

ROBSON DA SILVA

**INFLUÊNCIA DO INTERCALANTE BROMETO DE ETÍDIO NA
CONDENSAÇÃO DO DNA INDUZIDA POR ESPERMINA: UM
ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA DE FORÇA E ELETROFORESE
EM GEL**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014**

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

T

S586i
2014 Silva, Robson da, 1975-
Influência do intercalante Brometo de Etídio na
condensação do DNA induzida por espermina : um estudo
por espectroscopia de força e eletroforese em gel / Robson
da Silva. - Viçosa, MG, 2014.
x, 72f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.
Orientador : Márcio Santos Rocha.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f.68 -72.

1. Óptica física. 2. Ácido desoxirribonucléico.
3. Condensação. 4. Pinçamento óptico. 5. Eletroforese.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Física.
Programa de Pós-graduação em Física Aplicada. II. Título.

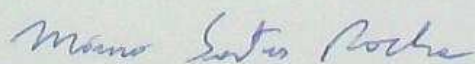
CDD 22. ed. 535.2

ROBSON DA SILVA

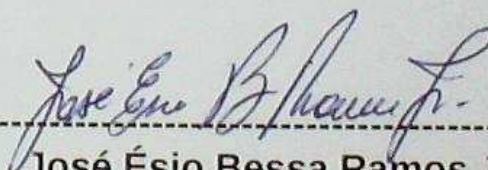
INFLUÊNCIA DO INTERCALANTE BROMETO DE ETÍDIO NA CONDENSAÇÃO
DO DNA INDUZIDA POR ESPERMINA: UM ESTUDO POR
ESPECTROSCOPIA DE FORÇA E ELETROFORESE EM GEL

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

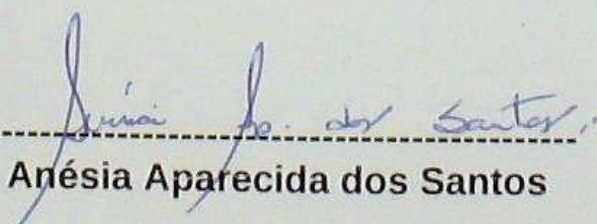
APROVADA: 16 de dezembro de 2014.



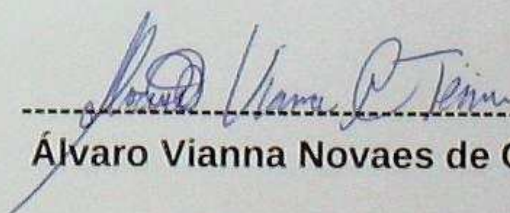
Márcio Santos Rocha
(Orientador)



José Ézio Bessa Ramos Júnior
(Co-orientador)



Anésia Aparecida dos Santos



Álvaro Vianna Novaes de C. Teixeira

Dedico este trabalho com muito carinho a minha filha Laura Peixoto Silva, que esteve sempre a meu lado, me incentivado.

Aos meus pais José Bernardo da Silva e Marlene Mariana da Silva, que estiveram sempre ao meu lado, em busca desta realização.

A todos meus colegas e professores do Curso mestrado em Física Aplicada, que me deram apoio e incentivo nessa jornada.

A Deus pela presença constante.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a deus, que na alegria da vitória sinto o quanto é fiel e tem sido real na minha vida.

Aos meus pais, José Bernardo da Silva e Marlene mariana da Silva, aos meus amados filhos Laura Peixoto Silva e Robson da Silva Júnior, e a todos os meus irmãos José Geraldo, Jotaci, Paulo César, Fernanda Mariana, Eduardo e Aparecida Mariana da Silva (in memoria) pelo amor, dedicação e incentivo durante toda a minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Márcio Santos Rocha, pela amizade, ensinamentos e acompanhamento. Por ser paciente, integro e estar sempre presente nos auxiliando com tanta dignidade, respeito e ética no laboratório de Física Biológica e aos Professores: José Ésio B. Ramos e Marcelo Lobato Martins pela coorientação.

Aos colegas do curso de mestrado em física aplicada e em especial aos companheiros do laboratório de Física Biológica que ajudaram muito na realização dos experimentos.

Ao meu amigo e colega de laboratório Aganoel Gomes Cavalcante pelo acompanhamento durante a realização dos experimentos, também pelo apoio e incentivo durante os momentos de desanimo e dificuldades.

Aos professores: Winder Alexander de Moura Melo, Sukarno Olavo Ferreira, Márcio Santos Rocha e Afrânio Rodrigues Pereira, pela confiança depositada em mim. Ao professor José Arnaldo pela franqueza e ensinamentos, ao secretário Marcos pelo acompanhamento, incentivo e presteza. A todos os professores e funcionários do departamento de física da Universidade Federal de Viçosa.

Às agências de fomento: CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do laboratório de Física Biológica.

A rede Doctum de ensino e a secretaria de estado de educação de Minas Gerais pelo apoio prestado nessa jornada.

Por fim, agradeço a todos os funcionários do departamento de física que direta ou indiretamente me auxiliaram nessa jornada.

A todos os funcionários dos departamentos pedagógico e administrativo da Universidade Federal de Viçosa pelo excelente acolhimento durante esses dois anos.

A todos muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 Referencial teórico.....	5
2.1 Pinças ópticas	5
2.1.1 Princípio de funcionamento de pinças ópticas	6
2.1.2 Estimativa da ordem de grandeza de forças ópticas	7
2.2 Limite da óptica geométrica.....	8
2.2.1 Microesfera situada antes do foco.....	9
2.2.2 Microesfera situada depois do foco	10
2.3 Limite Rayleigh:	12
2.4 Teoria MDSA	13
2.5 DNA.....	13
2.5.1 Estrutura do DNA	14
2.5.2 Desnaturação e renaturação do DNA.....	19
2.5.3 Classificação do DNA.....	20
2.5.4 DNA do bacteriófago λ	21
2.6 Mecânica de polímeros	22
2.7 Interação DNA- ligante	23
2.7.1 Interações.....	23
2.7.2 Brometo de Etídio.....	24
2.7.3 Espermina.	25
2.7.4 Interação intercalante-DNA-condensante.....	26
2.8 Eletroforese	28
3 Técnicas experimentais e preparação da amostra.....	30
3.1 Pinça óptica	30
3.2 Preparação da amostra para análise através de pinça óptica	32
3.3 Preparação do porta-amostra.....	32
3.4 Preparação do Microscópio.....	33
3.5 Procedimento experimental	34
3.5.1 Preparando o Experimento.....	34

3.5.2 Realizando o Estiramento	35
3.5.3 Procedimento utilizando brometo de etídio e espermina	38
3.6 Aparelho de Eletroforese	40
3.6.1 Preparação da Amostra	41
3.6.2 Preparação do porta-amostra para eletroforese	41
3.6.3 Procedimento experimental com eletroforese	41
4 Apresentação e discussão dos resultados	43
4.1 Método experimental	43
4.2 Resultados obtidos por espectroscopia de força	45
4.3 Resultados do experimento com eletroforese em gel	52
5 Conclusões e Perspectiva	57
APÊNDICE A	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURA

2.1 Efeito da refração..	9
2.2 Efeito da refração.....	11
2.3 Pressão de radiação.....	12
2.4 Diagrama representando o nucleotídeo.	15
2.5 Bases nitrogenadas e suas estruturas em anéis.	16
2.6 Esquema da dupla hélice.	17
2.7 Esquema da direção de crescimento da cadeia.	18
2.8 Tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas.....	20
2.9 Estrutura química da molécula de Brometo de Etídio.....	25
2.10 Estrutura química da molécula de Espermina.	26
3.1 Montagem Experimental.....	31
3.2 Possíveis configurações existentes em uma amostra.	34
3.3 Esquema de realização do experimento.	36
3.4 Gráfico típico contendo a relação da componente x da força pela extensão da molécula DNA em sua forma nativa.	37
3.5 Ilustração do procedimento de roca de alíquotas.....	39
3.6 Foto ilustrativa do equipamento de eletroforese.	40
4.1 Curvas de Força × Extensão em várias concentrações de EtBr, mantendo a concentração SPM4+ fixa em 100 µM.	46
4.2 Curvas de Força × extensão em várias concentrações de EtBr, quando o fármaco interage com moléculas de DNA previamente condensada por SPM4+ a 100 µM.	50
4.3 Resultado do Experimento de Eletroforese.	53

RESUMO

SILVA, Robson da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014.
Influência do intercalante brometo de etídio na condensação do DNA induzida por espermina: um estudo por espectroscopia de força e eletroforese em gel.
Orientador: Márcio Santos Rocha. Coorientadores: José Ésio Bessa Ramos Junior e Marcelo Lobato Martins.

Neste trabalho, utilizamos pinçamento óptico com espectroscopia de força para caracterizar a influência do intercalante brometo de etídio em moléculas de DNA, condensadas por espermina. Os experimentos foram conduzidos em duas etapas. Primeiro, verificamos a capacidade do brometo de etídio em impedir a formação de condensados de DNA por adição de espermina, em segundo lugar, verificamos se seria possível ocorrer intercalação do brometo de etídio em moléculas de DNA previamente condensadas por espermina. Realizamos também o mesmo tipo de experimento, mas agora fazendo análises através de eletroforese em gel de agarose, para fins comprobatórios dos resultados obtidos com espectroscopia de força. Tais análises nos permitiram verificar que o brometo de etídio, quando previamente adicionado na solução contendo DNA, impede que molécula de espermina condense o DNA. Os resultados obtidos nos mostraram que o oposto não ocorre, ou seja, o brometo de etídio tem pouca influência sobre condensados de DNA previamente formados por ação de espermina.

ABSTRACT

SILVA, Robson da, M. Sc, Universidade Federal de Viçosa, December 2014.
Influence of intercalating ethidium bromide condensation of DNA induced by spermine: A study by force spectroscopy and gel electrophoresis. Adviser: Márcio Santos Rocha. Co-Adviser: José Ésio Bessa Ramos Júnior and Marcelo Lobato Martins.

In this work, we use with optical clamping force spectroscopy to characterize the influence of the intercalator ethidium bromide in DNA molecules condensed by spermine. The experiments were conducted in two stages. First, we checked the ability of ethidium bromide to prevent the formation of condensed DNA by addition of spermine, and second we investigate the possibility of the intercalation of ethidium bromide in DNA molecules condensed by spermine previously. We also performed the same type of experiment, but now doing analysis by electrophoresis on agarose gel, for evidentiary purposes the results obtained from force spectroscopy. Such analysis allowed us to verify that ethidium bromide when previously added in the solution containing DNA prevents spermine to condense DNA molecule. The result showed that the opposite does not occurs, i.e., ethidium bromide has little influence on pre-condensed DNA formed by the action of spermine.

Capítulo 1

Introdução

Desde tempos remotos, o homem tem procurado a cura dos males do corpo utilizando ou ingerindo compostos orgânicos feitos à base de plantas (chás). Hoje, porém, sabemos que esses compostos possuem substâncias químicas que nem sempre fazem bem ao organismo. As que realmente atuam necessitam de uma dosagem específica para provocar algum efeito sobre certas enfermidades. Nas últimas décadas, a medicina tem avançado muito no tratamento de algumas patologias, utilizando-se de dosagens de fármacos que são obtidas principalmente a partir das plantas. De modo geral, o sucesso de um tratamento se baseia no conhecimento prévio dos efeitos dessas substâncias sobre o organismo vivo. Então os cientistas e pesquisadores têm se empenhado para descobrir e caracterizar os efeitos de algumas substâncias sobre o organismo, mas a quase totalidade dos estudos está voltada para as ocorrências sobre um conjunto de células ou mesmo em uma parte específica do corpo. Pouco se sabe sobre os efeitos dessas drogas nas células ou mesmo sobre uma única molécula de DNA. Com o intuito de fornecer maior compreensão sobre os efeitos dessas substâncias nas moléculas únicas de DNA, dois ramos da ciência, biologia e física, unem-se criando o estudo da biofísica de polímeros.

A biofísica de polímeros e polieletrólitos é um campo interdisciplinar bem estudado, com importantes descobertas alcançadas nas últimas décadas [1]. Após a descoberta da estrutura do DNA, feita por Watson e Crick em 1953, [2,3] diversas pesquisas envolvendo interações entre DNA e fármacos vêm sendo desenvolvidas. Muito tem sido revelado a respeito da molécula de DNA. Uma ferramenta muito útil no estudo das interações da molécula de DNA foi introduzida por Arthur Ashkin na

década de 1960, que realizou as primeiras pesquisas com pinças ópticas, as quais permitem a manipulação de moléculas de DNA.

A pinça óptica nos fornece a ferramenta perfeita para manipular objetos que se encontram em escala microscópica. Esse instrumento permite acesso a um mundo que não poderíamos manipular diretamente, e, aliado à espectroscopia de força, forma um conjunto poderoso de ferramentas utilizadas na análise das propriedades mecânicas de moléculas biológicas. Arthur Ashkin define de modo simples a pinça ótica como sendo um feixe de laser fortemente focalizado através da lente objetiva de um microscópio [4,5]. Desde processos intracelulares básicos até aplicações em ciências médicas, especialmente em tratamentos quimioterápicos e terapias gênicas, as interações DNA-ligante tem sido um tópico de pesquisa de interesse para muitas áreas do conhecimento [6,7].

Neste trabalho, nós utilizamos a técnica de pinçamento óptico e espectroscopia de força para avaliar a eficácia do uso de um ligante intercalante (EtBr) em impedir a compactação da molécula de DNA pela ação de espermina, verificando também se seria possível ocorrer intercalação do ligante (EtBr) e/ou descompactação da molécula, tendo a molécula de DNA sido previamente compactada pela ação de espermina. Em sequência, realizamos os mesmos experimentos, mas utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose, uma técnica de análise desenvolvida por Arne Tiselius, que permite a separação de compostos químicos, realizada pela ação de um campo elétrico.

A condensação induz uma redução drástica no volume ocupado pela molécula de DNA quando dispersa em solução, com a consequente formação de minúsculos condensados de DNA, que muitas vezes apresentam uma forma de toróide, glóbulo ou bastonete [8,9,18]. Estes condensados podem servir, portanto, como modelos experimentais simples para estudar o DNA dentro de estruturas vivas. Adicionalmente, a condensação de DNA tem atraído o interesse de diferentes áreas, como bioquímica, biofísica, biologia molecular (embalagem de informação genética), física de polímeros (transições de fase) e medicina (aplicações de terapia genética) [10].

Um tópico muito menos estudado é a interação do ligante com o DNA condensado. Na verdade, a quase totalidade dos estudos envolvendo interações

DNA-ligantes foram realizados utilizando moléculas de DNA dispersas em solução, e existem poucos estudos [11-13] preocupados em caracterizar essas interações com a molécula de DNA condensada. No entanto, apesar da falta de informações sobre este assunto, a sua importância está diretamente correlacionada com o fato de que *in vivo* as moléculas de DNA estão fortemente condensadas no interior do núcleo das células, durante a maior parte do tempo. Assim, caracterizando interações destes medicamentos com o DNA condensado, podemos obter novas e fundamentais informações não só para as ciências básicas, mas também para aplicações práticas, especialmente no tratamento de doenças humanas (quimioterapia do câncer, terapia gênica, e outras). Experimentos anteriores sobre este tema foram realizados por Widom e Baldwin, usando espalhamento de luz, [11] e pelo grupo de K. Yoshikawa, usando microscopia de fluorescência [11,13]. Alguns resultados destes grupos indicam que intercalantes podem interferir na condensação do DNA, inibindo o fenômeno em grandes concentrações de ligantes. No entanto, as técnicas experimentais utilizadas por esses autores não permitiram estudar o fenômeno em molécula única. Neste trabalho, utilizamos pinças ópticas para estirar moléculas únicas de DNA quando influenciadas pelos ligantes espermina e brometo de etídio (EtBr). Também realizaremos esse mesmo experimento de caracterização utilizando a técnica experimental de eletroforese em gel.

No capítulo dois deste trabalho, serão apresentados os principais aspectos teóricos que o norteiam, começando com uma breve discussão sobre pinças ópticas, envolvendo o contexto histórico e o princípio de funcionamento. Seguido da descrição das características da molécula de DNA. Apresentamos também as principais teorias envolvidas no processo experimental, comentaremos sobre os aspectos históricos e químicos das principais substâncias envolvidas no campo experimental, e por fim, descreveremos as principais características envolvidas no procedimento experimental de eletroforese.

No capítulo três, descreveremos todos os instrumentos utilizados, bem como o procedimento experimental adotado.

No capítulo quatro, discutiremos e apresentaremos os resultados obtidos com as duas técnicas de análise.

No capítulo cinco, apresentaremos as conclusões e as perspectivas fornecidas pelos resultados desse trabalho.

Capítulo 2

Referencial teórico

Neste capítulo, apresentaremos as principais técnicas e equipamentos que utilizamos para análise de nosso experimento. Faremos também uma breve apresentação das principais teorias que o norteiam, bem como uma descrição sucinta sobre as características da molécula de DNA.

2.1 Pinças ópticas

Em 1873, James Clerk Maxwell, em um de seus mais notáveis trabalhos, desenvolve a forma final que une a eletricidade, o magnetismo e a óptica, o que ficou conhecido como a teoria moderna do eletromagnetismo. Nela, ele demonstra que a luz é capaz de transferir momento para um objeto ao incidir sobre ele. Esse fenômeno cria sobre o objeto uma força de origem óptica, devido à reflexão, refração e absorção da luz sobre a matéria. Esta força é diretamente proporcional à potência do raio de luz da fonte (P_r) e inversamente proporcional à velocidade de propagação (v) da luz no meio, o que é dado por:

$$F \propto \frac{P_r}{v} \quad (2.1)$$

Com

$$v = \frac{c}{n} \quad (2.2)$$

Sendo c a velocidade da luz no vácuo e n é índice de refração do meio de incidência. A pressão de radiação imposta pelo feixe de luz, nesse caso, desenvolve uma potência da ordem de alguns miliwatts. Esse fato garante a existência de forças no limite de piconewtons. Com a descoberta de uma fonte de luz intensa e colimada em 1960, "o laser", estudos mais precisos e conclusivos sobre pressão de radiação foram possíveis [14,15]. Arthur Ashkin e seus colaboradores demonstraram em 1970 que pequenos objetos da ordem de microns poderiam ser manipulados usando-se para isso as forças provenientes de feixes de luz fortemente focalizados, o que hoje é conhecido como pinça óptica. Essa técnica vem sendo amplamente utilizada por biólogos e físicos no estudo do universo microscópico como, por exemplo, na manipulação de vírus, bactérias e no estudo das propriedades mecânicas de polímeros e biopolímeros [4,5]. Uma das aplicações dessa técnica em física biológica permite manipular moléculas únicas de DNA e extrair suas propriedades mecânicas, sem promover qualquer dano a esta, pois a força exercida por pinças ópticas são da mesma ordem de grandeza de forças produzidas pela mecânica celular [16].

2.1.1 Princípio de funcionamento de pinças ópticas

A técnica conhecida como pinça óptica utiliza um feixe laser, cilíndrico, focalizado por uma lente objetiva de grande abertura numérica. Quando um objeto dielétrico, em nosso caso uma microesfera dielétrica, se encontra sob a influência do feixe laser, como o descrito acima, duas forças passam a atuar sobre o objeto:

- 1) Pressão de radiação.

Ocorre devido à absorção e à reflexão de cada raio que incide sobre o objeto.

2) Força de gradiente.

Ocorre devido à refração dos raios incidentes.

A competição entre estas duas forças dão origem ao fenômeno de pinçamento óptico. Esse fenômeno foi primeiro observado em 1969, nos Estados Unidos, por Arthur Ashkin [8,17].

Para que ocorra o pinçamento, a força de gradiente deve superar a pressão de radiação. Para tal, o índice de refração do objeto a ser pinçado, nesse caso a microesfera dielétrica, deve ser maior que o índice de refração do meio à sua volta.

2.1.2 Estimativa da ordem de grandeza de forças ópticas

Para um único fóton de um feixe de luz carregando momento linear $\vec{p}$, podemos escrever:

$$\left| \vec{p} \right| = \frac{\hbar \omega}{c} = \frac{E}{c} \quad (2.3)$$

Sendo $\hbar$ a constante de Planck normalizada, ω a frequência da onda eletromagnética, c a velocidade da luz no vácuo e E a energia do fóton. Quando um fóton colide paralelo a normal e caso seja refletido pela microesfera a variação do momento linear pode ser calculado por:

$$\left| \Delta \vec{p} \right| = \left| \vec{p}_f - \vec{p}_i \right| = 2p = 2 \frac{E}{c} \quad (2.4)$$

De modo que o momento máximo transferido para a microesfera será igual a $\left| \Delta \vec{p} \right|$ e, considerando que a fonte forneça N fótons por unidade de tempo e com o auxílio da segunda lei de Newton, podemos calcular a força gerada pela pressão de radiação como:

$$\left| \vec{F} \right| = \left| \frac{dp}{dt} \right| = \frac{2}{c} \frac{dE_{total}}{dt} = \frac{2}{c} P_{total} \quad (2.5)$$

Sendo P_{total} a potência total do feixe de luz incidente. Então podemos notar que a força exercida pelo feixe de luz só depende da potência do laser utilizado pela pinça. Podemos ainda verificar se a magnitude dessa força é compatível com as utilizadas em laboratório. Tomando como referência um feixe laser de 1mw, observamos que:

$$F_{total} = \frac{2 \times 10^{-3} \frac{J}{s}}{3 \times 10^8 \frac{m}{s}} \cong 1 pN \quad (2.6)$$

A ordem de grandeza obtida nesse resultado está em conformidade com o observado em pinças ópticas.

As seções a seguir (de 2.2 a 2.4) se referem aos procedimentos de pinçamento óptico considerando o raio da microesferas e o comprimento de onda da luz do laser utilizado.

2.2 Limite da óptica geométrica

As seções 2.2.2 e 2.2.3 mostram o fenômeno de pinçamento sob o ponto de vista da óptica geométrica quando o raio da microesfera é muito maior que o

o comprimento de onda da luz do laser utilizando.

2.2.1 Microesfera situada antes do foco.

Quando a microesfera está em um ponto abaixo do foco (figura 2.1), nesse caso devido ao fato de o laser possuir perfil gaussiano, a microesfera tende a se alinhar ao centro do feixe, onde o laser é mais intenso. Esse alinhamento é proveniente da conservação de momento do sistema. Nesse caso:

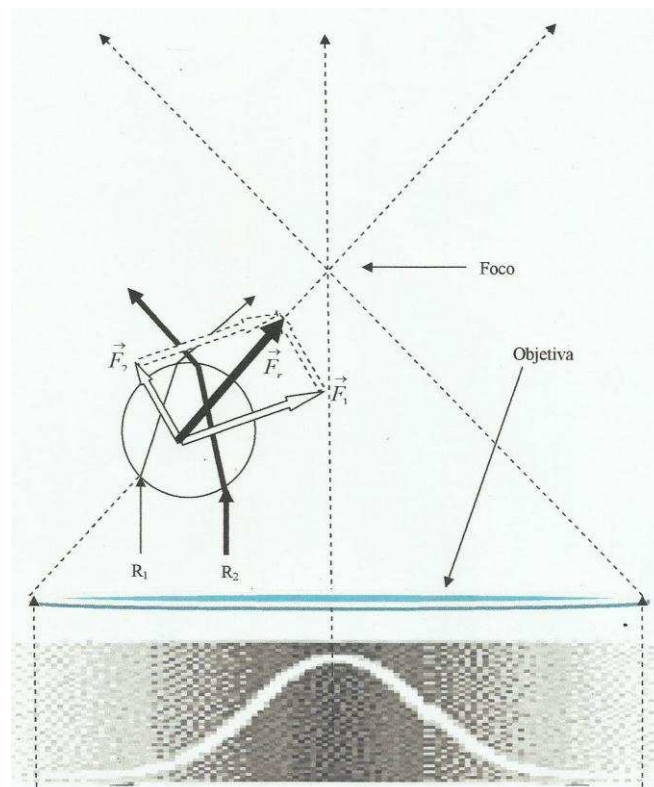


Figura 2.1: Efeito da refração. A microesfera se encontra em uma região abaixo do foco, nesse caso devido à diferença de intensidade entre os raios $R_2 > R_1$ geram sobre está uma força resultante que a empurra em direção ao foco.

O raio R_1 , na parte inferior da microesfera, é refratado ao atravessar a microesfera, deslocando-se um pouco para a direita em relação ao raio incidente. Em virtude disso, uma força ascendente, para a esquerda, surge sobre a microesfera [9,18].

O raio R_2 também sofre refração, do mesmo modo que o raio R_1 , deslocando-se para a esquerda, o que provoca sobre a microesfera uma força ascendente voltada para a direita. Como o raio R_2 é mais intenso que o raio R_1 , a força resultante tende a levar a microesfera para cima e para a esquerda, em direção ao foco do feixe laser [9,18].

2.2.2 Microesfera situada depois do foco

A figura 2.2 mostra o esquema de pinçamento quando a microesfera se encontra depois do foco:

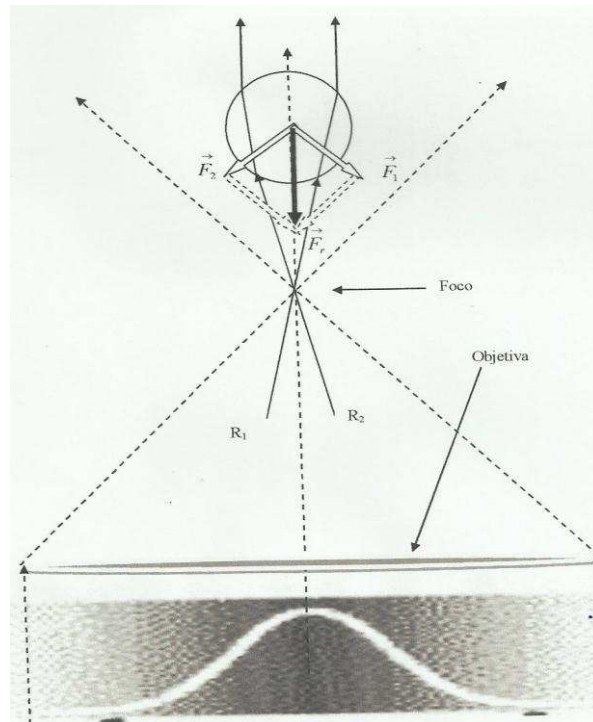


Figura 2.2: Efeito da refração. A microesfera se encontra em uma região acima do foco, novamente o efeito de uma força resultante a empurra para o foco.

Nesse caso as componentes verticais das forças que atuam sobre a microesfera estão voltadas para baixo, promovendo o aprisionamento desta, próximo ao foco do feixe [9,18].

Podemos perceber que cada raio que atinge a microesfera dá origem a um raio transmitido e, devido à refração, uma força de gradiente surge sobre a microesfera deslocando-a para o foco do feixe. Porém, cada raio que incide sobre a microesfera, é também refletido, e o efeito disso provoca o surgimento de uma força chamada de pressão de radiação, que empurra a microesfera na direção de propagação do laser. O esquema é representado na figura 2.3.

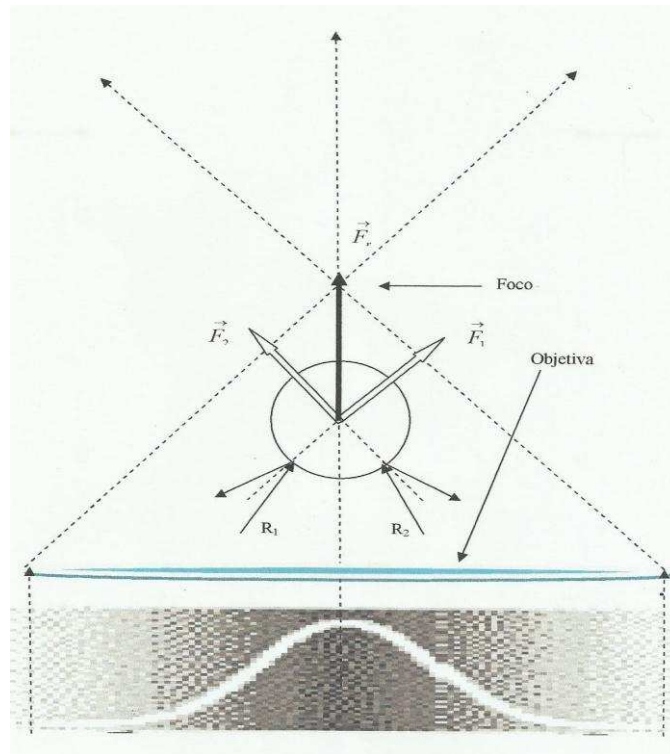


Figura 2.3: Pressão de radiação. A força resultante devido à parte da intensidade de luz refletida pela superfície da microesfera tende a empurrá-la para cima.

A competição desses dois efeitos, força de gradiente e pressão de radiação é a responsável pelo aprisionamento da microesfera [9,18]. E vale a pena salientar novamente que, para que isso ocorra, o índice de refração da microesfera deve ser maior que o índice de refração do meio e, como se trata de uma análise sob o ponto de vista da óptica geometria, o raio da microesfera deve ser muito maior que o comprimento de onda da luz do laser utilizado.

2.3 Limite Rayleigh

Quando o raio da microesfera é muito menor que o comprimento de onda do laser utilizado pela pinça, a microesfera se comporta como um dipolo elétrico induzido. Então a força que atua na microesfera é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico da radiação incidente. Como o feixe de laser é mais intenso na região focal a força resultante move e aprisiona a micro esfera nessa região [19].

2.4 Teoria MDSA

Os limites da óptica geométrica e o limite de Rayleigh representam, em pinças ópticas, os limites assintóticos para os quais ocorre o aprisionamento, quando o raio da microesfera é muito maior ou muito menor que o comprimento de onda da luz utilizada. Porém, em laboratório as microesferas utilizadas possuem raios arbitrários e podendo ser até próximas ao valor do comprimento de onda da luz utilizada. Então, é fundamental que exista uma teoria que preveja o comportamento de força sobre a microesfera de qualquer raio e índice de refração.

A teoria MDSA proposta por Mazolli, Maia Neto, e Nussenzveig [19,20] prevê, baseada na representação de Debye, na teoria de espalhamento Mie e na presença de aberrações esféricas, calcular, teoricamente, as forças axial e transversal que uma pinça óptica exerce sobre uma microesfera, de raio e índice de refração arbitrária [19-21].

2.5 DNA

O código genético foi uma das mais notáveis descobertas da ciência no século XX. Esse código forma os modelos hereditários dos seres vivos. É nele que está toda a informação que rege a sequência dos aminoácidos em proteínas, codificada pelo encadeamento de nucleotídeos [22]. Muitos foram os trabalhos e colaboradores que tornaram essa compreensão possível. Em 1869, um jovem médico suíço de nome Friedrich Miescher isolou do núcleo celular o material genético de leucócitos, uma substância que ficou conhecida como nucleína, a qual foi proposta por Miescher como sendo responsável por transferir as características hereditárias nos seres vivos, o “DNA” (ácido desoxirribonucleico). Naquela época, ninguém foi capaz de compreender esses resultados e Friedrich Miescher faleceu sem ter obtido os merecidos créditos sobre a descoberta da molécula da vida, pois naquela época muitos cientistas acreditavam que as proteínas eram as responsáveis por conter o código genético, já que as proteínas eram formadas por vinte diferentes aminoácidos e a nucleína por apenas quatro bases, sendo por isto considerada simples demais para conter tanta informação sobre as características a serem transferidas [6,23]. Outras contribuições notáveis para a elucidação do código genético foram realizadas por Erwin Chargaff, que formalizou a quantidade de bases nitrogenadas contidas na molécula de DNA. Outra contribuição notável foi a obtenção das primeiras imagens do DNA feitas por difração de raios x, realizadas por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins.

Em 1953, o Biólogo James Watson e o físico Francis Crick fizeram o que para a ciência foi a maior descoberta do século XX: desvendaram a estrutura do DNA e, por esse feito, receberam o prêmio Nobel de Medicina em 1962. A seguir, iremos discutir com mais detalhes a estrutura dessa molécula que carrega consigo o código genético, seus aspectos químicos e biológicos bem, como suas interações com outras substâncias.

2.5.1 Estrutura do DNA

O modelo de dupla hélice proposto para o ácido desoxirribonucleico (DNA) por Watson e Crick em 1953 é formado pela ligação de dois polímeros lineares. São macromoléculas constituídas de monômeros chamados de nucleotídeos. Cada nucleotídeo representado na figura 2.4a é formado por um grupo fosfato (PO_4^{3-}) (figura 2.4b) um açúcar do tipo pentose, nesse caso, a desoxirribose (figura 2.4c) e uma base nitrogenada [2,3].

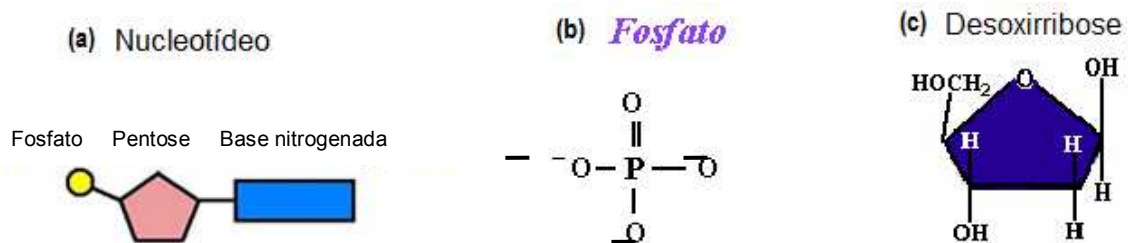


Figura 2.4 Diagrama representando o nucleotídeo. (a) esquema do nucleotídeo, (b) grupo fosfato e (c) desoxirribose. Figura adaptada da referência [24]

Estão presentes no DNA quatro tipos de bases diferentes, as quais diferem cada nucleotídeo em duas purinas: [Adenina (A) e Guanina (G)] e duas pirimidinas [Timina (T) e Citosina (C)]. A figura 2.5 representa a estrutura química de cada uma dessas bases:

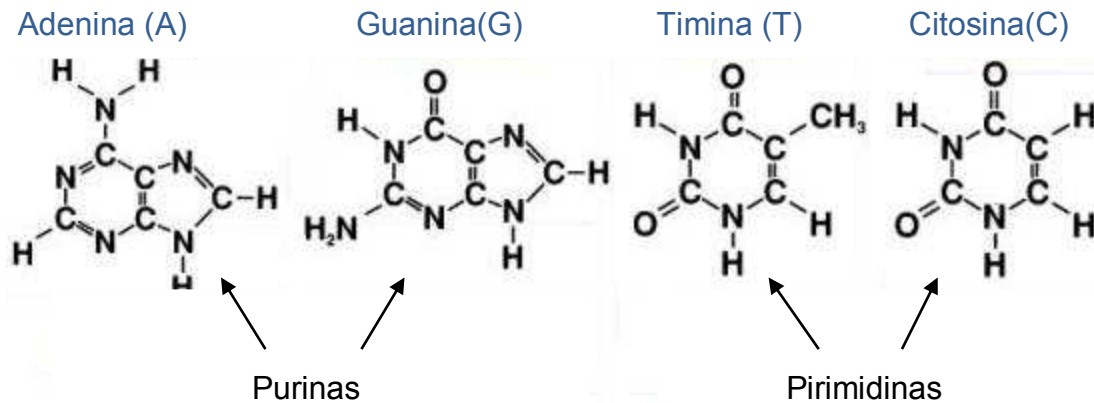


Figura 2.5 Estruturas em anéis das bases nitrogenadas. Figura adaptada da referência [24]

A relação entre as quantidades de pares de bases presentes no DNA foram apresentadas por Chargaff, em 1951, como resultado de uma série de estudos sobre organismos vivos, na qual foi possível concluir que:

- 1) A quantidade de bases purinas é sempre igual à quantidade de bases pirimidinas, ou seja, $(A + G) = (T + C)$.
- 2) A quantidade de timina é igual à quantidade de adenina ($T = A$).
- 3) A quantidade de guanina é igual à quantidade de citosina ($G = C$).
- 4) A quantidade de $(A + T)$ não é necessariamente igual à de $(C + G)$.

A estrutura do DNA proposta por Watson e Crick é formada pela ligação de duas fitas unidas, antiparalelas, obedecendo ao esquema de ligação mostrado na figura 2.6, na qual uma pirimidina se liga a uma purina. Nesse caso, uma timina se liga a uma adenina, e, na sequência, uma citosina se liga a uma guanina. Essa distribuição de pares de bases se repete ao longo de toda a estrutura do DNA e se mantém exatamente igual em todas as células do mesmo indivíduo [7,25,26].

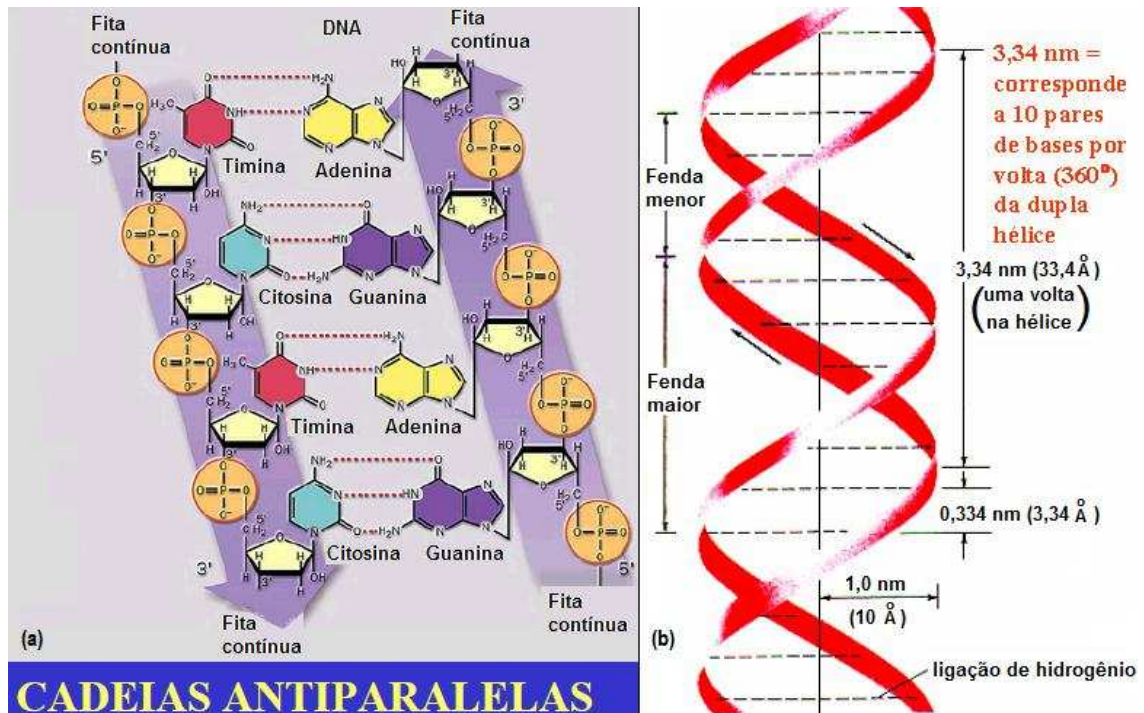


Figura 2.6 Esquema da dupla hélice. Em (a) são mostradas as direções das fitas da cadeia. Em (b) A conformação em dupla hélice, com as fendas menor e maior e as distancias entre as bases. Adaptada do trabalho "Estrutura Molecular dos Ácidos Nucleicos e Replicação do DNA" visualizado em <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAAYTsAF/estrutura-replicacao-dna>.

Por sua vez, cada fita da molécula de DNA é sintetizada através da ligação entre seus nucleotídeos, obedecendo em toda sua extensão ao esquema mostrado pela figura 2.7:

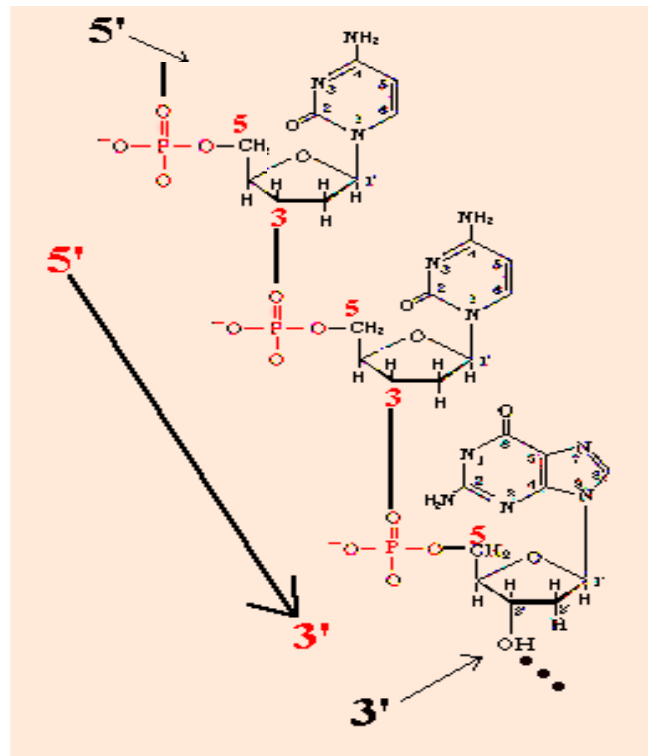


Figura 2.7 Esquema da direção da cadeia. Em 5' carbono livre da primeira pentose e em 3' carbono livre da última pentose. Extraída do trabalho "DNA – Estrutura e Replicação", UFSC disponível no site [http : //www.enq.ufsc.br/labs/probiolisc - eng - bioq/trabalhos - pos2003/genetica/DNA.html](http://www.enq.ufsc.br/labs/probiolisc-eng-bioq/trabalhos-pos2003/genetica/DNA.html).

Essas ligações sempre ocorrem entre um grupo fosfato de um nucleotídeo a ser incorporado à hidroxila da desoxirribose do nucleotídeo anterior, através de ligações covalentes fosfodiéster. No entanto, caso o carbono 5' da pentose do primeiro nucleotídeo estiver voltado para cima, todos os demais nucleotídeos da cadeia estarão na mesma posição, definindo a direção da cadeia como sendo 5' → 3', como visto na figura 2.7. Observa-se ainda que as bases nitrogenadas ligadas ao carbono 1' da desoxirribose, na chamada ligação glicosídica, é livre em um lado da cadeia de fita simples já formada.

Como exemplo, a sequência 5'ATAGCGCGCTTAA...3' representa uma cadeia do modelo apresentado na figura 2.7, onde as letras representam as bases, e as extremidades preenchidas são representadas pelos números dos carbonos envolvidos na ligação [25,26].

A ligação fofosdiéster entre os nucleotídeos das duas fitas da molécula de DNA se encontram posicionadas em direções opostas, uma na direção de $5' \rightarrow 3'$ e a outra na direção $3' \rightarrow 5'$. As bases nitrogenadas são unidas por ligações de hidrogênio. Onde as ligações entre a timina e adenina são realizadas por duas ligações de hidrogênios, já as ligações entre a citosina e a guanina são realizadas por três ligações de hidrogênio. O diâmetro uniforme exibido pela dupla hélice do DNA é decorrente do fato de a timina e a adenina, ocuparem um espaço igual aos dos pares de bases citosina e guanina em toda a sua extensão.

Cada par de bases que compõem a estrutura do DNA é separada por uma distância de 0,34 nm, a cada 10,1 pares de bases a molécula de DNA rotaciona em uma volta completa sobre seu próprio eixo, o que, por sua vez, gera um par de fendas conhecidas como fenda menor e fenda maior [7,9,25,26] como mostrado na figura 2.6b. O comprimento da molécula de DNA está relacionado com a quantidade de pares de bases em sua estrutura [27].

2.5.2 Desnaturação e renaturação do DNA

Desnaturação (melting) é o processo no qual a molécula do DNA dupla fita se abre em duas fitas simples. Em condições fisiológicas a estrutura de dupla hélice é bastante estável, (*in vivo*). O processo de desnaturação (separação da dupla fita) é realizado por enzimas como a polimerase e a DNA helicase. Esse fenômeno permite que a molécula de DNA seja replicada. A dissociação (desnaturação) da molécula de DNA pode também ser obtida por processos físicos e químicos. O rompimento das ligações de hidrogênio pode ser conseguido submetendo-se a molécula de DNA à elevação de temperatura ou pondo-a em contato com substâncias ácidas e/ou álcalis de pH extremo.

Renaturação (annealing) é o processo no qual as duas fitas da molécula de DNA se recombinam, quando submetidas a condições adequadas havendo-se formação das ligações de hidrogenio.

Os processos de desnaturação e renaturação tornam possível a replicação do DNA e garantem que cada nova molécula contenha uma parte da molécula original. Esse processo é dito como semiconservativo, e possibilita a manipulação do DNA *in vitro*. O grau de desnaturação da molécula de DNA pode ser obtido medindo-se a quantidade de energia absorvida no momento no qual a molécula é exposta a luz ultravioleta. Em seu estado natural, o pico de absorbância da molécula de DNA é em 260 nm, mas, quando desnaturado, esse pico sofre uma alteração, chegando a ser 37% maior em intensidade. Esse fenômeno se deve ao rompimento das ligações de hidrogênio de suas bases [9,22].

2.5.3 Classificação do DNA

A molécula de DNA pode assumir diferentes conformações, dependendo da composição de bases e meios em que se encontra [9,24]. Os tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas são: A-DNA, B-DNA e Z-DNA, que se diferem pelo modelo de dupla hélice e sentido de giro da dupla hélice das moléculas. A figura 2.8 mostra o aspecto dessas moléculas.

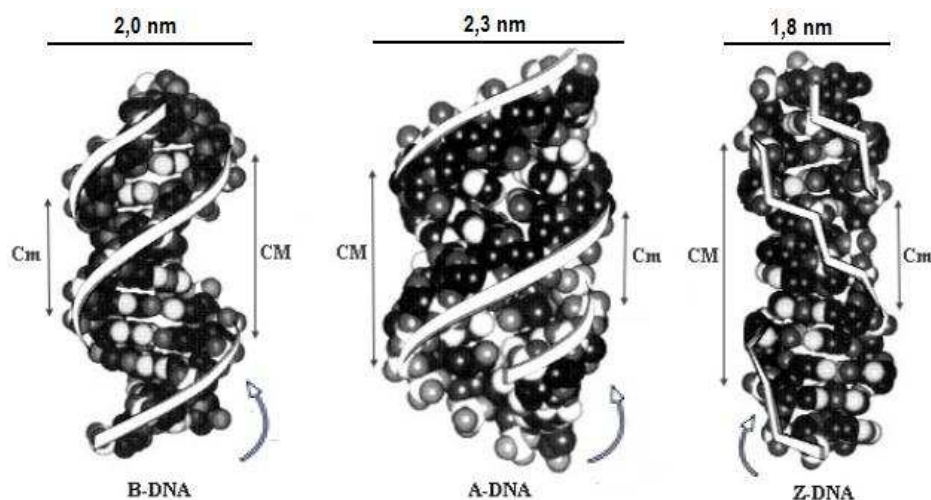


Figura 2.8 Tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas. Adaptada da referência [18,22].

As regras de pareamento discutidas anteriormente se aplicam a todas as formas de moléculas de DNA, bem como as informações contidas nas sequências de bases. A configuração mais comum de molécula de DNA encontrada na natureza é a do B-DNA. Tendo sua estrutura como a descrita por Watson e Crick, é encontrada em condições de alta umidade, cerca de 92%. Em solução, sua dupla hélice gira no sentido anti-horário e a distância entre os pares de bases adjacentes é igual a 0,34 nm. Sendo assim, a cada 10.1 pares de bases, a hélice completa um giro sobre seu eixo e, por fim seu diâmetro possui apenas 2,37 nm [24,28].

A configuração do tipo A pode ser obtida ao submetermos o B- DNA à desidratação, em 75% de etanol ou, se o conteúdo de sal na solução for diminuído, a molécula que originalmente era mais longa e fina se torna mais curta e espessa, sua fenda maior torna-se mais estreita e profunda e a fenda menor torna-se mais rasa e larga. Nessas condições, a distância entre as fendas consecutivas é de 2,6 nm de comprimento, ou seja, 11 pares de bases. Esse tipo de DNA normalmente não é encontrado em condições fisiológicas [9,24,28].

A estrutura de dupla hélice do Z-DNA gira no sentido horário. E foi encontrada inicialmente em oligonucleotídeos, e denominada Z devido a sua aparência de ziguezague. O Z-DNA é mais longo e fino que o B-DNA. A estrutura possui 12 pares de bases entre fendas consecutivas, cerca de 4,56 nm, e seu diâmetro é de apenas de 1,84 nm. A fenda maior é tão rasa que quase desaparece, ao passo que sua fenda menor se torna curta e profunda.

Além dessas configurações, o DNA pode também ser encontrado em forma de fita única. Esse faz parte da estrutura biológica de seres mais primitivos, como alguns vírus e bacteriófagos.

Neste trabalho, utilizamos um DNA do tipo B-DNA do bacteriófago λ (vírus que infecta bactérias). Esse material genético é extraído de um vírus que infecta a bactéria *Escherichia coli*.

2.5.4 DNA do bacteriófago λ

O DNA do bacteriófago λ possui comprimento de contorno (L_c) (comprimento médio ponta a ponta) da ordem de $16,5\mu\text{m}$, embora seja possível encontrar L_c com desvio médio de até 30%. Uma única molécula do DNA do bacteriófago λ possui cerca de 48.500 pares de bases. Graças a essas características, o DNA do bacteriófago λ se torna a escolha mais acertada para nossos experimentos [9,26,29].

2.6 Mecânica de polímeros

O ácido desoxirribonucleico faz parte de uma família de polímeros classificada como semi-flexível, onde cada nucleotídeo que o compõe é uma unidade básica chamada de monômero. Esta molécula (DNA) possui cargas elétricas negativas em excesso em sua estrutura devido a grande quantidade de grupos fosfatos. Fatores como choques das moléculas com o meio, devido à agitação térmica, elasticidade intrínseca da molécula e repulsão eletrostática entre os grupos fosfatos da cadeia, determinam as configurações conformacionais adquiridas pela molécula de DNA quando em solução. Para que ocorra a condensação da molécula de DNA cerca de 90% dessas cargas elétricas de sua estrutura devem ser neutralizadas. Porém somente a neutralização não é fator predominante para que a condensação aconteça, por exemplo, se uma molécula de DNA condensada contiver 40.000 pb, terá 80.000 fosfatos negativos, e cerca de 8000 cargas elementares livres após 90% de neutralização. Esta quantidade de carga livre restante concentrada em uma partícula de alguns angstroms de raio (quando a molécula apresenta condensada) irá gerar uma poderosa força eletrostática repulsiva [10]. Então, como ocorre a condensação cátion induzida da molécula de DNA? Quando moléculas catiônicas de cargas 3^+ ou superior interagem com a molécula de DNA neutralizam 90% das cargas negativas de sua estrutura como já discutido acima. E as atrações geradas por flutuação de íons correlacionados garantem a estabilidade do condensado formado. Estas flutuações são devido ao carácter pseudo-bidimensional da

distribuição de contra-íons que se encontram muito perto da superfície do DNA altamente carregado. A Repulsão de Coulomb entre estes íons móveis, adsorvido sobre a superfície conduz a um reticulado iônico bidimensional [10]. Nesse caso quando dois segmentos da molécula de DNA da superfície aproximam cada vez mais perto, as cargas dos segmentos se ajustam de forma a complementar as cargas positiva com as cargas opostas (negativas), levando a uma atração entre os segmentos da fita do DNA o que mantém a molécula condensada [10]. Já para modificar a conformação de uma cadeia polimérica é necessário submetê-la a uma força que tende a deformá-la. O modelo de energia associado à deformação do polímero, e o cálculo de forças às quais a cadeia pode ser submetida são encontrados nas referências [9,25,28,30,31].

2.7 Interação DNA- ligante

Nesta seção iremos apresentar as principais características do processo de interação dos ligantes: brometo de etídio e espermina, com a molécula de DNA. Embora a literatura já relate resultados referentes a estas interações eles se referem a experimentos realizados em moléculas que se encontram dispersas em soluções. Como parte do tempo o DNA se encontra compactado no interior da célula, pouco se conhece sobre o comportamento dessas interações com o DNA compactado [27].

Começamos, então, com um breve comentário a respeito das interações DNA-ligante. Em seguida, discutiremos as características dos ligantes, brometo de etídio e espermina e suas interações com o DNA. Finalizaremos apresentando os fatores que tornam relevantes a pesquisa apresentada.

2.7.1 Interações

Quando um composto químico (ligante) é colocado em solução, na presença de uma molécula de DNA, esse composto interage com a molécula e, dependendo da natureza química do ligante, alguns tipos de interações são possíveis:

- a) Ligação com a fenda maior da molécula de DNA (Exemplo: interação do DNA com o peptídeo α -helical) [9,32].
- b) Ligação com a fenda menor da molécula de DNA (Exemplo: interação DNA com a distamicina-A) [9,32].
- c) Ligação covalente com as bases da molécula de DNA (Exemplo: interação DNA com a cisplatina) [33-35].
- d) Intercalação, nesse caso o ligante se acomoda entre os pares de base da molécula de DNA (Exemplo: interação DNA como o EtBr).

2.7.2 Brometo de Etídio.

O composto químico brometo de etídio (EtBr) (figura 2.9a), é um corante fluorescente não radioativo, de fórmula molecular $C_{21}H_{20}N_3Br$, muito utilizado em laboratórios de biologia molecular como marcador de DNA para uso em processos de eletroforese em gel de agarose [36]. É um agente intercalante que, ao ser exposto à luz ultravioleta (figura 2.9b), emite uma luz vermelho-alaranjada que após ter-se unido a uma cadeia de DNA, fica cerca de 20 vezes mais intensa. Esta substância possui um poderoso efeito mutagênico e, possivelmente, pode ser cancerígena ou teratogênica.

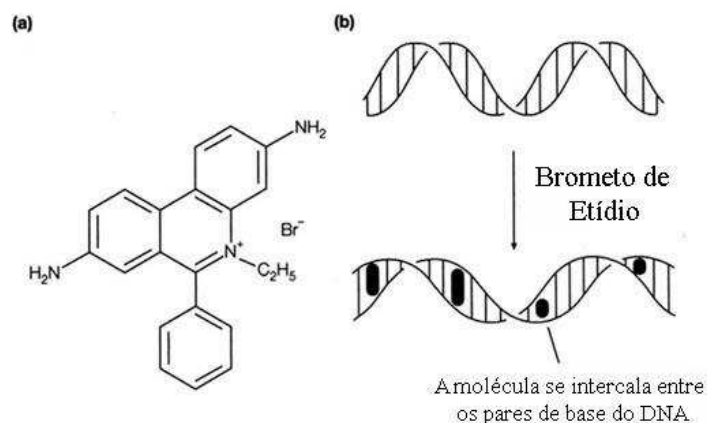


Figura 2.9: a) Estrutura química da molécula de Brometo de Etídio b) Modificação da conformação da molécula de DNA devido ao processo de intercalação do EtBr. Figura adaptada da referência [35]

A intercalação do brometo de etídio com a molécula de DNA causa alteração na massa, comprimento e rigidez da molécula, a quantidade de moléculas de EtBr intercalada na molécula de DNA depende da concentração iônica da solução aquosa. Sua constante de ligação intrínseca K_i (constante química intrínseca de associação) depende da concentração de Na^+ na solução [37]. O composto DNA-brometo de etídio se caracteriza estruturalmente por promover um aumento de 0,34 nm entre a distância de pares de bases e uma rotação de 26° por molécula intercalada [36], no sentido de desfazer a dupla hélice da molécula de DNA. Esses fatores, por sua vez, causam modificações no comprimento de contorno (L_c) (comprimento médio ponta a ponta) e no comprimento de persistência (A) (medida da quantidade de dobras da molécula em equilíbrio).

2.7.3 Espermina.

A espermina, como a espermidina, a diaminobutano, diaminopropano e a etilenodiamina são moléculas pertencentes à família das poliaminas.

As poliaminas são moléculas que apresentam grupamentos amino separados por cadeias metilénico-hidrofóbicas, e em geral, apresentam baixa massa molecular e considerável solubilidade em água. São essenciais para o crescimento e para as funções normais das células. Essas moléculas apresentam importante papel no crescimento, proliferação e síntese de proteínas e ácidos nucleicos [37,38].

As primeiras descobertas sobre as poliaminas datam do ano de 1678, por Antonie Van Leeuwenhoek que isolou alguns cristais do sêmen humano. Mas somente em 1924 foi possível deduzir a fórmula empírica desses cristais e só dois anos mais tarde foram sintetizados *in vitro*. As primeiras poliaminas descobertas foram a espermina e a espermidina. Estudos recentes mostram que essas poliaminas apresentam papel fundamental na espermatogênese [37].

As poliaminas (espermidina e espermina) são importantes ligantes encontrados em quase todas as espécies vivas. Em pH fisiológico, essas moléculas são positivamente carregadas no grupamento amino primário e secundário. Assim são dominantes as interações eletrostáticas através do grupamento catiônico amino e as interações hidrofóbicas, através dos grupamentos metilênicos.

Uma molécula de espermina é mostrada na figura 2.10 e possui a fórmula química:

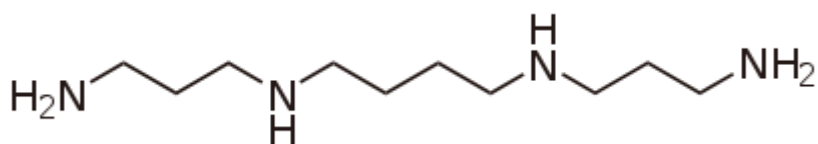


Figura 2.10: Estrutura química da molécula de Espermina.

2.7.4 Interação intercalante-DNA-condensante

Como é de nosso conhecimento, toda matéria encontrada na natureza é composta de um arranjo bem elaborado de elementos químicos que se unem de forma natural ou artificial e dão origem a todas as estruturas orgânicas ou inorgânicas. Inclusive as categorias dos seres vivos, com uma enormidade de variações, podendo ir de um simples ser unicelular, como uma bactéria, até seres pluricelulares, como a grande classe de mamíferos. De modo geral todos esses seres são susceptíveis a mudanças em sua estrutura, causadas por agentes externos, o que pode ocorrer de forma natural (como a degradação do organismo causada por uma doença) ou artificial (como ocorre quando os organismos são expostos a uma fonte intensa de radiação ou entram em contato com alguma substância nociva, como no caso de algumas drogas). Porém, não são todas as drogas que são nocivas aos seres vivos. Na verdade, algumas são utilizadas em tratamento de diversas doenças como câncer por exemplo. Os efeitos de algumas substâncias que atuam em organismos vivos não são totalmente compreendidos pela ciência.

A biofísica de polímeros e polieletrólitos compõe um campo interdisciplinar de pesquisa que visa, entre outras coisas, entender as variações conformacionais de moléculas orgânicas quando expostas a substâncias químicas. Este campo do conhecimento tem fornecido importantes descobertas nas últimas décadas [40]. Nesse trabalho, estudamos os efeitos sofridos por uma molécula de DNA causados por dois ligantes bem conhecidos em laboratórios de pesquisa, brometo de etídio já citado anteriormente e a espermina, também mencionada no tópico 2.7.3. A literatura atual contém uma grande quantidade de trabalhos relacionados à interação desses ligantes com a molécula de DNA. Então, qual a relevância desse trabalho para o meio científico e para a sociedade? A interação do DNA com a espermina causa a condensação da molécula, formando minúsculos condensados de DNA que apresentam forma toroidal, globular ou de bastonete [41-43]. Essas estruturas são muito semelhantes às configurações adquiridas por moléculas de DNA quando *in vivo*, onde permanecem pela maior parte do tempo. A compreensão dos efeitos desses ligantes sobre as propriedades mecânicas do DNA, quando nestas configurações, são por si só motivação suficiente para a realização desse trabalho. Além disso, outras áreas de pesquisas se interessam pela compreensão desse estado adquirido pela molécula de DNA, tais como: a bioquímica, a biologia

molecular e, em especial, a medicina, através das quais esse conhecimento pode ser utilizado em terapia gênica para tratamento de algumas doenças. Como a maior parte dos trabalhos envolvendo interações DNA-ligante, foi realizada utilizando DNAs dispersos em soluções, existem poucos estudos [11-13] preocupados em caracterizar interações DNA-ligantes em moléculas de DNA condensadas. Assim, a caracterização de medicamentos com moléculas de DNA condensadas podem trazer novas e fundamentais informações para as ciências básicas, bem como aplicações práticas em tratamento de doenças humanas, como quimioterapias do câncer e terapia gênica.

2.8 Eletroforese

A eletroforese é uma técnica experimental muito utilizada em experimentos em que é necessária a separação de elementos químicos contidos em uma solução. Essa técnica foi descoberta e empregada pela primeira vez em 1937 por Arne Tiselius, um bioquímico sueco que por esse trabalho recebeu o prêmio Nobel em 1948 [44,45]. É uma técnica muito utilizada em análises de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Essa teoria de separação de elementos químicos se baseia na teoria de Debye-Hückel-Onsager. Nas técnicas de eletroforese partículas carregadas se movem sob a influência de forças eletrostáticas geradas por um campo elétrico produzido por dois eletrodos de cargas opostas alimentadas por uma diferença de potencial constante.

Nessa técnica experimental são utilizados suportes à base gel para conter as amostras. Sendo mais viável a utilização de suportes de gel de poliacrilamida, para proteínas, e agarose, para os ácidos nucleicos. Mais detalhes, consultar referência [45-47].

O experimento, a grosso modo, pode ser dividido em três etapas :

- 1- A amostra contendo as macromoléculas devidamente preparadas (o que será descrita no capítulo três) é distribuída em poços ou cavidades criadas no suporte de gel.
- 2- O suporte contendo a amostra é fechado em uma câmara e submetido a um campo elétrico produzido por uma fonte de tensão.
- 3-A amostra é revelada em um transiluminador.

Capítulo 3

Técnicas experimentais e preparação da amostra

Neste tópico, apresentaremos o aparato usado em nosso experimento. Faremos a descrição dos aparelhos utilizados em pinça óptica, seguida da apresentação dos procedimentos utilizados na preparação da amostra e do microscópio. O mesmo será feito no caso do experimento de eletroforese. E, por último, faremos a descrição do processo experimental.

3.1 Pinça óptica.

Para a realização de nosso experimento, nosso laboratório conta com:

Um microscópio invertido Nikon Ti-S, com objetiva de ótica corrigida no infinito, aumento de 100X e abertura numérica $NA = 1,4$.

Um laser de fibra dopada com itérbio (IV) que tem a emissão estimulada por um aparelho IPG Photonics YLR-5-1064-LP, que o envia em perfil gaussiano e formato cilíndrico com um comprimento de onda $\lambda = 1,064\mu\text{m}$, potência máxima de 5,8W e operando no modo TEM00.

- Um conjunto de espelhos.
- Duas câmeras CCD.
- Um monitor.
- Um computador.

A figura 3.1 representa, em sequência, as ligações entre os equipamentos usados em nossos experimentos.

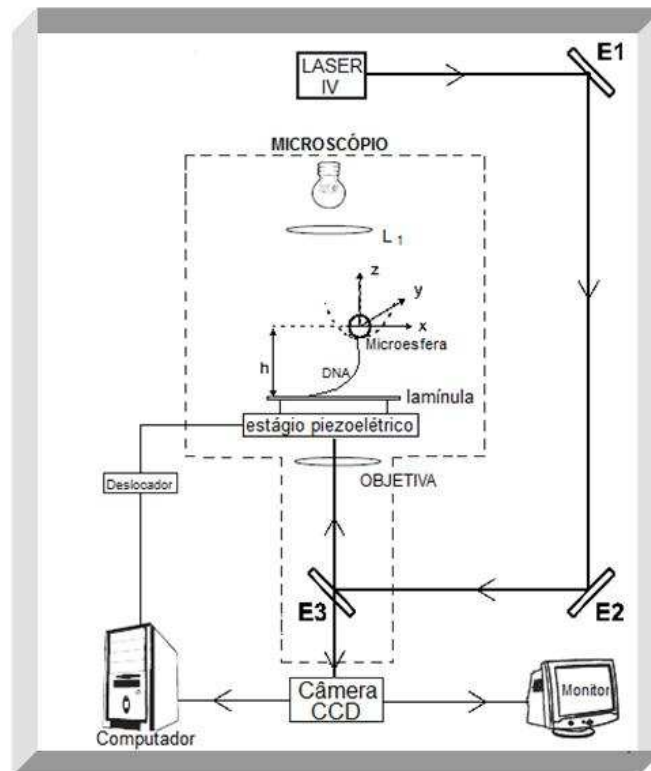


Figura 3.1: Montagem Experimental. Figura adaptada da referência [24]

A emissão do laser passa por um conjunto de espelhos que possibilitam o alinhamento desde a fonte até a entrada do microscópio (Entre as linhas pontilhadas, esquematizamos o microscópio).

O laser chega ao microscópio pelo espelho dicróico E3 de alta transmitância para a luz visível e alta refletância para a radiação infravermelha. Deste espelho temos uma saída para duas câmeras CCD que, por sua vez, possuem saídas para o monitor de visualização do experimento e para o computador, permitindo assim o acompanhamento e o armazenamento dos dados.

Após atravessar a objetiva, o feixe infravermelho se torna cônico, dando origem a uma região focal onde um poço potencial aprisiona uma microesfera dielétrica.

O computador controla o estágio piezoelétrico (Physik Instrumente, P-545. 3C7PI Nano) de movimentação, através de um deslocador que faz o controle de deslocamentos e velocidades com precisão nanométrica. A lente L1 representa o condensador do sistema de iluminação que ilumina o porta-amostra de trabalho, aqui representado pela lamínula. No porta-amostra está contida nossa solução aquosa com DNAs e microesferas.

3.2 Preparação da amostra para análise através de pinça óptica

O protocolo consiste na preparação da amostra utilizando-se a seguinte ordem de preparação e mistura de substâncias:

Em um eppendorf, adicionamos 3 μL de solução-estoque de microesferas de poliestireno de 3,0 μm de diâmetro (Bangs Labs), revestidas com estreptavidina (proteína que possui grande afinidade a se ligar com a biotina) previamente agitadas por um agitador elétrico. Em seguida, misturamos 2 μL de solução, contendo moléculas de λ -DNA (New England Biolabs) biotinilado (a concentração de DNA por pares de bases usadas em todas as experiências foi de $C_{bp} \sim 1,94 \mu\text{M}$), previamente misturadas por uma pipeta e colocadas em banho térmico à temperatura de 37°C por uma hora. Após esse tempo, adicionamos, no mesmo eppendorf 3 μL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e, completamos a solução com 92 μL , de tampão PBS (solução de fosfato salina) com pH = 7,4 e novamente encubamos a 37°C por mais 15 minutos.

3.3 Preparação do porta-amostra

A preparação do porta-amostra ocorre simultaneamente à preparação da solução de DNA. Este é composto por uma lamínula de vidro limpa com um pincel seco que a percorre em um mesmo sentido, passando no máximo três vezes (a fim de evitar eletrização por atrito) em seguida um o-ring de borracha é afixado nela com o uso de parafina derretida.

Uma solução de BSA (Albumina de soro bovino) biotinilada é colocada no interior do o-ring, e então aguardamos por 30 minutos. Em seguida, retiramos a solução de BSA e injetamos uma solução de tampão A (solução que contém sais monovalentes e magnésio), que deve ser retirada logo. Em seguida, adicionamos no interior do o-ring uma solução de estreptavidina e aguardamos por mais 30 minutos. Após esse intervalo, lavamos novamente com o tampão A e deixamos secar. O tempo de secagem pode ser reduzido se a mesma estiver sob a influência da luz emitida pelo microscópio. Nesse protocolo os sais de magnésio promove a ligação da BSA à lamínula de vidro, como a BSA é biotinilada, a biotina se liga à estreptavidina a qual aguarda outra biotina proveniente da molécula do DNA.

3.4 Preparação do Microscópio.

O microscópio utilizado nesse experimento é preparado colocando-se uma gota de óleo sobre a lente e, em seguida, colocando-se a lamínula preparada anteriormente, de modo que haja contato entre a lente, o óleo e a lamínula. Então, deixamos secar sob a influência da luz do microscópio. Após a secagem, surgem formações irregulares e formas que lembram cristais sobre a superfície da lamínula. Isso indica um bom revestimento de estreptavidina sobre a superfície do vidro.

3.5 Procedimento experimental

Nesta seção iremos descrever o procedimento usado para a obtenção dos dados que nos permitiram correlacionar as propriedades mecânicas da molécula de DNA antes e depois de acrescentarmos os ligantes: brometo de etídio e espermina.

3.5.1 Preparando o Experimento

Após o preparo da amostra e da lamínula no microscópio, colocamos a solução de DNA-microesferas no interior do o-ring. Aguardamos 20 minutos para que as condições favoráveis ao experimento ocorram. A figura 3.2 representa algumas das configurações de interações possíveis entre o DNA, a microesfera e a lamínula.

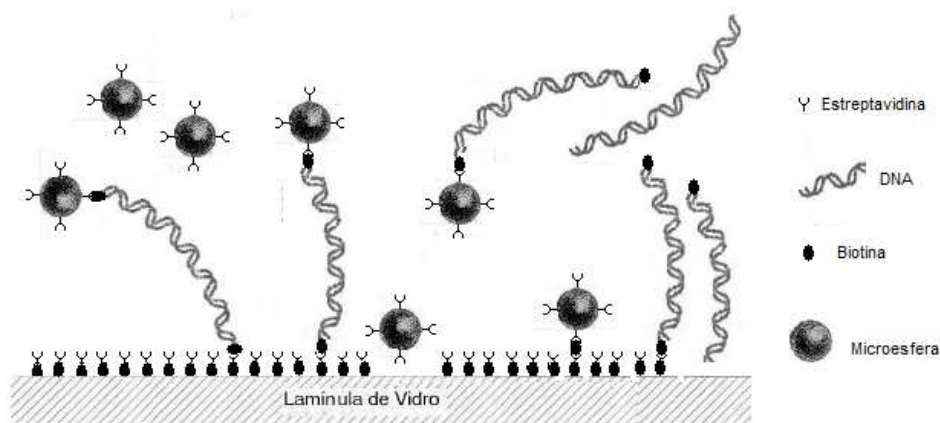


Figura 3.2: Possíveis configurações existentes em uma amostra. Figura adaptada da referência [9]

Em uma amostra, várias configurações são possíveis, das quais podemos citar: DNA isolado, DNA aderido à lamínula, microesferas de poliestireno aderidas à lamínula, DNA com uma ponta aderida à microesfera, mas com a outra ponta solta, além da situação que realmente nos interessa que é uma ponta do DNA ligada na microesfera de poliestireno assim como a outra ponta ligada na lamínula de vidro.

Decorridos vinte minutos, começamos a procurar um conjunto microesfera-DNA-lamínula em condições, para realizar o estiramento. Primeiro movemos as regulagens do piezo nos eixos X e Y, até encontramos uma microesfera que esteja exibindo movimento browniano. Isso garante que a microesfera não está colada no fundo da lamínula. Em seguida movemos o laser até o ponto onde se encontra a microesfera e ajustamos o ponto focal sobre ela, a fim de aprisioná-la em um poço de potencial. Após arrastamos a micro esfera, movendo os estágios do microscópio. Nesse caso, duas situações são possíveis:

(i) A microesfera é arrastada por uma distância maior que a esperada para o comprimento de contorno do λ -DNA permanecendo presa ao poço potencial sem se soltar. Então a microesfera se encontra totalmente livre, sem estar ligada ao DNA, ou ligada ao DNA, mas este não ligado à lamínula.

(ii) A microesfera é arrastada e se solta do poço potencial quando a distância percorrida pelo piezo se aproxima do comprimento de contorno do λ -DNA, e a mesma volta para o ponto de origem, como se estivesse presa a uma mola.

Caso a situação dois ocorra, ainda é necessário verificar se apenas um único DNA está preso à microesfera. Para tal, movemos a microesfera em várias direções e comparamos as medidas encontradas. Note que durante o processo de procura e avaliação das condições do sistema não conseguimos ver a molécula de DNA. Logo, esse método de procura só é possível através da avaliação do conjunto, sendo esse método denominado de procura indireta. Embora isso não garanta que somente uma molécula de DNA esteja presa, é o melhor e mais forte indício que temos.

3.5.2 Realizando o Estiramento

Encontrado o sistema que satisfaz as condições do experimento, começamos por posicionar a pinça sobre a microesfera que, nesse momento, deve estar sobre uma posição de equilíbrio. Com a microesfera presa novamente ao poço potencial ligamos simultaneamente o equipamento de filmagem e o mecanismo que faz mover (piezo) o estágio do microscópio. Em nosso experimento, o estágio do microscópio se desloca em velocidade constante igual a 100nm/s.

A figura 3.3 ilustra a situação relatada anteriormente.

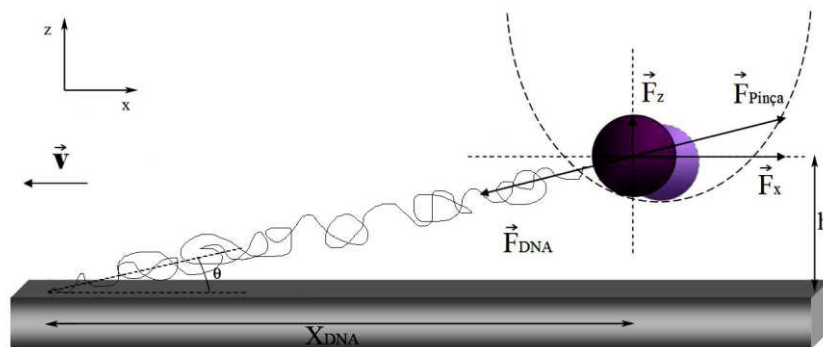


Figura 3.3: Esquema de realização do experimento. Como a velocidade de deslocamento é pequena a força sobre a microesfera tem modulo igual às forças que atuam sobre a pinça e pelo DNA. Figura adaptada da referência [9]

Como a velocidade de deslocamento do estágio do microscópio é muito baixa, podemos desprezar as forças de Stokes que atuam sobre a microesfera e tratar a configuração como sendo quase estática. Esse fato garante que a molécula passe por cada configuração de equilíbrio durante o estiramento. Podemos assim concluir que a força óptica é igual, em módulo, à força exercida pela molécula de DNA ao puxar a microesfera para fora do poço de potencial. Quando a microesfera volta à posição de equilíbrio, repetimos novamente o procedimento descrito acima, para que possamos avaliar as condições mecânicas do conjunto. A força imposta pela pinça sobre a molécula de DNA é mensurada através da análise da filmagem do experimento feito pela câmera CCD. Para medi-la, começamos por determinar a

posição do centro de massa da microesfera, como uma função do tempo $X_{(t)}$. Conhecendo a posição inicial $X_{(0)}$ da microesfera, quando ela está no fundo do poço de potencial, podemos calcular a mudança de posição da microesfera, em função do tempo, por:

$$\Delta X_{(t)} = X_{(t)} - X_{(0)} \quad (3.1)$$

Então a força que o DNA exerce sobre o sistema pode ser escrita por:

$$F(X_{(t)}) = -k\Delta X_{(t)} \quad (3.2)$$

Sendo k a constante de força da pinça.

A figura 3.4 mostra o gráfico típico de força por extensão, para a molécula de DNA que pode ser obtida com esse procedimento.

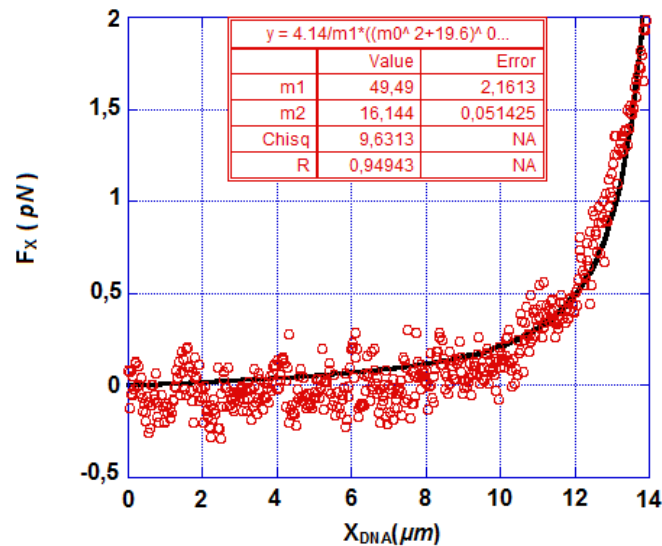


Figura 3.4: Gráfico típico contendo a relação da componente x da força pela extensão da molécula DNA em sua forma nativa. Figura adaptada da referência [24]

Através da figura 3.4, podemos observar que o comprimento z , da molécula, pode ser escrito como:

$$z = \sqrt{X_{\text{DNA}}^2 + h^2} \quad (3.3)$$

E as forças que atuam ao longo do eixo X , como:

$$F_x = F \cos \theta = F (X_{\text{DNA}} / z) \quad (3.4)$$

Agora, podemos determinar a força imposta pela molécula em função da direção de deslocamento do estágio do microscópio, utilizando a equação de força por extensão, dada para o modelo WLC, corrigida por Marko e Siggia:

$$F_x = \frac{K_b T}{A} \left[\frac{\sqrt{X_{\text{DNA}}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{X_{\text{DNA}}^2 + h^2}}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{X_{\text{DNA}}}{\sqrt{X_{\text{DNA}}^2 + h^2}} \quad (3.5)$$

Utilizando o procedimento descrito acima, obtivemos medidas de comprimento de contorno $L_c = (16,5 \pm 1) \mu\text{m}$ e comprimento de persistência $A = (50 \pm 3) \mu\text{m}$. Os resultados obtidos com esse procedimento possuem grande semelhança com os encontrados na referência [48].

3.5.3 Procedimento utilizando brometo de etídio e espermina

Definidos todos os parâmetros iniciais de nosso experimento, Começamos utilizando os ligantes de interesse.

Primeiro, definimos as concentrações de brometo de etídio utilizadas em cada experimento, variando entre uma solução contendo 10 μM de EtBr em PBS com pH 7.4 a uma solução contendo 50 μM de EtBr em PBS com pH 7.4.

Para espermina utilizamos as seguintes concentrações:

- Espermina (SPM^{4+}) a uma concentração 100 μM .
- Espermina (SPM^{4+}) a uma concentração 100 μM .

Esse experimento foi realizado em duas etapas:

Na primeira etapa, usamos uma micropipeta para extrair o maior volume possível de solução, inicialmente contida no o-ring, sendo esta substituída pelo mesmo volume de solução contendo EtBr e aguardamos 20 minutos para que a solução entrasse em equilíbrio. Em seguida, realizamos o procedimento de procura por sistemas favoráveis ao estiramento, como o descrito na secção 3.5.2.

Após esse protocolo, utilizando novamente a micropipeta, realizamos o mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior para substituir parte da solução contida no o-ring por outra, contendo SPM^{4+} e também EtBr na mesma concentração da amostra retirada, seguindo o mesmo princípio já mencionado. A figura 3.5 ilustra o procedimento descrito.

Nesta fase é necessário esclarecer que a solução substituída no o-ring é preparada utilizando as alíquotas de espermina já mencionadas misturadas em solução idêntica às quais foram retiradas na etapa anterior.

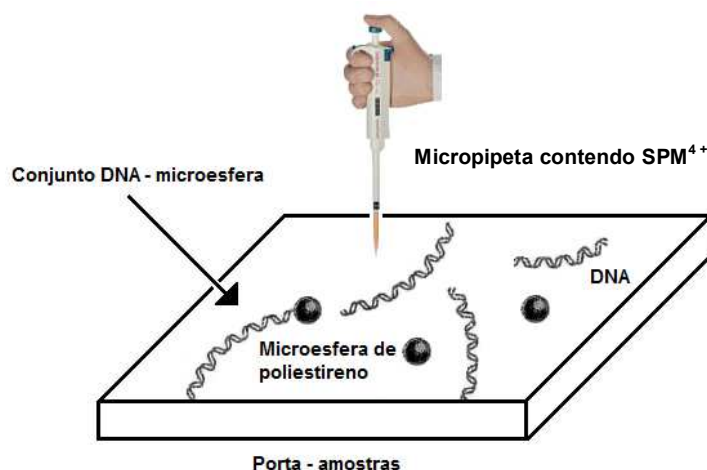


Figura 3.5 Ilustração do procedimento de troca de alíquotas. Figura adaptada da referencia [48]

A segunda fase do experimento consiste em inverter a ordem em que as soluções são adicionadas. Primeiro, adicionando a solução contendo SPM^{4+} . Após o equilíbrio adicionando, a solução contendo EtBr e SPM^{4+} à mesma concentração da solução retirada e, de modo semelhante ao descrito no parágrafo anterior. Os resultados obtidos para os dois casos serão apresentados no próximo capítulo.

3.6 Aparelho de Eletroforese

O aparato usado para o experimento de eletroforese figura 3.6 conta com:

- Uma câmara horizontal de 12 cm x 12 cm (Modelo DGH12, DiGel).
- Uma fonte de alimentação contínua de 0-250 volts (Modelo 250, Gibco BRL Life Technologies).
- Um transiluminador com uma câmera acoplada do tipo CCd, de 2.0 megapixel.
- Uma fonte de iluminação Epi-UV (L-Pix, Loccus Biotecnologia).

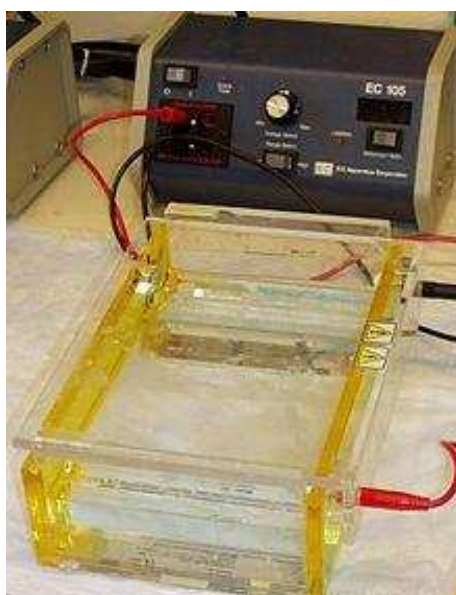


Figura 3.6: Foto ilustrativa do equipamento de eletroforese. Onde é mostrada uma cuba para amostra e uma fonte de alimentação com voltagem ajustável. Figura retirada do site http://pt.wikipedia.org/wiki/Eletroforese_em_gel

3.6.1 Preparação da Amostra

O experimento utilizando em eletroforese segue o mesmo princípio de preparação de amostra utilizado no experimento realizado em pinça óptica e espectroscopia de força. O motivo para utilizarmos o mesmo procedimento de preparação de amostra foi o de caracterizar a interação DNA-ligante por dois métodos diferentes. Esse tipo de caracterização usando dois métodos de análise distintos não havia sido relatado anteriormente pela literatura.

3.6.2 Preparação do porta-amostra para eletroforese

O gel de agarose é preparado misturando-se 64 mL de água deionizada, 16 ml de TAE (Tris-Acetato de EDTA) 10x solução tampão e 960mg de agarose (1,2% em massa), despejando-se tudo em um molde que contém 24 poços.

O tampão de gel utilizado contém 0,05% de azul de bromofenol e 40% de sacarose (Cat Sigma-Aldrich. G2526).

3.6.3 Procedimento experimental com eletroforese

As amostras foram preparadas primeiramente misturando-se o tampão e as moléculas de DNA, seguidos pelo intercalante com uma concentração diferente para cada amostra e, finalmente, pelo agente de condensação SPM⁴⁺ na concentração de 100 μ M. Antes de adicionar SPM⁴⁺, o EtBr foi deixado para equilibrar com as moléculas de DNA, por $\approx$ 15 minutos, seguindo-se o procedimento utilizado para

pinças ópticas. Após a adição do agente de condensação, também se espera ≈ 20 minutos para o equilíbrio da amostra. Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 14.000 rpm, durante 20 minutos. O procedimento de centrifugação permite separar as moléculas de DNA que foram condensadas, as quais vão para o fundo dos tubos de amostra. As moléculas de DNA que não se condensaram permanecem dispersas na solução. Portanto, após a centrifugação, usamos uma pipeta para retirar a parte superior da amostra (75% do volume), descartando a parte inferior que contém quase todas as moléculas condensadas. Em seguida, adicionando-se o tampão de corante (5 μL) à parte retirada (15 μL) e, finalmente esta solução inserida nas cavidades do gel. O fornecimento de energia foi definido para 55 volts durante ≈ 3 horas. Após este tempo, o gel é revelado no transiluminador.

Capítulo 4

4 Apresentação e discussão dos resultados

Neste trabalho, realizamos dois tipos diferentes de experimentos com duas diferentes técnicas de análise (pinça óptica com espectroscopia de força e eletroforese em gel de agarose):

No primeiro experimento, as moléculas de DNA dispersas em solução são primeiramente tratadas com o intercalante EtBr, e, em seguida, o agente de condensação SPM^{4+} é adicionado à amostra. O objetivo é verificar o efeito do intercalante EtBr em impedir a condensação do DNA pela ação de espermina (SPM^{4+}).

No segundo experimento, as moléculas de DNA são, em primeiro lugar, condensadas por adição de espermina (SPM^{4+}), e, em seguida, o intercalante EtBr é adicionado à amostra, a fim de verificar a sua influência sobre as moléculas de DNA previamente condensadas.

A seguir, faremos uma breve apresentação sobre o método experimental e as alíquotas utilizadas. Em seguida apresentaremos os resultados obtidos por espectroscopia de força, e, na sequência os resultados obtidos por eletroforese em gel de agarose.

4.1 Método experimental.

Os experimentos analisados por espectroscopia de força foram realizados em duas etapas: Na primeira, preparamos a amostra e os equipamentos de pinças ópticas como descrito no capítulo 3. Em seguida, encontramos um conjunto microesfera-DNA-lamínula, que atenda à condição do experimento. Então, estiramos a molécula com forças máximas, na ordem de 2 pN, e medimos os comprimentos de persistência (A) e de contorno (L_c) da molécula. Com esses resultados, fomos capazes de avaliar se as propriedades físicas da molécula de DNA seriam satisfatórias para realizarmos o procedimento experimental. Em seguida, como descrito na seção 3.5.3, a solução contida no o-ring é substituída por uma solução semelhante, contendo certa concentração de EtBr, e esperamos cerca de 20 minutos para o ligante se equilibrar com o DNA. Depois de decorrido esse tempo, estiramos novamente a molécula e medimos os comprimentos de persistência (A) e de contorno (L_c), a fim de verificar se o ligante havia interagido com a molécula (Essa verificação é notada devido ao subto aumento no comprimento de persistência da molécula). Por fim, a solução é novamente substituída, como descrito na seção 3.5.3, por uma solução semelhante, contendo a mesma quantidade de EtBr e espermina SPM⁴⁺. Depois aguardamos 20 minutos para que o equilíbrio ligante-DNA seja novamente estabelecido, e, então, estiramos a molécula novamente, agora com forças máximas na ordem de 50 pN.

Na segunda etapa, assim como na primeira, começamos preparando a amostra conforme o protocolo descrito na seção 3.2. Depois procuramos um conjunto favorável e medimos as condições físicas do sistema microesfera-DNA-lamínula, tal como na primeira etapa. Mas, agora invertemos a ordem de trocas de solução:

Primeiro substituímos a solução tampão por uma solução contendo espermina (SPM⁴⁺). Esperamos 20 minutos e, novamente, estiramos o conjunto, medindo novamente as propriedades físicas do sistema (comprimento de persistência (A) e comprimento de contorno (L_c)). Próximo passo: substituímos novamente a solução tampão por uma contendo certa concentração de EtBr, e, como antes, medimos as propriedades físicas da molécula após transcorrido o tempo necessário de equilíbrio.

O procedimento descrito acima foi aplicado utilizando-se as concentrações descritas na seção 3.5.3. Para cada experimento, quando alcançado o último estágio (logo após substituir a concentração de EtBr, para a primeira etapa, e espermina

para a segunda etapa). Estiramos o máximo de moléculas em condições experimentais encontradas.

O primeiro experimento foi conduzido utilizando-se uma solução contendo 10 μM de EtBr, e em seguida substituímos parte desta por outra contendo 10 μM de EtBr e 50 μM de espermina. Para o segundo experimento, utilizamos uma solução contendo 10 μM de EtBr, e em seguida substituímos parte desta por outra contendo 10 μM de EtBr e 40 μM de espermina. Como os dados obtidos nesse experimento não se mostraram muito diferentes dos dados observados no experimento anterior (a quantidade de SPM^{4+} não foi suficiente para condensar uma quantidade significativa de moléculas de DNA) resolvemos utilizar soluções que contivessem uma concentração maior de espermina, e nesse caso, observamos a ocorrência de um número maior de moléculas condensadas, se comparadas com a quantidade observada nos experimentos anteriores. Como o aumento de espermina na solução pareceu afetar a quantidade de moléculas condensadas. Resolvemos realizar os experimentos, utilizando soluções contendo espermina a 100 μM , 200 μM e outra contendo somente espermina a 100 μM sem o ligante EtBr. O experimento utilizando solução contendo 100 μM de SPM^{4+} e EtBr revelou a ocorrência de um número ainda maior de moléculas condensadas, se comparados com os experimentos anteriores. Porém, nenhum aumento significativo em termos de condensação foi observado quando realizamos o mesmo procedimento utilizando a concentração de 200 μM de SPM^{4+} ou com a solução contendo somente espermina a 100 μM , se comparado quando utilizamos a solução contendo EtBr e SPM^{4+} a 100 μM .

Como o máximo de moléculas condensadas ocorreu para a concentração de 100 μM de SPM^{4+} e EtBr (além do fato de que as análises dos outros experimentos ligados às outras concentrações abrangerem uma gama muito grande de dados) os resultados apresentados e discutidos a seguir vão se concentrar em torno dos dados obtidos para experimentos contendo espermina, na concentração de 100 μM de SPM^{4+} e EtBr.

4.2 Resultados obtidos por espectroscopia de força

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos com a primeira fase do experimento realizado por pinça óptica com espectroscopia de força, onde primeiro tratamos as moléculas de DNA com EtBr e em seguida com espermina a 100 μM . Os resultados são mostrados na figura 4.1 e na tabela 4.1. Da segunda fase do experimento, primeiro condensamos as moléculas de DNA por espermina e depois utilizamos o EtBr. Os resultados são apresentados pela figura 4.2 e tabela 4.2.

A figura 4.1 mostra as curvas de força $\times$ extensão para diversas concentrações de EtBr, mantendo a concentração de SPM^{4+} fixada em 100 μM . Por conveniência, a extensão z do DNA foi normalizada pelo comprimento do contorno L_c do DNA, medido antes da adição de qualquer ligante. Nós encontramos dois comportamentos característicos diferentes:

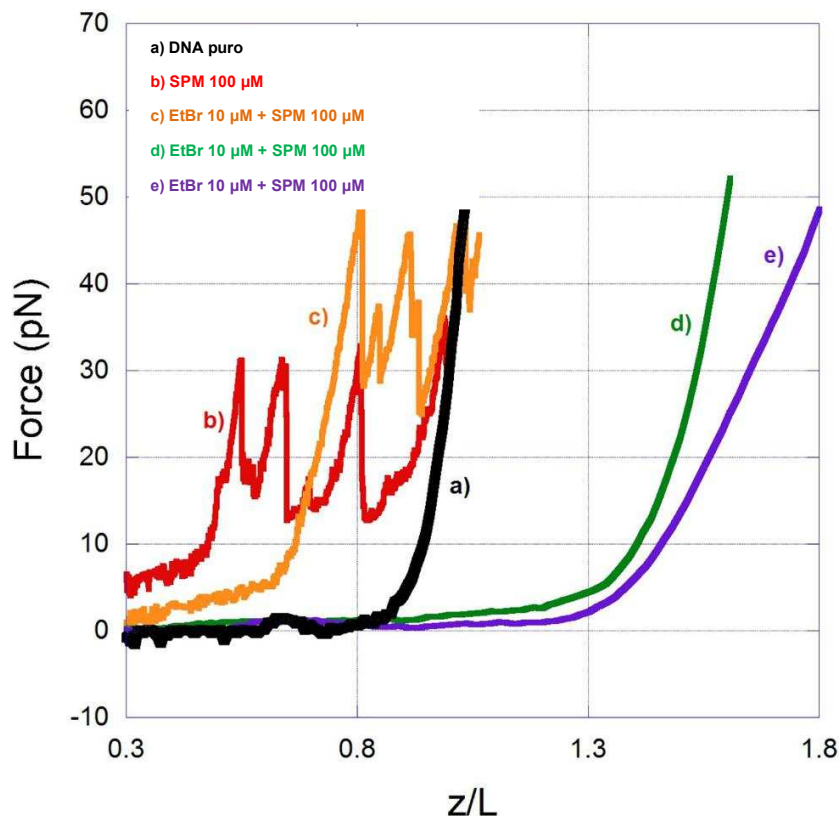


Figura 4.1: Curvas de Força $\times$ Extensão em várias concentrações de EtBr, mantendo a concentração SPM^{4+} fixa em 100 μM . Estes experimentos foram realizados em primeiro adicionando EtBr, e, em seguida, SPM^{4+} para investigar o efeito do intercalante na formação de condensados de DNA. Para baixas concentrações ($\text{EtBr } C_{\text{EtBr}} \leq 10 \mu\text{M}$), as curvas da força apresentam um padrão de dente de serra, o que sugere que o complexo de DNA foi condensado. Para concentrações mais elevadas ($\text{EtBr } C_{\text{EtBr}} \geq 15 \mu\text{M}$), as curvas de força perdem o padrão dente de serra e apresentam-se semelhante a uma cadeia vermiforme (WLC), com um aumento do comprimento do contorno, sugerindo que EtBr tem dificultado a condensação do DNA por SPM^{4+} .

Para o experimento utilizando solução contendo somente espermina (SPM^{4+}) a $100\ \mu\text{M}$, sem EtBr (curva **b**), e também para baixas concentrações de EtBr ($C_{\text{EtBr}} \leq 10\ \mu\text{M}$) (curva **c**), as curvas de força exibem um padrão “dente de serra”, o que provavelmente corresponde a um (ou mais) súbitos desenrolar de voltas do DNA condensado. Este comportamento foi anteriormente verificado por Baumann et al. para as moléculas de DNA condensado por espermidina (SPD^{3+}) [24], mas apenas para os complexos puros DNA- SPD^{3+} (sem qualquer intercalante). Observe na curva **c** que o intercalante, de fato, afetou a condensação do DNA, uma vez que a extensão medida antes do primeiro pico da curva de força é maior quando EtBr está presente, provavelmente devido à intercalação. Por outro lado, para grandes concentrações de EtBr ($C_{\text{EtBr}} \geq 15\ \mu\text{M}$), como nas curvas **d** e **e**, as curvas de força perdem o padrão “dente de serra” e parecem semelhantes a uma cadeia vermiforme (WLC), mostrando um padrão de curva força por extensão semelhante ao encontrado e mostrado pela figura 3.4, porém exibindo um aumento do comprimento de contorno, em comparação à molécula de DNA puro (curva **a**). A ausência do padrão de dente de serra e a recuperação de um comportamento semelhante ao WLC sugere fortemente que EtBr tem dificultado a condensação do DNA por SPM^{4+} em concentrações elevadas. Para nossas condições experimentais, a concentração crítica para conseguir este efeito foi, entre $10\ \mu\text{M}$ e $15\ \mu\text{M}$ de EtBr para $100\ \mu\text{M}$ de SPM^{4+} . Além disso, as extensões máximas atingidas pelos complexos DNA mostrados na curva (e), são semelhantes às extensões máximas atingidas por moléculas de DNA tratadas somente com EtBr [49]. Isto indica que a presença de SPM^{4+} não é o fator determinante para restringir as extensões máximas das moléculas de DNA. Este fato já era esperado uma vez que em altas concentrações EtBr e altas forças de estiramento as moléculas aparecem completamente descompactadas.

Outra evidência para esta conclusão é o fato de, para as menores extensões de DNA utilizadas nesta experiência ($z / L \approx 0,3$), as curvas apresentarem o comportamento de “dente de serra” e um valor considerável de força ($\approx 5\ \text{pN}$ para a curva **b** e $\approx 2\ \text{pN}$ para a curva **c**). Como discutido por Baumann et al. [50], isto é, um comportamento típico de curvas de força obtidas a partir de moléculas de DNA condensadas, as quais apresentam um valor considerável de força por extensões muito baixos do DNA, em contraste com o comportamento típico WLC. Para as

outras curvas de força mostradas na figura 4.1 (a, d e e), a força é $\ll 1$ pN em $z / L \approx 0,3$, semelhante a um comportamento WLC, indicando que EtBr, de fato, tem impedido a condensação do DNA. Para alcançar os resultados mostrados na figura 4.1, realizamos o procedimento de pinça óptica estirando o máximo de moléculas de DNA encontradas em cada experimento e repetimos o processo em cada diferente concentração. A tabela 4.1 mostra os resultados obtidos: nela, é apresentado o número total de moléculas de DNA diferentes, medidos em cada concentração, e a fração dos que exibem o comportamento de “dente de serra”. Observe que, para $C_{\text{EtBr}} \leq 10 \mu\text{M}$, a fração é muito grande ($> 90\%$), mas para $C_{\text{EtBr}} \geq 15 \mu\text{M}$ a fração diminui drasticamente, chegando a 18% para 15 μM e $\approx 8\%$ para 21 μM .

C_{EtBr}	$C_{\text{EtBr}}/C_{\text{bp}}$	Nº.de moléculas medidas	% com padrão dente de serra
Zero (apenas SPM^{4+})	Zero	12	92%
10μM	5,2	10	90%
15μM	7,7	17	18%
21μM	10,8	13	8%

Tabela 4.1: Número total de diferentes moléculas de DNA medido em cada concentração, e a fração deles que exibe o comportamento dente de serra, para DNA tratado primeiramente com EtBr, e depois com SPM^{4+} . Podemos observar que para $C_{\text{EtBr}} \leq 10 \mu\text{M}$, a porcentagem de moléculas que apresentam o padrão dente de serra é muito elevada ($> 90\%$), já para $C_{\text{EtBr}} \geq 15 \mu\text{M}$ esse número reduz drasticamente, chegando $\approx 18\%$ para 15 μM de EtBr e $\approx 8\%$ para uma concentração contendo 21 μM de EtBr.

Finalmente, é importante mencionar que também repetimos algumas das experiências de estiramentos mostradas na figura 4.1, utilizando SPM^{4+} a 200 μM , a fim de verificar a influência da concentração do agente de condensação sobre os resultados obtidos. Descobrimos que não há alteração significativa no

comportamento das curvas de força nestas duas concentrações SPM^{4+} (resultado não mostrado).

A partir dos resultados mostrados na figura 4.1 e na tabela 4.1, é evidente que as moléculas de DNA previamente intercalados por EtBr são mais difíceis de ser condensados por SPM^{4+} .

A pergunta natural que surge a partir dessa conclusão é sobre a afinidade do EtBr com as moléculas de DNA previamente condensadas. Esta é uma questão importante, já que *in vivo* as moléculas de DNA estão fortemente condensadas durante um grande período de tempo. Na verdade, a quase totalidade dos estudos que envolvem interações DNA-fármacos foram realizados usando DNA disperso em solução, e apenas alguns estudos [11-13] foram realizados com a intenção de caracterizar as interações com o DNA condensado.

Para investigar esta questão, trocamos a ordem de uso dos ligantes nos experimentos anteriores. Em primeiro lugar, condensamos a molécula de DNA com SPM^{4+} a 100 μM , esperamos ≈ 20 minutos para atingir o equilíbrio, e em seguida, utilizamos várias concentrações diferentes de EtBr, a fim de verificar o efeito do intercalante nos condensados de DNA. Antes de executar os experimentos de estiramento, temos que esperar pelo menos 15 minutos para que o intercalante EtBr possa se equilibrar com os condensados de DNA. Sob essas condições, nós descobrimos que a maioria dos condensados DNA não perderam o padrão de “dente de serra”, mesmo para concentrações de EtBr tão altas quanto 50 μM . A figura 4.2 mostra os resultados das análises das curvas de força por extensão, relacionados com esta fase do experimento.

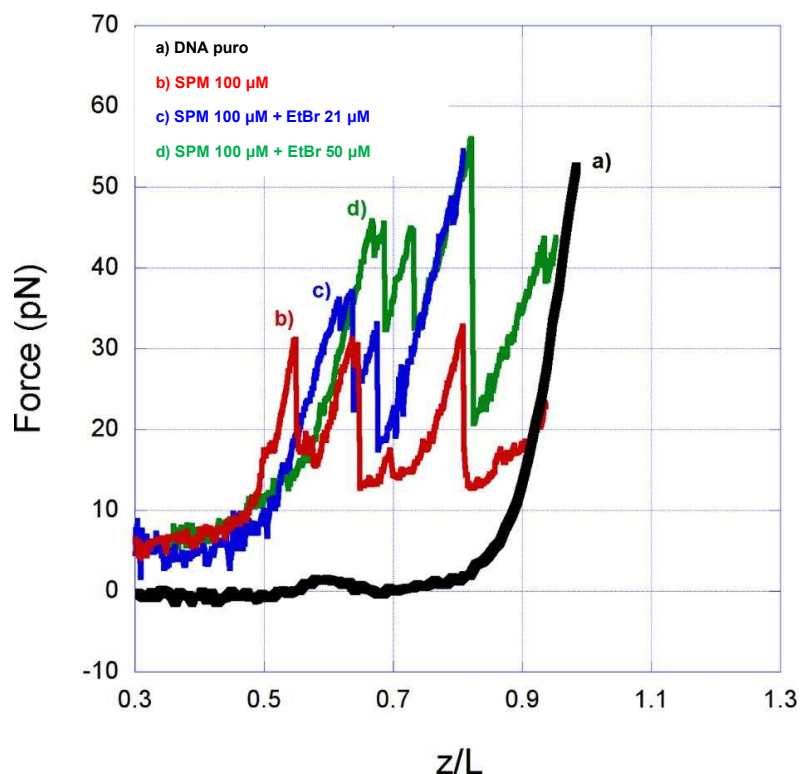


Figura 4.2: Curvas de Força $\times$ extensão em várias concentrações de EtBr, quando o fármaco interage com moléculas de DNA previamente condensada por SPM $^{4+}$ a 100 μ M. A maioria dos condensados de DNA não perderam o padrão dente de serra, mesmo para concentrações de EtBr tão elevadas quanto 50 μ M, indicando que EtBr teve pouco efeito sobre condensados previamente formados por DNA-SPM $^{4+}$.

Esse fato permitiu apenas verificar a ocorrência de um ligeiro aumento na extensão máxima, medida antes do primeiro pico do padrão de “dente de serra”. Com o aumento da concentração de EtBr, um comportamento semelhante ao mostrado na curva **c** da figura 4.1 é exibido pelas moléculas de DNA previamente condensadas.

A tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos para as moléculas de DNA previamente condensadas por espermina (SPM $^{4+}$) a 100 μ M e depois tratadas com EtBr em algumas concentrações.

C_{EtBr}	C_{EtBr}/C_{bp}	Nº.de moléculas medidas	% com padrão dente de serra
Zero (apenas SPM^{4+})	Zero	12	92%
21μM	10,8	7	85%
30μM	15,5	9	78%
50μM	25,5	18	78%

Tabela 4.2: Número total de diferentes moléculas de DNA medido em cada concentração, e a fração dos que apresentam o padrão dente de serra, para DNA tratado primeiramente com SPM^{4+} , e depois com EtBr. Apenas uma pequena fração de moléculas de DNA perderam o padrão dente de serra, mesmo para concentrações de EtBr tão elevadas como 50 μ M. Estes resultados indicam fortemente que a intercalação de EtBr em condensados de DNA cation-induzido previamente é um pouco mais difícil do que intercalação regular em DNA disperso.

Estes resultados indicam claramente que a interação DNA-EtBr é pouco significativa em condensados previamente induzidos por SPM^{4+} se comparada com a intercalação regular em DNA disperso. De fato, na maioria dos casos, quando adicionamos intercalante EtBr, o desenrolar das moléculas de DNA é apenas parcial quando previamente condensadas por SPM^{4+} . Estes resultados indicam fortemente que a intercalação EtBr em condensados de DNA induzidos por cátions previamente formados é um pouco mais difícil do que intercalação em DNA disperso. De fato, na maioria dos casos o EtBr apenas desdobra parcialmente as moléculas de DNA previamente condensadas por SPM^{4+} , como se pode ver pelos dados da tabela 4.2.

Os resultados dos dois tipos diferentes de experimentos podem ser compreendidos considerando dois pontos diferentes: (a) a partir do ponto de vista das propriedades mecânicas dos complexos DNA- intercalantes, o fato do intercalante ter impedido o processo de condensação é uma indicação de que este ligante aumenta o comprimento de persistência do DNA, quando previamente adicionado como apontado em alguns trabalhos [51,52], aumentando assim a

energia necessária para formar as dobras acentuadas apresentadas pelos condensados de DNA. É importante, no entanto, salientar que há autores que descobriram que intercalantes podem diminuir o comprimento de persistência do DNA [32]. Em nossa opinião, a diminuição deste parâmetro está provavelmente relacionada à desnaturação parcial do DNA devido a repetidos estiramentos aplicado ao realizar os experimentos, como discutido nas referências [52,53] e também depende das condições experimentais utilizadas (composição da solução tampão, regime de forças máximas utilizadas para estirar as moléculas, etc.). Outros dos autores que mediram o comprimento de persistência de complexos DNA-intercalante com técnicas que não envolviam estiramentos (microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica, espalhamento de luz, viscosimetria, etc) descobriram que intercalantes em geral aumentam o comprimento de persistência DNA [52,53]. Embora mais pesquisa seja claramente necessária para investigar os resultados contraditórios afirmado acima, os resultados do presente estudo sugerem que EtBr realmente aumenta o comprimento de persistência de DNA dispersos quando previamente intercalado, assim impedindo a condensação da molécula. (b) Por outro lado, quando as moléculas de DNA são previamente condensadas, o espaço livre acessível para EtBr chegar ao local de intercalação é consideravelmente reduzido, por causa da forte compactação do DNA. Na verdade, para os complexos DNA-SPM⁴⁺, sob condições experimentais semelhantes aos nossos, o espaçamento interhelical (distância eixo a eixo) dentro dos condensados é apenas cerca de 2,82 nm [54]. Observa-se, uma vez que o diâmetro da hélice B-DNA é de cerca de 2,0 nm e o diâmetro maior da molécula de EtBr de cerca de 1,0 nm [55], realmente esperamos que a maioria dos sítios não esteja acessível para o intercalante EtBr. Finalmente, pode-se perguntar sobre a competição eletrostática envolvidas nesse fenômeno, uma vez que tanto SPM⁴⁺ e EtBr são moléculas catiônicas. Nós não acreditamos que esse efeito é o mais importante, uma vez que a densidade de carga negativa ao longo do restante da dupla hélice é essencialmente constante, mesmo após a intercalação, devido ao rearranjo dos cátions [56].

4.3 Resultados do experimento com eletroforese em gel

A fim de confirmar os resultados obtidos por espectroscopia de força, foram realizados ensaios em eletroforese por meio de um procedimento semelhante ao descrito na seção 3.6.2. Primeiramente estudamos a capacidade do EtBr em impedir a condensação DNA e, em seguida, a interação do intercalante com a molécula de DNA previamente condensada. Para realizar esta tarefa, preparamos quatro séries diferentes de amostras, conforme mostrado na figura 4.3a e na figura 4.3b.

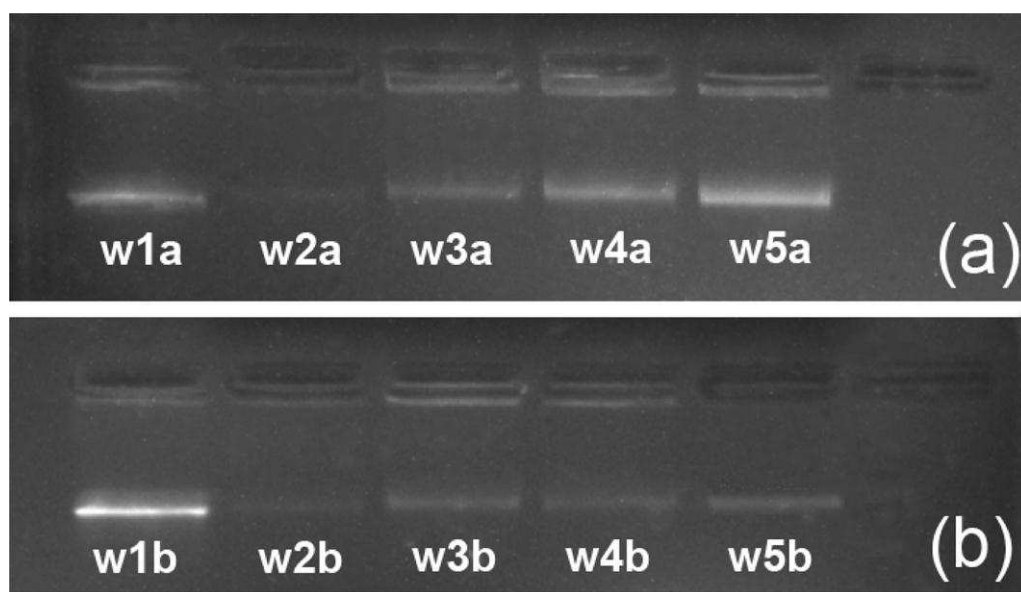


Figura 4.3: Resultado do Experimento de Eletroforese. Na figura 4.3a, A partir da esquerda para a direita, o primeiro poço (W1A) contém apenas DNA puro, o segundo poço (W2A) contém DNA apenas com SPM^{4+} , e do terceiro (W3A) para o quinto (W5A) temos DNA previamente intercalada com concentrações crescentes de EtBr e, em seguida, submetida a condensação por SPM^{4+} . Na figura 4.2 b Usamos exatamente as mesmas concentrações de EtBr e de SPM^{4+} , trocando a ordem de aplicação desses ligantes. Observa-se, neste caso, que apenas uma pequena quantidade de DNA são observadas no gel, mesmo para a concentração mais elevada de EtBr (W5b), indicando que o intercalante tem pouco efeito em desenrolar condensados do DNA- SPM^{4+} previamente formados.

Na série da figura 4.3, as amostras foram preparadas primeiramente misturando-se o tampão e as moléculas de DNA, se seguido pelo intercalante com uma concentração diferente para cada amostra e, finalmente, pelo agente de condensação SPM^{4+} a $100 \mu\text{M}$. Antes de adicionar SPM^{4+} , o EtBr foi deixado para equilibrar-se com as moléculas de DNA por ≈ 15 minutos, seguindo o procedimento utilizado na seção 3.5.3. Após a adição do agente de condensação, também esperamos ≈ 20 minutos para o equilíbrio da amostra. Em seguida, cada amostra é

centrifugada a 14.000 rpm, durante 20 minutos. O procedimento de centrifugação permite separar as moléculas de DNA que foram condensadas, estas se depositam no fundo do eppendorf, contendo a amostra, da fração de moléculas de DNA que não se condensaram (permaneceram dispersas na solução). Portanto, após a centrifugação, usamos uma pipeta para retirar a parte superior da amostra (75% do volume), descartando a parte inferior, que contém quase todas as moléculas que foram condensadas. Em seguida, é adicionado o tampão corante (5 μ L) à parte retirada (15 μ L) e, finalmente, esta solução é inserida nas cavidades do gel. A voltagem aplicada foi definida para 55 volts durante $\approx$ 3 horas. Após este tempo, o gel é revelado no transiluminador. O resultado é mostrado na figura 4.3a: da esquerda para a direita, o primeiro poço (W1A) contém apenas DNA puro (amostra referência), o segundo poço (W2A) contém apenas DNA com SPM⁴⁺ e do terceiro (W3A) para o quinto (W5A) poço temos DNA's previamente intercalados com concentrações crescentes de EtBr e, em seguida, submetidos ao agente de condensação SPM⁴⁺, tal como explicado anteriormente. Observa-se que, quando não é usado o EtBr antes de usar o SPM⁴⁺ (W2A), quase todas as moléculas de DNA foram condensadas, e, por isso, uma concentração muito baixa de DNA é observada no gel. Por outro lado, com o aumento da concentração de EtBr, o número de moléculas de DNA observada no gel aumenta de forma correspondente, em concordância qualitativa com os resultados obtidos a partir de espectroscopia de força.

Na figura 4.3b, foram utilizadas exatamente as mesmas concentrações de EtBr e de SPM⁴⁺, porém trocando a ordem de aplicação desses ligantes, como a realizada na seção 3.5.3. Observe, neste caso, que apenas concentrações muito baixas de DNA são observadas no gel, mesmo para as concentrações mais elevadas de EtBr (W5b). Concluimos, pois, que o intercalante tem pouco efeito nos condensados DNA-SPM⁴⁺ previamente formados, em concordância qualitativa com os resultados de espectroscopia de força. As relações da concentração de EtBr por concentração de DNA-pares de bases ($C_{\text{EtBr}} / C_{\text{BP}}$) utilizadas em cada poço foram compatíveis com as utilizadas em experiências de espectroscopia de força. Para fazer a comparação entre as duas técnicas de um modo quantitativo, medimos a média do contraste de cada banda de DNA (figuras 4.3a e 4.3b), que é proporcional à concentração de DNA no poço. A média de contraste $\langle \xi \rangle$ foi calculada pelo

$$\langle \xi \rangle = \frac{\langle I_b \rangle - \langle I_0 \rangle}{\langle I_0 \rangle} \quad (4.1)$$

Sendo $\langle I_b \rangle$ a intensidade média da banda e $\langle I_0 \rangle$ a intensidade média do fundo circundante.

A tabela 4.3 mostra os resultados obtidos para os condensados de SPM⁴⁺, considerando que, para o DNA puro, todas as moléculas permanecem dispersas em solução após a centrifugação. Portanto, para estimar a fração de DNA's condensados para cada poço, basta simplesmente comparar a média de contraste da respectiva banda com a banda de contraste do DNA puro (de referência). Observe que, quando o EtBr é usado primeiro (figura 4.3a), a fração de moléculas de DNA condensadas diminui à medida que a concentração de EtBr aumenta. Por outro lado, quando SPM⁴⁺ é usada primeira (figura 4.3b), quase todas as moléculas de DNA se condensam em concordância com os resultados obtidos a partir de espectroscopia de força.

$C_{\text{EtBr}}/C_{\text{bp}}$	DNA Condensados Figura 4.3 (a)	DNA Condensados Figura 4.3 (b)
Zero (apenas SPM⁴⁺)	93%	94%
5,2	74%	87%
10,8	58%	88%
21,6	39%	88%

Tabela 4.3: Fração de Moléculas de DNA Condensadas por SPM⁴⁺ obtidos em Experimentos de Eletroforese. Quando EtBr é usado primeiro (série da figura 5a), a fração de moléculas de DNA condensado diminui à medida que a concentração EtBr aumenta. Quando SPM⁴⁺ é usado primeiro (série da figura 5b), quase todas as moléculas de DNA são condensadas, o que está de acordo com os resultados obtidos a partir de espectroscopia de força.

Finalmente, observa-se que os resultados obtidos com as duas técnicas muito diferentes (espectroscopia de força e eletroforese em gel) concordam muito bem, qualitativamente. A única diferença significativa observada entre elas é que,

aparentemente, a capacidade do EtBr em dificultar a condensação catiônica induzida do DNA, medida por espectroscopia de força, é consideravelmente maior do que a medida por eletroforese em gel, como pode ser visto por comparação da última coluna da tabela 4.1 com a segunda coluna da tabela 4.3. No entanto, tais conclusões devem ser tiradas com cautela, uma vez que existem diferenças importantes entre os dois tipos de experimentos realizados:

- (a) Na espectroscopia de força, medimos a fração de moléculas de DNA que apresentaram o padrão “dente de serra” (curvas de força X extensão). Este padrão é uma indicação de condensação da molécula de DNA, porém moléculas de DNA que foram parcialmente condensadas também podem exibir esse padrão quando analisadas por espectroscopia de força e permanecerem dispersas na solução após centrifugação contribuindo para o aumento de moléculas analisadas por eletroforese.
- (b) O número de diferentes moléculas de DNA medidos por espectroscopia de força (tipicamente de 10 a 20 para cada concentração) é muito pequeno se comparado com a quantidade utilizada na eletroforese em gel (tipicamente $\approx 10^{12}$ moléculas para cada poço). Portanto, a fração de moléculas condensadas apresentadas nas tabelas 4.1 e 4.3 não são talvez estatisticamente significantes.
- (c) Efeitos de superfície podem contribuir para a condensação do DNA em experiências de espectroscopia de força, uma vez que moléculas de DNA permanecem confinadas muito perto da superfície do vidro, no caso destes experimentos.

A pesar do modelo de condensação usado em nosso experimento ser demasiadamente simples, ele nos permite especular: em qual fase do ciclo celular seria mais plausível tratar uma molécula de DNA com um fármaco que possua as mesmas características do ligante EtBr? Baseados nas séries de experimentos realizados com a molécula de DNA condensada, ficou claro que a melhor fase para tratar a molécula seria quando está se aproxima da fase de duplicação. Já na fase onde a molécula se encontra condensada a maioria dos sítios para intercalação não seriam acessíveis para o fármaco.

Capítulo 5

5 Conclusões e Perspectiva

Neste trabalho, usamos duas técnicas experimentais diferentes: pinçamento óptico com espectroscopia de força e eletroforese em gel de agarose. O objetivo foi de avaliar a interação da molécula de DNA com dois ligantes bem conhecidos: brometo de etídio e espermina.

Primeiro adicionamos uma solução contendo brometo de etídio e aguardamos o equilíbrio e depois adicionamos a espermina. Segundo adicionamos uma solução contendo espermina e depois verificamos se o EtBr surtiria algum efeito sobre a molécula.

Da primeira fase de testes, tanto para experimentos de pinçamento óptico quanto para eletroforese em gel, tratamos a solução de DNA com EtBr e, baseados nos resultados, concluímos que houve um aumento significativo nos comprimentos de persistência e de contorno das moléculas, o que indica a eficácia do brometo de etídio em intercalar-se entre os pares de bases da molécula. Em seguida, usamos o agente de condensação SPM^{4+} e, com a análise dos resultados, verificamos que de fato o EtBr impede a condensação induzida por cations (SPM^{4+}).

Da segunda fase de testes, tratamos a solução com o agente de condensação SPM^{4+} e concluímos que nesta primeira etapa ocorreu uma compactação abrupta de todas as moléculas presentes na solução, o que ficou evidente durante a espectroscopia de força, pois cessaram todos os movimentos brownianos que antes eram exibidos pelas microesferas da amostra. Em seguida, usamos o EtBr e verificamos que em alguns casos, mesmo após a condensação, ainda ocorreram casos de intercalação da substância entre os pares de bases da molécula, porém com menor eficácia.

Concluimos também que a discrepância nos resultados a respeito da eficácia na interação do EtBr em impedir a condensação da molécula e de promover a descompactação depende da ordem a qual ele é introduzido no composto:

Quando o EtBr é adicionado primeiro o aumento do comprimento de persistência da molécula aumenta a quantidade de energia necessária para criar dobras em sua estrutura .

Quando as moléculas de DNA são condensadas primeiro, o espaço livre acessível para EtBr chegar ao local de intercalação é consideravelmente reduzido, por causa da forte compactação do DNA

Por fim, chegamos à conclusão que qualitativamente os resultados obtidos com a espectroscopia de força concordam muito bem com os resultados obtidos no mesmo modelo de experimento feito por eletroforese em gel.

Perspectivas

Com o intuito de comprovar as conclusões citadas acima, temos como objetivo posterior repetir os testes realizados em espectroscopia de força e eletroforese em gel, mas, utilizando um intercalante neutro, como o psoralen.

APÊNDICE A

Artigo Publicado

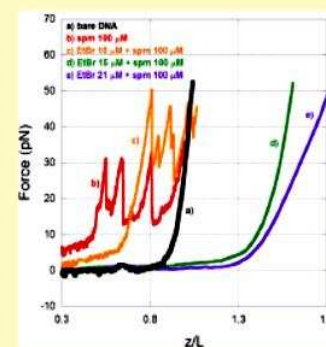
Nesse apêndice apresentamos o artigo “*On the Effects of Intercalators in DNA Condensation: A Force Spectroscopy and Gel Electrophoresis Study*” publicado na revista *The Journal of Physical Chemistry B* na data de 08/05/2014 durante a execução dos trabalhos de mestrado.

On the Effects of Intercalators in DNA Condensation: A Force Spectroscopy and Gel Electrophoresis Study

M. S. Rocha, A. G. Cavalcante, R. Silva, and E. B. Ramos*

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

ABSTRACT: In this work we have characterized the effects of the intercalator ethidium bromide (EtBr) on the DNA condensation process by using force spectroscopy and gel electrophoresis. We have tested two condensing agents: spermine (spm^{4+}), a tetravalent cationic amine which promotes cation-induced DNA condensation, and poly(ethylene glycol) (PEG), a neutral polymer which promotes DNA ψ -condensation. Two different types of experiments were performed. In the first type, bare DNA molecules disperse in solution are first treated with EtBr for intercalation, and then the condensing agent is added to the sample with the purpose of verifying the effects of the intercalator in hindering DNA condensation. In the second experiment type, the bare DNA molecules are first condensed, and then the intercalator is added to the sample in order to verify its influence on the previously condensed DNA. The results obtained with the two different experimental techniques used agree very well, indicating that previously intercalated EtBr can hinder both cation-induced and ψ -condensation, being more efficient in the first case. On the other hand, EtBr has little effect on the previously formed cation-induced condensates, but is efficient in unfolding the ψ -condensates.



INTRODUCTION

The biophysics of polymers and polyelectrolytes is a well studied interdisciplinary field, with many important discoveries achieved in the past decades. In particular, it is well established today that neutral/anionic polymers¹ or cationic molecules with charge equal or superior to $+3$ ^{2,3} can induce DNA condensation in solution, a state in which the worm-like DNA chain turns into a highly dense and ordered DNA structure.⁴ In the first case, known as ψ -condensation, depletion interactions between the DNA segments and the neutral polymer drive the condensation process.⁵ In the second case, usually called cation-induced DNA condensation, cationic molecules with charge equal or superior to $+3$ act promoting DNA segment–segment attraction due to the multivalent ion–ion positional correlations.⁶

Both ψ -condensation and cation-induced DNA condensation produce a drastic decrease in the DNA wormlike chain (WLC) spanned volume, with a consequent formation of tiny DNA condensates which often present a toroidal, a globular or a rod-like morphology.^{7–9} These morphologies have attracted the attention of physicists and biologists in the last three decades, since the in vitro produced DNA condensates closely resemble those found inside virus heads. These condensates may serve, therefore, as a simple experimental model to study the DNA inside those living structures. In addition, DNA condensation has attracted interest of different areas such as biochemistry, biophysics, molecular biology (packing of genetic information), polymer physics (phase transitions) and medicine (gene therapy applications).¹⁰

A much less studied topic is the interaction of drugs with condensed DNA. In fact, almost the totality of the studies involving DNA–drug interactions were performed by using

disperse DNA in solution, and only a few studies^{11–13} have focused on characterizing these interactions with condensed DNA. Nevertheless, despite the lack of information on this subject, its importance is directly correlated to the fact that, in vivo, the DNA molecules remains strongly condensed (by the histones basic proteins) inside the cell nucleus. Thus, characterizing drugs interactions with condensed DNA can bring new fundamental information not only to basic sciences, but also for practical applications, especially in the treatment of human diseases (cancer chemotherapy, gene therapy, etc.).

Previous experiments on this subject were performed by Widom and Baldwin using light scattering¹¹ and by the group of K. Yoshikawa using fluorescence microscopy.^{12,13} Some results of these groups indicate that intercalators can interfere in DNA condensation, inhibiting the phenomenon at high drug concentrations. However, the experimental techniques used by these authors do not allow one to study the phenomenon at the single molecule level, but rather at the ensemble average level.

In the present work, we have used force spectroscopy to characterize the interaction of the intercalating drug ethidium bromide (EtBr) with two types of DNA condensates: cation-induced DNA condensates achieved with the tetravalent amine spermine (spm^{4+}) and ψ -condensates achieved with the neutral polymer poly(ethylene glycol) (PEG). Both compounds are well-known DNA condensing agents. In addition, EtBr is a well characterized DNA intercalator. Since intercalators are commonly used in various kinds of cancer chemotherapies, their interaction with condensed DNA molecules is a relevant

Received: February 13, 2014

Revised: April 8, 2014

topic. In particular, force spectroscopy measurements have shown that EtBr in general interfere in the DNA condensation: the intercalator may hinder or even prevent the compaction process at high enough concentrations when previously bound to disperse DNA and, on the other hand, it is also able to intercalate in previously condensed DNA unfolding it, albeit with less efficiency when compared to intercalation in disperse DNA.

Finally, the results and conclusions obtained from force spectroscopy were confirmed by performing gel electrophoresis experiments in order to estimate the fraction of DNA molecules that have been condensed for each studied situation. Thus, two very different techniques were employed to investigate the problem, and the results obtained agree very well.

MATERIALS AND METHODS

In this section we describe the materials and the experimental procedure used to perform the stretching and gel electrophoresis experiments of condensed DNA and of condensed DNA complexes formed with EtBr.

Sample Preparation. Stretching Experiments. In this work the samples consist of λ -DNA molecules (New England Biolabs) end-labeled with biotin in a phosphate buffered saline (PBS) solution with pH = 7.4. One end of the DNA molecules is attached to a streptavidin-coated glass coverslip using the procedure reported in ref 14, while the other end of the molecule is attached to a streptavidin coated polystyrene bead with 3 μ m diameter (Bangs Laboratories). Therefore, one can trap the polystyrene bead with the optical tweezers and stretch the DNA molecule by moving the microscope stage with an attached piezoelectric actuator.

The sample chamber containing the work solution with the DNA consists of a O-ring glued in the coated coverslip, and the buffer solution (and consequently the ligands concentrations) can be easily changed by using micropipets.

In all the experiments performed with spermine (spm^{4+}) (Spermine tetrahydrochloride, Sigma-Aldrich Cat. S2876) as the condensing agent, we have used $[\text{spm}^{4+}] = 100 \mu\text{M}$ and $[\text{Na}] = 10 \text{ mM}$ in the buffer solution, in order to maximize the DNA condensation due to the electrostatic binding of spermine.¹⁵

In the experiments performed with poly(ethylene glycol) (PEG) as the condensing agent, we have used $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$, close to the physiological conditions. To perform these experiments we have chosen PEG with a molecular weight of 8000 (Sigma-Aldrich Cat. 89510). It is known that PEG 8000 induces DNA ψ -condensation at the concentration of 20% (in mass) and 150 mM of NaCl,^{16,17} which was used in all experiments.

In both cases, the DNA concentration is low enough in such a way that the condensing agents promote only DNA intramolecular condensation (the DNA base-pair concentration used in all force spectroscopy experiments was $C_{\text{bp}} \sim 1.94 \mu\text{M}$).

Ethidium bromide (EtBr) (Sigma-Aldrich Cat. E8751) was used as the intercalator in all experiments at various different concentrations, in order to investigate the general effects of the intercalators on the DNA condensation process.

Gel Electrophoresis. For gel electrophoresis experiments, the samples were prepared by mixing λ -DNA, the condensing agent, and EtBr in the PBS buffer. In order to verify whether DNA condensation occurred, we centrifuged the sample and analyzed the supernatant content in an agarose gel (1.2% in mass), an assay similar to that used by Murphy and

Zimmerman.¹⁸ The gel is prepared containing 0.5 $\mu\text{g/mL}$ of EtBr for DNA staining during the run. The concentration of the condensing agents were the same used in force spectroscopy experiments. Finally, in order to directly compare the results obtained from electrophoresis to those obtained from force spectroscopy, we have used the same ratios of EtBr to DNA concentrations.

Experimental Setup. The optical tweezers consist of a 1064 nm ytterbium-doped fiber laser with maximum output power of 5.8 W (IPG Photonics, YLR-5-1064-LP) mounted in a Nikon Ti inverted microscope with a 100 $\times$ N.A. 1.4 objective. The apparatus is previously calibrated by two independent methods as described earlier,¹⁹ and used to stretch the DNA complexes by moving the microscope stage with the piezoelectric actuator (Physik Instrumente, P-545.3C7 PI Nano), which allows one to perform the stretching experiments with a resolution of few nanometers.

The electrophoresis apparatus consists of a 12 cm $\times$ 12 cm horizontal chamber (Model DGH12, DiGel) containing the electrolytic solution TAE (Tris-acetate EDTA) 1 $\times$ and a 0–250 V continuous power supply (Model 250, Gibco BRL Life Technologies). The transilluminator used to visualize the gel has a 2.0 megapixel CCD camera and Epi-UV illumination (L-Pix, Loccus Biotecnologia).

DNA Stretching. To stretch the DNA molecule, we use the optical tweezers to trap the polystyrene bead attached to the DNA, while moving the microscope stage (and consequently the coverslip) by using the piezoelectric actuator. The pulling velocity used in this procedure was $\sim 100 \text{ nm/s}$. Such velocity is low enough to guarantee both that the DNA passes through equilibrium configurations and that the Stokes force on the bead is negligible. Therefore, the optical force is equal in modulus to the force exerted by the DNA molecule to pull the bead out of the potential well. To measure this force, we determine the position of the bead center as a function of time by using videomicroscopy and a centroid-find algorithm. Therefore, knowing the initial position of the bead, which is the bottom of the potential well, we can easily calculate the change of the bead position as a function of time $\Delta x(t) = x(t) - x(0)$ and the force $F(t) = \kappa \Delta x(t)$, where κ is the trap stiffness (previously determined in the calibration procedure). The details about this experimental procedure can be found in our references.^{19,20}

When adding the condensing agents into the sample chamber, the polystyrene bead is maintained trapped with its center distant $z_0 \sim 4.5 \mu\text{m}$ from the coverslip surface, in order to avoid total DNA collapse. The DNA condensates formed are then pulled starting from z_0 , which corresponds to $\sim 27\%$ of the contour length of the bare λ -DNA ($16.5 \pm 1 \mu\text{m}$).

RESULTS AND DISCUSSION

In this work we have performed two different types of experiments with the two techniques (force spectroscopy and gel electrophoresis): in the first experiment type, bare DNA molecules disperse in solution are first treated with EtBr for intercalation, and then the condensing agent is added to the sample. The objective is to verify the effect of the intercalator in hindering DNA condensation. In the second experiment type, the bare DNA molecules are first condensed, and then the intercalator is added to the sample in order to verify its influence on the previously condensed DNA molecules. Below we describe in detail the experiments performed with the two different condensing agents, discussing the results obtained.

Force Spectroscopy Results. EtBr Hinders DNA Condensation by spm^{4+} at High Concentrations. These experiments were performed as follows. First, we test a bare DNA molecule, stretching it a few times with maximum forces of the order of 2 pN in order to verify if the DNA molecule is fine, by measuring its persistence and contour lengths with the procedure early described in refs 19 and 20. Then, the buffer solution is changed to a similar one containing a certain concentration of EtBr, and we wait at least ~ 15 min for the drug to equilibrate with DNA. After this time the DNA–EtBr complex is stretched again with low forces (~ 2 pN) in order to verify if the drug has intercalated in the DNA molecule, by determining the increase of the contour length. Finally, the buffer solution is changed again to a similar one containing the same EtBr concentration and also containing spm^{4+} at 100 μM . We wait ~ 20 min for spm^{4+} to equilibrate with the DNA–EtBr complexes, and finally the new complex formed (DNA–EtBr– spm^{4+}) is stretched with maximum forces of the order of 50 pN. These time intervals are sufficient for the ligands to achieve equilibrium with DNA for our experimental conditions. This fact was verified by performing some experiments waiting time intervals as long as ~ 1.5 h after adding the ligands. In these tests we have found no significant difference from the results obtained when waiting 15–20 min. Finally, as described before, we have used $[\text{Na}] = 10$ mM in all experiments with spm^{4+} , in order to maximize the condensation effect.

We have avoided stretching the complexes beyond the limit of 50 pN, since at ~ 65 pN the bare DNA molecule starts the well-known overstretching transition. It is well established that the DNA ligands in general affect this structural transition.²¹ At the concentrations of EtBr and spm^{4+} used in this work, for example, we have not found the characteristic ~ 65 pN plateau of the overstretching transition in the few experiments in which we have reached forces of this order of magnitude (results not shown). Certainly, a more detailed study focusing on the effects of the competition of the two ligands in the overstretching transition must be performed. This issue, however, is outside the scope of the present work.

Figure 1 shows the typical force $\times$ extension curves for various concentrations of EtBr, maintaining the spm^{4+} concentration fixed in 100 μM . For convenience, the DNA extension z was normalized by the bare DNA contour length L (16.5 ± 1 μm), measured before adding any ligand. We have found two different characteristic behaviors.

For pure spm^{4+} , without EtBr (curve b); and also for low EtBr concentrations ($C_{\text{EtBr}} \leq 10$ μM) (curve c), the force curves exhibit a stick-release pattern, which probably corresponds to one or more suddenly released turns of the condensed DNA. Such behavior was previously verified by Baumann et al. for DNA molecules condensed by spermidine (spd^{3+}),²² but only for pure DNA– spd^{3+} complexes (without any intercalator). Observe in curve c that the intercalator has in fact affected the DNA condensation, since the extension measured before the first peak of the force curve is larger when EtBr is present, probably due to intercalation.

On the other hand, for high EtBr concentrations ($C_{\text{EtBr}} \geq 15$ μM), as in curves d and e, the force curves lose the stick-release pattern and appear more similar to a WLC with an increased contour length as compared to the bare DNA molecule (curve a). The absence of the stick-release pattern and the recovery of a WLC-like behavior strongly suggest that EtBr has hindered DNA condensation by spm^{4+} at high concentrations. For our experimental conditions, the critical

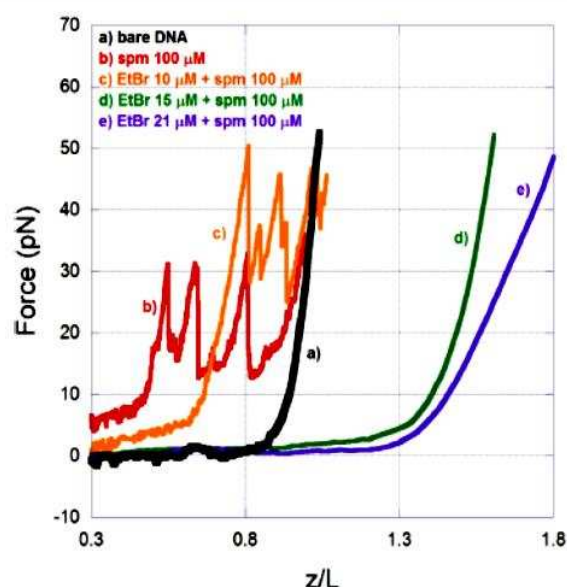


Figure 1. Force $\times$ extension curves for various concentrations of EtBr, maintaining the spm^{4+} concentration fixed in 100 μM . These experiments were performed first adding EtBr, and then spm^{4+} to investigate the effect of the intercalator in the formation of DNA condensates. For low EtBr concentrations ($C_{\text{EtBr}} \leq 10$ μM), the force curves exhibit a stick-release pattern, suggesting that the DNA complex is condensed. For higher EtBr concentrations ($C_{\text{EtBr}} \geq 15$ μM), the force curves lose the stick-release pattern and appear similar to a wormlike chain (WLC) with an increased contour length, suggesting that EtBr has hindered DNA condensation by spm^{4+} .

concentration to achieve this effect is therefore between 10 μM and 15 μM of EtBr for 100 μM of spm^{4+} . In addition, the maximum extensions reached by the complexes in curve (e) is comparable to the maximum extensions of DNA molecules complexed with EtBr alone,²¹ which indicates that the presence of spm^{4+} is not determinant to restrict this maximum extension. This fact was expected since at high EtBr concentrations and high stretching forces the complexes appear completely decondensed.

Another evidence for such conclusion is the fact that, at the lowest DNA extensions used in this experiment ($z/L \sim 0.3$), the curves that exhibit the stick-release behavior present a considerable value of the force (~ 5 pN for curve b and ~ 2 pN for curve c). As discussed by Baumann et al.,²² this is a typical behavior of force curves obtained from condensed DNA molecules, which exhibits a considerable value of the force at very low DNA extensions, in contrast with the typical WLC behavior. For the other force curves shown in Figure 1 (a, d, and e), the force is $\ll 1$ pN at $z/L \sim 0.3$, a WLC-like behavior, indicating that EtBr in fact has hindered DNA condensation.

To achieve the results synthesized in Figure 1, we have stretched many different DNA molecules in each different concentration. Table 1 below outlines the results, showing the total number of different DNA molecules measured in each concentration, and the fraction of them that exhibits the stick-release (s-r) behavior. Observe that, for $C_{\text{EtBr}} \leq 10$ μM , the fraction is very high ($>90\%$), but for $C_{\text{EtBr}} \geq 15$ μM the fraction drastically decreases reaching $\sim 18\%$ for 15 μM and $\sim 8\%$ for 21 μM .

Finally, it is important to mention that we have also repeated some of the stretching experiments shown in Figure 1 using

Table 1. Total Number of Different DNA Molecules Measured in Each Concentration, and the Fraction of Them That Exhibits the Stick-Release (s-r) Behavior, for DNA Treated Firstly with EtBr, and Then with spm^{4+} ^a

C_{EtBr}	$C_{\text{EtBr}}/C_{\text{sp}}$	DNA molecules measured	% with s-r pattern
zero (only spm^{4+})	zero	12	~ 92%
10 μM	5.2	10	~ 90%
15 μM	7.7	17	~ 18%
21 μM	10.8	13	~ 8%

^aObserve that, for $C_{\text{EtBr}} \leq 10 \mu\text{M}$, the fraction is very high (> 90%), but for $C_{\text{EtBr}} \geq 15 \mu\text{M}$ the fraction drastically decreases, reaching ~18% for 15 μM and ~8% for 21 μM .

200 μM of spm^{4+} , in order to verify the influence of the concentration of the condensing agent on the results obtained. We have found no significant changes in the behavior of the force curves in these two spm^{4+} concentrations (results not shown).

EtBr Has Little Effect on Previously Formed DNA- spm^{4+} Condensates, Even at High Concentrations. From the results shown in Figure 1 and in Table 1, it is clear that DNA molecules previously intercalated by EtBr are less prone to be condensed by spm^{4+} . A natural question that arises from this conclusion is about the affinity of EtBr for previously condensed DNA molecules. As pointed before, this is an important question since *in vivo* the DNA molecules remains strongly condensed during a large amount of time.

To investigate this issue, we exchange the order of usage of the ligands in the previous experiments, i.e., we first condense the DNA molecule with spm^{4+} at 100 μM , waiting ~20 min for equilibration, and then use EtBr at various different concentrations, in order to verify the effect of the intercalator on the DNA condensates. Before performing the stretching experiments, we wait at least 15 min for EtBr to equilibrate with the DNA condensates.

Under these conditions, we have found that most DNA condensates do not lose the stick-release pattern, even for concentrations of EtBr as high as 50 μM . We have verified only a slight increase of the maximum extension measured before the first peak of the stick-release pattern as the EtBr concentration increases, as shown in Figure 2. Table 2 outlines the results obtained. These results strongly indicate that EtBr intercalation in previously formed cation-induced DNA condensates is a bit more difficult than regular intercalation in disperse DNA. In fact, in most cases EtBr only partially unfolds the DNA molecules previously condensed by spm^{4+} , as can be seen in the data of Table 2.

The results of the two different types of experiments can be understood by considering two different points: (a) From the point of view of the mechanical properties of the DNA–intercalator complexes, the fact that the intercalator has prevented the condensation process is an indication that this ligand is increasing the DNA persistence length when bound, a result previously pointed out in some works,^{23–27} thus increasing the energy necessary to form the pronounced bendings presented by the DNA condensates. It is important, however, to point out that there are some authors who have found that intercalators can decrease the DNA persistence length.^{28,29} In our opinion the decrease of this parameter is probably related to partial DNA denaturation due to the repeated stretching applied to perform the experiments, as discussed in refs 23–25 and also depends on the experimental

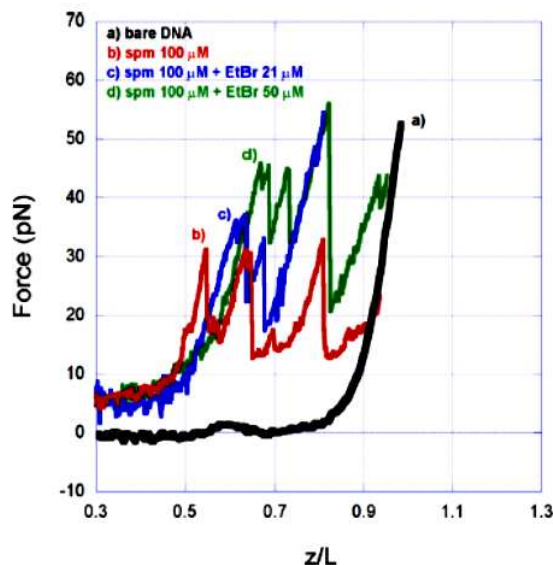


Figure 2. Force $\times$ extension curves for various concentrations of EtBr, when the drug interacts with DNA molecules previously condensed with spm^{4+} at 100 μM . Most DNA condensates do not lose the stick-release pattern, even for concentrations of EtBr as high as 50 μM , indicating that EtBr has little effect on previously formed DNA- spm^{4+} condensates.

Table 2. Total Number of Different DNA Molecules Measured in Each Concentration, and the Fraction of Them That Exhibits the Stick-Release (s-r) Behavior, for DNA Treated Firstly with spm^{4+} , and Then with EtBr^a

C_{EtBr}	$C_{\text{EtBr}}/C_{\text{sp}}$	DNA molecules measured	% with s-r pattern
zero (only spm^{4+})	zero	12	~ 92%
21 μM	10.8	7	~ 85%
30 μM	15.5	9	~ 78%
50 μM	25.8	18	~ 78%

^aOnly a relatively small fraction of DNA molecules have lost the stick-release pattern, even for concentrations as high as 50 μM . These results strongly indicate that EtBr intercalation in previously cation-induced DNA condensates is a bit more difficult than regular intercalation in disperse DNA.

conditions used (buffer composition, regime of maximum forces used to stretch the complexes, etc.). Another evidence for such conclusion is the fact that most authors who have measured the persistence length of DNA–intercalator complexes with nonstretching techniques (fluorescence microscopy, electron microscopy, light scattering, viscosimetry, etc.) have found that intercalators in general increase the DNA persistence length.^{25–27} Albeit more research is clearly needed to investigate the contradictory results stated above, the results of the present work suggests that EtBr has really increased the persistence length of disperse DNA when bound, thus hindering condensation. (b) On the other hand, when the DNA molecules are first condensed, the accessible free space for EtBr to reach an intercalation site is considerably reduced, because of the strong DNA compaction. In fact, for the DNA- spm^{4+} complexes under experimental conditions similar to ours, the interhelical spacing (axis-to-axis distance) inside the condensates is only about 28.2 Å.³⁰ Observe that, since the diameter of the B-DNA helix is about 20 Å and the major diameter of the EtBr molecule is about 10 Å,³¹ it is really

expected that the intercalator will not have access to most intercalation sites inside the condensates. Finally, one can ask about the electrostatic competition involved in such phenomenon, since both spm^{4+} and EtBr are cationic molecules. We do not believe that such effect is the most important, since the negative charge density along the double-helix remains essentially constant even after ligand binding, due to the rearrangement of the counterions.³²

EtBr Hinders DNA ψ -Condensation at High Concentrations. We have also investigated the effect of EtBr in hindering DNA ψ -condensation by performing the same type of experiments described for the cation-induced condensates, replacing spm^{4+} by PEG 8000 at 20% in mass. We have used $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ in all experiments with PEG. Figure 3 shows

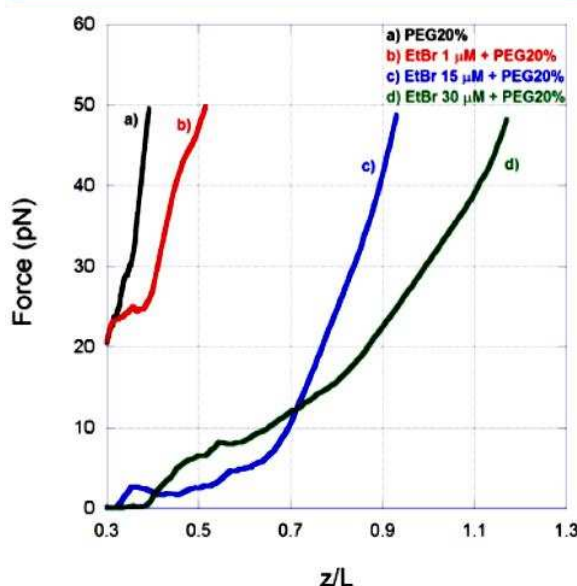


Figure 3. Force $\times$ extension curves for various concentrations of EtBr, maintaining the PEG concentration fixed in 20% in mass. These experiments were performed first adding EtBr, and then PEG to investigate the effect of the intercalator in the formation of DNA condensates. If one uses only PEG without EtBr, in our experimental conditions, the DNA molecules appear strongly condensed, reaching a relative extension of only $z/L \sim 0.4$ at $\sim 50 \text{ pN}$ (curve a). As the EtBr concentration increases, the maximum extensions achieved in the stretching experiments approach the contour length, indicating that EtBr hinders DNA ψ -condensation by PEG.

the results obtained. If one uses only PEG, without EtBr, the DNA molecules appear strongly condensed, reaching a relative extension of only $z/L \sim 0.4$ at $\sim 50 \text{ pN}$ (curve a). As the EtBr concentration increases, the maximum extensions achieved in the stretching experiments approach the contour length, indicating that EtBr hinders DNA ψ -condensation by PEG. In this sense, this is the same qualitative behavior found for spm^{4+} , albeit with a major difference: in the case of ψ -condensation, we have not found any stick-release pattern, even for condensates without EtBr. This fact is certainly related to the differences in the two types of condensation processes: while in ψ -condensation the depletion interactions between DNA segments and PEG drive the condensation process,⁵ in cation-induced DNA condensation spm^{4+} acts promoting DNA segment–segment attraction due to the multivalent ion–ion positional correlations.⁶

Finally observe that, resembling the case of spm^{4+} , at the lowest DNA extensions used in this experiment ($z/L \sim 0.3$), the force curves for low EtBr concentrations (curves a and b) have a considerable value of the force (in this case $\sim 20 \text{ pN}$). As pointed before, this fact indicates that the DNA molecules are strongly condensed by the action of PEG.²² For higher EtBr concentrations (curves c and d), the force at $z/L \sim 0.3$ is nearly zero, indicating that EtBr really hinders DNA ψ -condensation. To achieve these results, we have tested ~ 3 different DNA molecules at each EtBr concentration, and the results are well reproducible.

EtBr Unfolds DNA–PEG Condensates at High Concentrations. One can also ask about the influence of EtBr in previously formed DNA ψ -condensates. We have also investigated this issue in the same way as described for the cation-induced condensates. In Figure 4 we show the results

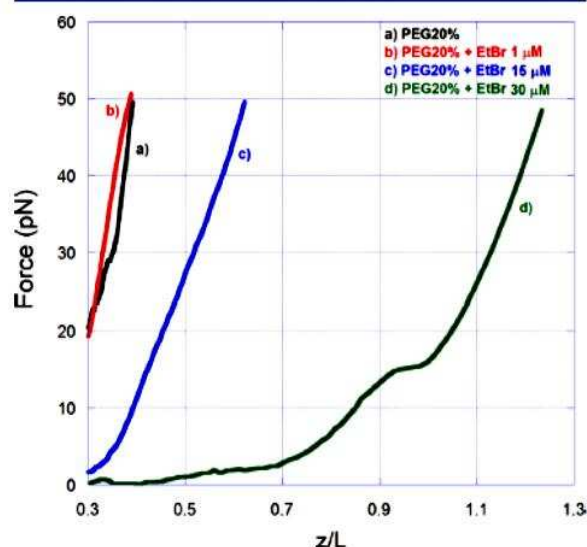


Figure 4. Force $\times$ extension curves for various concentrations of EtBr, when the drug interacts with previously ψ -condensed DNA molecules. The PEG concentration was fixed in 20% in mass. The complexes are decondensed as the EtBr concentration increases, indicating that EtBr is able to intercalate in the DNA ψ -condensates.

obtained for some EtBr concentrations, maintaining the PEG concentration fixed. Observe that the ψ -condensates are unfolded as the EtBr concentration increases, indicating that EtBr is capable to intercalate in the DNA ψ -condensates.

These results are qualitatively similar to those present in Figure 3, indicating that EtBr intercalation is much more efficient in previously formed ψ -condensates than in cation-induced condensates. Such difference is related to the fact that the interhelical spacing (axis to axis) inside the ψ -condensates under our experimental conditions (osmotic pressure about 7.8 atm^{33}) is about $34 \text{ \AA}$,³⁴ $\sim 20\%$ higher than the corresponding value obtained in the case of DNA- spm^{4+} complexes. Given the size of the EtBr molecule ($\sim 10 \text{ \AA}$), such difference in the interhelical spacing of the two types of condensates is sufficient to allow the intercalator to have access to more DNA base-pairs in the case of ψ -condensates, therefore increasing the probability of intercalation.

Gel Electrophoresis Results. In order to confirm the results obtained by the force spectroscopy, we have performed the electrophoresis experiments by using a procedure similar to

the one described for the force spectroscopy experiments, first studying the effect of EtBr in hindering DNA condensation and then the interaction of the intercalator with previously condensed DNA molecules. To perform this task, we have prepared four different series of samples, shown in Figures 5a,b and 6a,b.

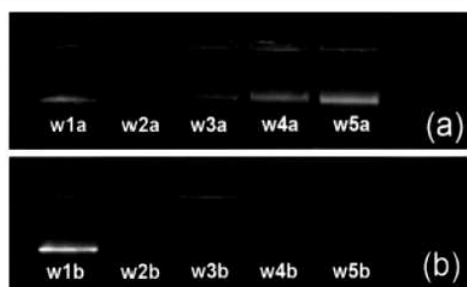


Figure 5. (a) From the left to right, the first well (w1a) contains only bare DNA, the second well (w2a) contains DNA only with spm^{4+} , and from the third (w3a) to the fifth (w5a) well we have DNA previously intercalated with increasing EtBr concentrations and then subjected to the condensing agent spm^{4+} . When no EtBr is used before the spm^{4+} (w2a), almost all DNA molecules were condensed, and therefore a very low DNA concentration is observed in the gel. On the other hand, as the EtBr concentration increases, the number of DNA molecules in the gel increases accordingly. (b) We have used exactly the same concentrations of EtBr and of spm^{4+} , exchanging the order of application of these ligands. Observe that in this case, only low DNA concentrations are observed in the gel, even for the highest EtBr concentration (w5b), indicating that the intercalator has little effect in unfolding the previously formed DNA- spm^{4+} condensates.

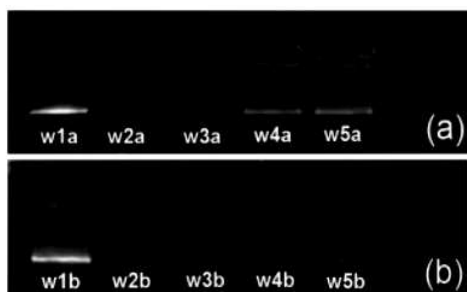


Figure 6. (a) From the left to right, the first well (w1a) contains only bare DNA, the second well (w2a) contains DNA only with PEG 20%, and from the third (w3a) to the fifth (w5a) well, we have DNA previously intercalated with increasing EtBr concentrations and then subjected to the condensing agent PEG 20%. (b) We have used exactly the same concentrations of EtBr and of PEG, exchanging the order of application of these ligands. Observe that the qualitative behavior of the two different series is very similar, indicating that EtBr is capable of intercalating in previously condensed DNA when PEG is the condensing agent, in qualitative agreement with the results obtained from force spectroscopy.

In the Figure 5a series, the samples were prepared first mixing the buffer and the DNA molecules, followed by the intercalator at a different concentration for each sample, and finally by the condensing agent spm^{4+} at 100 μM . Before adding spm^{4+} , EtBr was allowed to equilibrate with the DNA molecules for ~ 15 min. After the addition of the condensing agent, we also wait ~ 20 min for sample equilibration. Then, each sample was centrifuged at 14,000 rpm for 20 min. The centrifugation procedure allows one to separate the DNA molecules that have

condensed, which sink down, from the DNA molecules that have not condensed, which remain disperse in solution.¹⁸ Therefore, after the centrifugation we use a pipet to take the supernatant (75% of the volume), discarding the bottom part of the sample, which contains almost all the molecules that have condensed. We then add the gel loading buffer (5 μL) to the supernatant (15 μL) and finally apply this final solution into the wells of the gel. The power supply was set to 55 V during ~ 3 h. After this time, the gel is revealed in the transilluminator. Observe that, since the gel contains EtBr in its composition, all DNA molecules will be stained by EtBr during the run, allowing visualization. The EtBr concentration in the gel is high enough to saturate all DNA-intercalating sites and do not affect the conclusions about the number of DNA molecules deposited in each well (the quantity we want to measure), since this quantity is determined by the sample preparation procedure before the electrophoresis, as explained above.

The result is shown in Figure 5a: from the left to right, the first well (w1a) contains only bare DNA (control sample), the second well (w2a) contains DNA only with spm^{4+} , and from the third (w3a) to the fifth (w5a) well we have DNA previously intercalated with increasing EtBr concentrations and then subjected to the condensing agent spm^{4+} , as previously explained. Observe that, when no EtBr is used before using spm^{4+} (w2a), almost all DNA molecules were condensed, and therefore a very low DNA concentration is observed in the gel. On the other hand, as the EtBr concentration increases, the number of DNA molecules in the gel increases accordingly, in qualitative agreement to the results obtained from force spectroscopy.

In Figure 5b, we have used exactly the same concentrations of EtBr and of spm^{4+} , exchanging the order of mixture of these ligands. Observe that in this case, only very low DNA concentrations are observed in the gel even for the highest EtBr concentration (w5b). Therefore, we conclude that the intercalator has little effect in unfolding the previously formed DNA- spm^{4+} condensates, in qualitative agreement with the force spectroscopy results. The ratios of EtBr concentration per DNA-base-pair concentration ($C_{\text{EtBr}}/C_{\text{bp}}$) used in each well were compatible to those used in force spectroscopy experiments (see tables below).

To put the comparison between the two techniques in a more quantitative basis, we have measured in Figure 5a,b the mean contrast of each DNA band, which is proportional to the DNA concentration in the band. The mean contrast $\langle \xi \rangle$ was calculated by

$$\langle \xi \rangle = \frac{\langle I_b \rangle - \langle I_0 \rangle}{\langle I_0 \rangle} \quad (1)$$

where $\langle I_b \rangle$ is the mean intensity of the band, and $\langle I_0 \rangle$ is the mean intensity of the surrounding background. The mean intensities were measured as the mean gray levels by using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

To estimate the DNA fraction in each band, we consider that the contrast of the first well of each series (w1a, w1b) corresponds to 100% uncondensed DNA (reference band), since these bands correspond to the bare DNA samples, in which no condensation occurs. The fraction of uncondensed DNA in the other bands is then obtained by dividing the contrast of the respective band by the contrast of the reference band. With this procedure, we have a precise estimate of the fraction of condensed DNA molecules in each sample.

Table 3 show the results obtained for the spm^{4+} condensates. As explained before we consider that, for the bare DNA, all the

Table 3. Fraction of Condensed DNA Molecules Obtained in the Electrophoresis Experiments of the spm^{4+} Condensates^a

$C_{\text{EtBr}}/C_{\text{bp}}$	condensed DNA (Figure 5a)	condensed DNA (Figure 5b)
zero (only spm^{4+})	~ 93%	~ 94%
5.2	~ 74%	~ 87%
10.8	~ 58%	~ 88%
21.6	~ 39%	~ 88%

^aWhen EtBr is used first (Figure 5a series), the fraction of condensed DNA molecules decreases as the EtBr concentration increases. When spm^{4+} is used first (Figure 5b series), almost all DNA molecules condense, in agreement with the results obtained from force spectroscopy.

molecules remain disperse in solution after centrifugation. Therefore, to estimate the fraction of condensed DNA for each well, we simply compare the mean contrast of the respective band to the contrast of the bare DNA band (control). Observe that, when EtBr is used first (Figure 5a series), the fraction of condensed DNA molecules decreases as the EtBr concentration increases. On the other hand, when spm^{4+} is used first (Figure 5b series), almost all DNA molecules condense, in agreement with the results obtained from force spectroscopy.

In Figure 6a,b we show the equivalent series of Figures 5a,b for the PEG-induced ψ -condensates. Observe that the qualitative behavior of the two different series is very similar, i.e., there is not a critical difference between the two series like in the case of spm^{4+} , in agreement with the results obtained from force spectroscopy. This result strongly indicates that the intercalator is much more efficient in intercalating the ψ -condensates than the spm^{4+} condensates.

In Table 4 we present the fractions of condensed DNA in each well. Observe that the two series are really similar. The

Table 4. Fraction of Condensed DNA Molecules Obtained in the Electrophoresis Experiments of the PEG-Induced ψ -Condensates^a

$C_{\text{EtBr}}/C_{\text{bp}}$	condensed DNA (Figure 6a)	condensed DNA (Figure 6b)
zero (only PEG)	~96%	~98%
0.5 (1 μM EtBr in force spect.)	~97%	~99%
7.8 (15 μM EtBr in force spect.)	~72%	~89%
15.6 (30 μM EtBr in force spect.)	~71%	~75%

^aObserve that the two series are similar. The fact that the fraction of condensed DNA has reached the measured lowest value (~70%) at a lower concentration ($C_{\text{EtBr}}/C_{\text{bp}} = 7.8$) for the Figure 6a series is maybe an evidence that disperse DNA is more favorable for EtBr intercalation even in the case of ψ -condensation.

fact that the fraction of condensed DNA has reached the measured lowest value (~70%) at a lower concentration ($C_{\text{EtBr}}/C_{\text{bp}} = 7.8$) for the Figure 6a series is maybe an evidence that disperse DNA is more favorable for drug intercalation even in the case of ψ -condensation.

Finally, observe that the results obtained from the two very different techniques (force spectroscopy and gel electrophoresis) agree very well even quantitatively speaking. The

only significant difference found in the results obtained from the two techniques is that, apparently, the EtBr efficiency in hindering DNA cation-induced condensation as measured by force spectroscopy is considerably higher than the one measured by gel electrophoresis, as can be seen by comparing the last column of Table 1 with the second column of Table 3. Nevertheless, such conclusions should be drawn with caution, since there are important differences between the two types of experiments performed:

- In force spectroscopy, we have measured the fraction of DNA molecules which have presented the stick-release pattern in the force $\times$ extension curves (see Tables 1 and 2). As discussed, this pattern is an indication that some condensation has occurred, but some partially condensed DNA can exhibit such pattern in force spectroscopy and remain disperse in solution after centrifugation in the electrophoresis experiments.
- The number of different DNA molecules measured by force spectroscopy (typically 10 to 20 for each concentration) is very small if compared to the number used in the gel electrophoresis (typically $\sim 10^{12}$ molecules for each band). Therefore, the fraction of condensed molecules presented in Tables 1 and 2 is maybe not statistically significant.
- Surface effects may contribute to DNA condensation in force spectroscopy experiments, since DNA molecules stays confined very close to the glass surface in the case of these experiments.

CONCLUSIONS

We have investigated the influence of the intercalator EtBr in both cation-induced and ψ DNA condensates, by performing two different types of experiments. First, we treat disperse DNA in solution with EtBr, and then use the condensing agents in order to investigate the effect of the intercalator in hindering the condensing process. Second, we condense DNA and then use the intercalator in order to verify its effect in unfolding the previously condensed DNA.

It was shown that EtBr is efficient in hindering both cation-induced and ψ -condensation when previously intercalated in disperse DNA. From the point of view of the mechanical properties of the DNA-intercalator complexes, the fact that EtBr has prevented the condensation process is an indication that this ligand is increasing the DNA persistence length when bound, thus increasing the energy necessary to form the pronounced bendings presented by the DNA condensates. This aspect explains why disperse DNA molecules previously intercalated by EtBr are less prone to condensate.

On the other hand, when the DNA molecules are first condensed, we have found that EtBr has little effect on the cation-induced condensates, only slightly unfolding them, but it is much more efficient in unfolding the ψ -condensates. The difference in the interhelical spacing inside the two types of condensates is probably related to this fact, since in the ψ -condensates the free space between adjacent DNA segments is about 20% larger.

Finally, among the perspectives of this work, we plan to repeat these experiments using other intercalators and other condensing agents, in order to verify the generality of the results and conclusions drawn here. Also, we plan to investigate the hysteresis presented by such force curves when stretching and relaxing the DNA, an aspect not investigated in the present

work. Some authors have reported that DNA condensates in general exhibit hysteresis in the stretching-relaxing curves,^{22,35–37} thus it would be interesting to investigate the effects of the intercalator on such results.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: esio@ufv.br; Phone: +55 (31)3899-3442; Fax: +55 (31)3899-2483.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

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), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), and Fundação Arthur Bernardes - Universidade Federal de Viçosa (FUNARBE-UFV).

REFERENCES

- (1) Lerman, L. S. A Transition to a Compact Form of DNA in Polymer Solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1971**, *68*, 1886–1890.
- (2) Gosule, L. C.; Schellman, J. A. Compact Form of DNA Induced by Spermidine. *Nature* **1976**, *259*, 333–335.
- (3) Bloomfield, V. A. DNA Condensation by Multivalent Cations. *Biopolymers* **1997**, *44*, 269–282.
- (4) de Vries, R. DNA Compaction by Nonbinding Macromolecules. *Polymer Sci. C* **2012**, *54*, 30–35.
- (5) Asakura, S.; Oosawa, F. On The Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 1255–1256.
- (6) Jensen, N. G.; Mashl, R. J.; Bruinsma, R. F.; Gelbart, W. M. Counterion-Induced Attraction between Rigid Polyelectrolytes. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 2477–2480.
- (7) Arscott, P. G.; Li, A. Z.; Bloomfield, V. A. Condensation of DNA by Trivalent Cations. 1. Effects of DNA Length and Topology on the Size and Shape of Condensed Particles. *Biopolymers* **1990**, *30*, 619–630.
- (8) Plum, G. E.; Arscott, P. G.; Bloomfield, V. A. Condensation of DNA by Trivalent Cations. 2. Effects of Cation Structure. *Biopolymers* **1990**, *30*, 631–643.
- (9) Martin, A. L.; Davies, M. C.; Rackstraw, B. J.; Roberts, C. J.; Stolnik, S.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M. Observation of DNA-Polymer Condensate Formation in Real Time at a Molecular Level. *FEBS Lett.* **2000**, *480*, 106–112.
- (10) Bloomfield, V. A. DNA Condensation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 334–341.
- (11) Widom, J.; Baldwin, R. L. Inhibition of Cation-Induced DNA Condensation by Intercalating Dyes. *Biopolymers* **1983**, *22*, 1621–1632.
- (12) Yoshikawa, Y.; Yoshikawa, K.; Kanbe, T. Daunomycin Unfolds Compactly Packed DNA. *Biophys. Chem.* **1996**, *61*, 93–100.
- (13) Yoshinaga, N.; Akitaya, T.; Yoshikawa, K. Intercalating Fluorescence Dye YOYO-1 Prevents the Folding Transition in Giant Duplex DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *286*, 264–267.
- (14) Amitani, I.; Liu, B.; Dombrowski, C. C.; Baskin, R. J.; Kowalczykowski, S. C. Watching Individual Proteins Acting on Single Molecules of DNA. *Methods Enzymol.* **2010**, *472*, 261–291.
- (15) Raspaud, E.; de la Cruz, M. O.; Sikorav, J. L.; Livolant, F. Precipitation of DNA by Polyamines: A Polyelectrolyte Behavior. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 381–393.
- (16) Vasilevskaya, V. V.; Khokhlov, A. R.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K. Collapse of Single DNA Molecule in Poly(ethylene glycol) Solutions. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 6595–6602.
- (17) Ramos, E. B.; de Vries, R.; Neto, J. R. DNA Ψ -Condensation and Reentrant Decondensation: Effect of the PEG Degree of Polymerization. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23661–5.
- (18) Murphy, L. D.; Zimmerman, S. B. Macromolecular Crowding Effects on the Interaction of DNA with *Escherichia coli* DNA-Binding Proteins: A Model for Bacterial Nucleoid Stabilization. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1219*, 277–284.
- (19) Crisafulli, F. A. P.; Cesconetto, E. C.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. DNA–Cisplatin Interaction Studied with Single Molecule Stretching Experiments. *Integr. Biol.* **2012**, *2012*, 568–574.
- (20) Cesconetto, E. C.; Junior, F. S. A.; Crisafulli, 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. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 11070–11077.
- (21) Chaurasiya, K. R.; Paramanathan, T.; McCauley, M. J.; Williams, M. C. Biophysical Characterization of DNA Binding from Single Molecule Force Measurements. *Phys. Life Rev.* **2010**, *7*, 299–341.
- (22) Baumann, C. G.; Bloomfield, V. A.; Smith, S. B.; Bustamante, C.; Wang, M. D.; Block, S. M. Stretching of Single Collapsed DNA Molecules. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1965–1978.
- (23) Rocha, M. S. Modeling the Entropic Structural Transition of DNA Complexes Formed with Intercalating Drugs. *Phys. Biol.* **2009**, *6*, 036013.
- (24) Rocha, M. S.; Lúcio, A. D.; Alexandre, S. S.; Nunes, R. W.; Mesquita, O. N. DNA–Psoralen: Single-Molecule Experiments and First Principles Calculations. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *95*, 253703.
- (25) Reis, L. A.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. DNA Interaction with Diaminobenzidine Studied with Optical Tweezers and Dynamic Light Scattering. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 14345–14350.
- (26) Quake, S. R.; Babcock, H.; Chu, S. The Dynamics of Partially Extended Single Molecules of DNA. *Nature* **1997**, *388*, 151–154.
- (27) Yoshikawa, K.; Matsuzawa, Y.; Minagawa, K.; Doi, M.; Matsumoto, M. Opposite Effect between Intercalator and Minor Groove Binding Drug on the Higher Order Structure of DNA as Is Visualized by Fluorescence Microscopy. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 1274–1279.
- (28) Sischa, A.; Toensing, K.; Eckel, R.; Wilking, S. D.; Sewald, N.; Rios, R.; Anselmetti, D. Molecular Mechanisms and Kinetics between DNA and DNA Binding Ligands. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 404–411.
- (29) Lipfert, J.; Klijnshout, S.; Dekker, N. H. Torsional Sensing of Small-Molecule Binding Using Magnetic Tweezers. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7122–7132.
- (30) Raspaud, E.; Durand, D.; Livolant, F. Interhelical Spacing in Liquid Crystalline Spermine and Spermidine-DNA Precipitates. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 392–403.
- (31) Itou, H.; Shirakihara, Y.; Tanaka, I. Crystal Structures of the Multidrug Binding Repressor *Corynebacterium glutamicum* CgmR in Complex with Inducers and with an Operator. *J. Mol. Biol.* **2010**, *403*, 174–184.
- (32) Friedman, R. A. G.; Manning, G. S. Polyelectrolyte Effects on Site-Binding Equilibria with Application to the Intercalation of Drugs into DNA. *Biopolymers* **1984**, *23*, 2671–2714.
- (33) Parsegian, V. A.; Rand, R. P.; Fuller, N. L.; Rau, D. C. Osmotic Stress for the Direct Measurement of Intermolecular Forces. *Meth. Enzymol.* **1986**, *127*, 400–416.
- (34) Rau, D. C.; Lee, B.; Parsegian, V. A. Measurement of the Repulsive Force between Polyelectrolyte Molecules in Ionic Solution: Hydration Forces between Parallel DNA Double Helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 2621–2625.
- (35) Husale, S.; Grange, W.; Karle, M.; Bürgi, S.; Hegner, M. Interaction of Cationic Surfactants with DNA: A Single-Molecule Study. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1443–1449.
- (36) Murayama, Y.; Wada, H.; Sano, M. Dynamic Force Spectroscopy of a Single Condensed DNA. *Europhys. Lett.* **2007**, *79*, 58001.
- (37) van den Broek, B.; Noom, M. C.; van Mameren, J.; Battle, C.; MacKintosh, F. C.; Wuite, G. J. L. Visualizing the Formation and Collapse of DNA Toroids. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 1902–1910.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CANTOR, C. R. AND SCHIMMEL, P. R.; **“Biophysical Chemistry”**. W. H. Freeman, 1st ed. (1980).
- [2] 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).
- [3] WATSON, J. D. and CRICK, F. H. C.; **“Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid”**. Nature 171 (4361), 964–967 (1953).
- [4] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; **“Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria”**. Science, 235, 1517–1520, 1987.
- [5] ASHKIN, A., DZIEDZIC, J. M. and YAMANE T.; **“Optical trapping and manipulation of single cells using infrared-laser beams”**. Nature, 330, 769-771, 1987.
- [6] NEUSA, M. J. S., NADIR, F. e DEME´TRIO D.; **“A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA”**. Ciência e Educação, 11, 223-233, 2005.
- [7] ADAMS, R. L. P., KNOWLER, T. J., LEADER, P. D.; **“The biochemistry of the nucleic acids”**. 11th Ed., Chapman & Hall Ltd, 1992.
- [8] ASHKIN, A.; **“Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers”**. P.Natl. Acad. Sci. USA 94, 4853–4860, 1997.
- [9] 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.
- [10] BLOOMFIELD, V. A.; **“DNA Condensation by Multivalent Cations”**. Biopolymers 44 (3), 269–282 (1997).
- [11] WIDOM, J., BALDWIN, R. L.; **“Inhibition of cation-induced DNA condensation by intercalating Dyes”**. Biopolymers.22, 1621–1632(1983).
- [12] YOSHIKAWA, Y., YOSHIKAWA, K., KANBE, T.; **“Daunomycin unfolds compactly packed DNA”**. Biophys. Chem. 61, 93–100(1996).
- [13] YOSHINAGA, N., AKITAYA, T., YOSHIKAWA, K.; **“Intercalating fluorescence Dye YOYO-1 prevents the folding transition in giant duplex DNA”**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001, 286, 264–267.

- [14] ASHKIN, A.; **“Acceleration and trapping of particles by radiation pressure”**. Phys. Rev.Lett., 24, 156-159, 1970.
- [15] ASHKIN, A. and DZIEDZIC, J. M.; **“Optical levitation by radiation pressure”**. Appl.Phys. Lett. 19, 283-85, 1971.
- [16] BOAL, D. **“Mechanics of the Cell”** (2002) *Cambridge University Press*
- [17] ASHKIN, A., DZIEDZIC, J. M., BJORKHOLM, J. E., CHU, S.; **“Observation of a singlebeam gradient force optical trap for dielectric particles”**. Opt. Lett., 11, 288-290, 1980.
- [18] ROCHA, M. S.; **“Pinças ópticas: Experimento e Teoria”**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2004.
- [19] 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.
- [20] NETO, P. A. M. and NUSSENZVEIG, H. M.; **“Theory of optical tweezers.”** Europhys. Lett. 50 (5), 702–708 (2000).
- [21] 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).
- [22] GRIFFITHS, A. J. F., WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C., GELBART, W. M., SUZUKI, D. T., MILLER, J. H.; **“Introdução à Genética”**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- [23] DAHM, R.; **“Friedrich Miescher and the discovery of DNA”**. Developmental Biology, 278, 274-288, 2005
- [24] SILVA, E. F. da.; **“Estudo da Interação DNA-HOESCHT (33258) por pinçamento óptico”**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, Julho de 2013.
- [25] DAUNE, M.; **“Molecular Biophysics: Structures in Motion”**. InterEditions, Paris, 1993. Translated by Duffin, W. J., Oxford Universit Press, New York, US, 1999.
- [26] ZAHA, A, FERREIRA, H. B. & PASSAGLIA, L. **“Biologia Molecular Básica”**. 5ª ed. Porto Alegre, Editora Mercado Aberto, 2014.
- [27] ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., et al. **“Molecular Biology of the Cell”**. 4 ed: Garlands Publishing Inc. New York. USA 2002.
- [28] FERREIRA, M. C. G. M.; **“Estudo da transição entrópica do DNA induzida por intercalantes utilizando a técnica de pinçamento óptico e espectroscopia de autocorreção de intensidades”**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2007.

- [29] RAJAGOPALA, S. V., CASJENS, S., UETZ, P.; **“The protein interaction map of bacteriophage lambda”**. BMC Microbiology, 11, 2011.
- [30] NETO, J. C.; **“Medida da Elasticidade Entrópica de Uma Molécula de DNA”**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2001.
- [31] MARKO, J. F. and SIGGIA, E. D.; **“Stretching DNA”**. Macromolecules, 28 (26), 8759–8770, 1995.
- [32] SISCHKA, A., TOENSING, K., ECKEL, R., WILKING, S. D., SEWALD, N., RIOS, R., AND ANSELMETTI, D.; **“Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands”**. Biophys. J. 88 (1), 404–411 (2005).
- [33] USSERY, D. W., HOEPFNER, R. W., AND SINDEN, R. R.; **“Probing DNA-structure with Psoralen in vitro”**. Method. Enzymol. 212, 242–262 (1992).
- [34] ROCHA, M. S., VIANA, N. B., AND MESQUITA, O. N.; **“DNA-psoralen interaction: A single molecule experiment”**. J. Chem. Phys. 121 (19), 9679–9683 (2004).
- [35] ROCHA, M. S. AND MESQUITA, O. N.; **“Variation of entropic elasticity of DNA-Psoralen complex under UV light”**. In P. SPIE 5930 (593011), pp. 265–273 (2005).
- [36] Ph. Wahl, J. Paoletti, J. -B. Le Pecq 1970 **“Decay of fluorescence emission anisotropy of the ethidium bromide-DNA complex evidence for an internal motion of DNA Proceedings of National Academy of Sciences”** 65 417-421
- [37] P.O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, G. A. Manukyan e A. T. Karapetian 2001 **“Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA Experimental and Molecular Medicine”** 33 205-208
- [38] KUSANO, T. et al.; **“Polyamines: Essential Factors for Growth and Survival”**. Planta 228:367-381. (2008)
- [39] TABOR, C. W; TABOR, H.; **“ Polyamines”**. Annu. Rev. Biochem. 53, 749-790.
- [40] LERMAN, L. S.; **“A transition to a compact form of DNA in polymer solutions”**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1971, 68, 1886–1890.
- [41] ARSCOTT, P. G., LI, A. Z., AND BLOOMFIELD, V. A.; **“Condensation of DNA by trivalent cations. 1. Effects of DNA length and topology on the size and shape of condensed particles”**. Biopolymers 30, 619–630 (1990).
- [42] PLUM, G. E., ARSCOTT, P. G., AND BLOOMFIELD, V. A.; **“Condensation of DNA by trivalent cations. 2. Effects of cation structure”**. Biopolymers 30, 631–643 (1990).

[43] MARTIN, A. L., DAVIES, M. C., RACKSTRAW, B. J., ROBERTS, C. J., STOLNIK, S., TENDLER, S. J. B., AND WILLIAMS, P. M.; **“Observation of DNA-polymer condensate formation in real time at a molecular level”**. *FEBS Lett.* 480, 106–112 (2000).

[44] KEKWICK, R. A.; PEDERSEN, K. O. (1974). **“Arne Tiselius 1902-1971”**. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society* 20: 401-428. DOI:10.1098/rsbm.0018. PMID 11615762 (1974).

[45] FANGMAN W.; **“Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis”**. *Nucleic Acid Res* 1978; 5: 653-65.

[46] REIS, JOÃO B. A.; GOULART, SIMONE M.; SILVA, ROBSON da.; ANDRÉ FILHO, JOSÉ.; **“Construção de um Aparelho de Eletroforese de Baixo Custo”** III Encontro de Pesquisa de IES do Sistema Estadual de Minas Gerais-UNEC - Caratinga/MG (2007)

[47] RAMOS, E. B.; DE VRIES, R.; NETO, J. R.; **“DNA Ψ -Condensation and Reentrant Decondensation: Effect of the PEG Degree of Polymerization”**. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 23661–5.

[48] CRISAFULI, F.A.P.; **“Caracterização da interação DNA-Cisplatina usando pinça ótica e videomicroscopia”**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, 2012.

[49] CHAURASIYA, K. R.; PARAMANATHAN, T.; MCCAULEY, M. J.; WILLIAMS, M. C.; **“Biophysical Characterization of DNA Binding from Single Molecule Force Measurements”**. *Phys. Life Rev.* 2010, 7, 299–341.

[50] BAUMANN, C. G., BLOOMFIELD, V. A., SMITH, S. B., BUSTAMANTE, C., WANG, M. D., BLOCK, S. M.; **“Stretching of Single Collapsed DNA Molecules”**. *Biophys. J.* 2000, 78, 1965–1978.

[51] ROCHA, M. S.; **“Modeling the Entropic Structural Transition of DNA Complexes Formed with Intercalating Drugs”**. *Phys. Biol.* 2009, 6, 036013.

[52] YOSHIKAWA, K.; MATSUZAWA, Y.; MINAGAWA, K.; DOI, M.; MATSUMOTO, M.; **“Opposite Effect between Intercalator and Minor Groove Binding Drug on the Higher Order Structure of DNA as Is Visualized by Fluorescence Microscopy”**. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 1992, 188, 1274–1279.

[53] REIS, L. A.; RAMOS, E. B.; ROCHA, M. S.; **“DNA Interaction with Diaminobenzidine Studied with Optical Tweezers and Dynamic Light Scattering”**. *J. Phys. Chem. B* 2013, 117, 14345–14350.

[54] RASPAUD, E.; DURAND, D.; LIVOLANT, F.; **“Interhelical Spacing in Liquid Crystalline Spermine and Spermidine-DNA Precipitates”**. *Biophys. J.* 2005, 88, 392–403.

[55] ITOU, H.; SHIRAKIHARA, Y.; TANAKA, I.; **“Crystal Structures of the Multidrug Binding Repressor *Corynebacterium glutamicum* CgmR in Complex with Inducers and with an Operator”**. J. Mol. Biol. 2010, 403, 174–184.

[56] FRIEDMAN, R. A. G.; MANNING, G. S.; **“Polyelectrolyte Effects on Site-Binding Equilibria with Application to the Intercalation of Drugs into DNA”**. Biopolymers 1984, 23, 2671–2714.