, **17**, 113–126, 2000.
- [87] HUSALE, S. C.: “*Single biomolecule studies using optical tweezers*”. Thesis of Doctor of Philosophy, University of Basel, Basel, Switzerland, June 2005.
- [88] BATHAIE, S. Z.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. and SABOURY, A. A.: “*Energetic and binding properties of DNA upon interaction with dodecyl trimethylammonium bromide*”. Nucleic Acids Research, **27**, No. 4, 1001–1005, 1999.
- [89] GODDARD, E. D.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P.: “*Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins*”. Journal of Dispersion Science and Technology, CRC Press, Boca Raton, FL, 1-427, 1993.
- [90] La MESA, C.: “*Polymer–surfactant and protein–surfactant interactions*”. Journal of Colloid and Interface Science, **286**, 148–157, 2005.
- [91] MEL'NIKOV, S. M.; SERGEYEV, V. G.; YOSHIKAWA, K.: “*Discrete Coil-Globule Transition of Large DNA Induced by Cationic Surfactant*”. Journal of the American Chemical Society, **117**, 2401–2408, 1995.

- [92] YUNFEI HE: “*Study on the interfacial properties of surfactants and their interactions with DNA*”. Other [cond-mat.other]. Université Paris Sud - Paris XI; East China University of science and technology, 2013.
- [93] RANGEL-YAQUI, C. O.; HSU, H. W. L.; PESSOA-JR A. e TAVARES, L. C.: “*Micellar solubilization of ibuprofen – influence of surfactant head groups on the extent of solubilization*”. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **41**, num. 2, 237-246, 2005.