

**JOSIANE APARECIDA DUARTE BATISTA**

**ESTUDO DO ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS DNA-FÁRMACOS POR  
UM POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

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

T

B333e  
2017  
Batista, Josiane Aparecida Duarte, 1989-  
Estudo do encapsulamento de compostos DNA-  
fármacos por um polipeptídeo recombinante / Josiane  
Aparecida Duarte Batista. - Viçosa, MG, 2017.  
x, 41f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador : José Ésio Bessa Ramos Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.35-41.

1. Fármaco - Nutrientes - Interações. 2. DNA.  
3. Eletroforese. 4. Substâncias de crescimento.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Física. Programa de Pós-graduação em Física Aplicada.  
II. Título.

CDD 22 ed. 572.86

**JOSIANE APARECIDA DUARTE BATISTA**

**ESTUDO DO ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS DNA-FÁRMACOS POR  
UM POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE**

**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:**

---

**Marcelo Lobato Martins**

**(Coorientador)**

---

**Anésia Aparecida dos Santos**

---

**Prof. José Ésio Bessa Ramos**

**(Orientador)**

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”.

*Confúcio*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta dissertação. Primeiramente a Deus, que me deu força e coragem para vencer todos os obstáculos para chegar até aqui e a oportunidade de estudar nesta instituição. Aos meus pais, Maria das Graças Duarte Batista e Manoel Batista Sobrinho, pelo amor e apoio incondicional no decorrer dessa etapa acadêmica.

À minha amada irmã, por me transmitir paz, amor, credibilidade, carinho, companheirismo, dedicação, pela paciência em ensinar tantas coisas essenciais neste meio acadêmico e, principalmente, pelo incentivo durante todos os momentos e também ao meu cunhado, Leandro.

A minha madrinha Denise, que sempre me incentivou a nunca desistir dos meus objetivos, por mais que me parecessem tão distantes e difíceis de serem alcançados.

Ao companheirismo, momentos de descontração e carinho das minhas amigas de república, Maiara Cazotti, Thaís Cristina, Thaís Pessoa e Joyce Salmaso.

Ao meu orientador José Ésio Bessa Ramos Júnior e aos meus coorientadores, Márcio Santos Rocha e Marcelo Lobato Martins, pela atenção contínua, ensinamentos, conselhos e principalmente pela confiança depositada durante todo este período de convivência. A professora Anésia Santos, por toda atenção e carinho durante os dias de pânico na busca de resultados.

Aos professores do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, pela contribuição expressiva à minha formação, em especial aos professores Sukarno Olavo Ferreira e Orlando Pinheiro da Fonseca Rodrigues, por terem sido atenciosos, presentes e dispostos a me ajudar quando foi preciso.

Aos meus amigos da Física Biológica, em especial aos meus queridos: Taty, Carlos, Rany, Sylvestre e Thiago Venzel, pelas orientações, convivências diárias, incentivos e sempre estenderam a mão quando eu mais precisei durante esses anos, também ao Ismael e o Paulo Henrique.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE GRÁFICOS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
Considerações Iniciais.....	1
Capítulo 2: DNA e seus ligantes .....	3
2.1 – Caracterização estrutural da molécula de DNA .....	3
2.2 - Interação eletrostática .....	9
2.3 - Intercalantes e Efeitos de Intercalação.....	10
2.3.1- Intercalação e Brometo de Etídio.....	10
2.3.2- Doxorubicina .....	11
2.3.3- Proteína C <sub>4</sub> K <sub>12</sub> .....	12
2.4 – A Técnica de Eletroforese .....	16
2.5 - Nanocarreadores e Efeito EPR.....	17
Capítulo 3: Materiais e Métodos .....	21
3.1 – Metodologia.....	21
3.2- Preparação das Soluções .....	23
Capítulo 4: Resultados e Discussões.....	24
Capítulo 5: Conclusões e Perspectivas.....	32
Apêndice A-Reação em cadeia da polimerase (PCR) -[17].....	33
Referências Bibliográficas .....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição de um nucleotídeo no DNA: Grupo fosfato $PO_4^-$ , uma pentose (açúcar desoxirribose) e uma base nitrogenada [1,2].....	3
Figura 2: As quatro bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos e os diferem entre si [54].....	4
Figura 3: Purina e Pirimidina [16].....	4
Figura 4: Pontes de hidrogênio formadas entre pares de bases nitrogenadas. Figura retirada de [60].....	5
Figura 5: Pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas e sentido da síntese da fita complementar, direção $5' \rightarrow 3'$ para uma ligação fosfodiéster de vários nucleotídeos [1, 2, 54].....	6
Figura 6: Formação da dupla hélice [1,2].....	7
Figura 7: Conformações do DNA.....	8
Figura 8: Estrutura química dos intercalantes [55].....	10
Figura 9: Brometo de Etídio, figura adaptada [2].....	11
Figura 10: Doxorrubicina - Figura adaptada [3].....	12
Figura 11: Doxorrubicina intercalando ao DNA - Figura adaptada [3].....	12
Figura 12: Diblocos da Proteína $C_4K_{12}$ . Bloco de estabilização coloidal e o bloco de ligação catiônica. Figura modifica de [4].....	14
Figura 13: Estrutura química dos aminoácidos presentes na Proteína $C_4K_{12}$ . Figura modifica de [17].....	15
Figura 14: Aplicação de nanocarreadores, em A, ilustração do mecanismo passivo e ativo e em B exemplos de nanocarreadores, funcionalização da superfície e as moléculas terapêuticas [69].....	18

Figura 15: Atuação de macromoléculas, ou seja, fármacos encapsulados, e pequenas moléculas, ou seja, fármacos livre, sobre a distinção devido ao tamanho desses, nos tecidos normais e em tecidos tumorais [71].....	19
Figura 16: Recipiente utilizado para formação do gel e poços de deposição, produção de um gel com 13 poços de alocação de solução.....	21
Figura 17: Cuba eletrolítica com soluções depositadas no gel, experimento em funcionamento.....	22
Figura 18: Comportamento da intensidade de fluorescência devido a competição da intercalação entre os fármacos Brometo de Etídio e Doxorubicina, para concentração fixa de Brometo de Etídio, $C_T = 1\text{mM}$ , e aumento da concentração de Doxorubicina.....	25
Figura 19: Comportamento da intensidade de fluorescência devido a competição da intercalação entre os fármacos Brometo de Etídio e Doxorubicina, para concentração fixa de Brometo de Etídio, $C_T = 1\text{mM}$ , e aumento gradual da concentração de Doxorubicina na presença do polipeptídeo $C_4K_{12}$ .....	27
Figura 20: Comparação das imagens da corrida do gel de agarose sem na ausência da proteína e na presença da proteína $C_4K_{12}$ .....	39
Figura 21. Figura Amplificação por PCR [17].....	34

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 – Razão da Intensidade de Fluorescência.....	28
Gráfico 2 – Razão entre a Variação de Fluorescência pela concentração.....	30

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Variação das Concentrações de Doxorubicina em relação ao DNA 3kbp.....	24
Tabela 2: Variação das Concentrações de Doxorubicina em relação ao DNA 3kbp, na presença da proteína C <sub>4</sub> K <sub>12</sub> .....	26

## RESUMO

BATISTA, Josiane Aparecida Duarte, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Estudo do encapsulamento de compostos DNA-Fármacos por um polipeptídeo recombinante.** Orientador: José Ézio Bessa Ramos Júnior. Coorientadores: Márcio Santos Rocha e Marcelo Lobato Martins.

Neste trabalho, utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose, foi possível estudar o revestimento de complexos DNA- fármacos pelo polipeptídeo C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>, assim como determinar a competição da intercalação dos fármacos Brometo de Etídio e Doxorubicina ao DNA. Com o intuito de estudar tal comportamento, medimos a intensidade da fluorescência do complexo DNA 3000 pares de base - Brometo de etídio, usado como parâmetro de intensidade de fluorescência a várias concentrações de Doxorubicina por par de bases do DNA. Observou-se que o aumento da concentração de Doxorubicina implica na expressiva diminuição da intensidade de fluorescência do Brometo de Etídio já intercalado ao DNA, resultado do deslocamento do Brometo de Etídio devido à intercalação da Doxorubicina. Outro fator relevante observado é a invariabilidade da fluorescência do complexo DNA - fármacos ao acrescentar a proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub> às mesmas concentrações de Doxorubicina, implicando o revestimento do complexo, pela proteína.

## ABSTRACT

BATISTA, Josiane Aparecida Duarte, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Study of Encapsulation of DNA-DRUG Compounds by a Recombinant Polipeptide.** Adviser: José Ézio Bessa Ramos Júnior. Co-advisers: Márcio Santos Rocha and Marcelo Lobato Martins.

In this work, using the technique of agarose gel electrophoresis, it was possible to study the coating of DNA-drug compound by the C<sub>4</sub>K<sub>12</sub> polypeptide, as well as determining the competition of the intercalation of the drugs Ethidium Bromide and Doxorubicin to the DNA. In order to study such behavior, we measured the fluorescence intensity of the DNA 3000 bp - Ethidium Bromide compound, used as a parameter of fluorescence intensity at various concentrations of Doxorubicin per base pair of DNA. It was observed that the increase of this Doxorubicin concentration implies in the expressive decrease in the fluorescence intensity of the Ethidium Bromide already intercalated to the DNA, resulting from the displacement of the Ethidium Bromide due to the intercalation of Doxorubicin. Another relevant factor observed is the invariability of the fluorescence of the DNA-drug compound when adding the C<sub>4</sub>K<sub>12</sub> protein to the same concentrations of Doxorubicin, implying the coating of the compound by the protein.

## Considerações Iniciais

Por ser o portador de toda a informação genética, o DNA vem despertando e aguçando o interesse de pesquisadores. Após sua determinação estrutural em 1953, realizada por Watson e Crick, muitas foram às descobertas e maiores ainda, foram suas implicações [1, 2, 16-18].

Entre tantas aplicações, a molécula de DNA vem sendo manipulada para a produção de nanodispositivos inteligentes, capazes de alcançar estruturas e funcionalidades específicas como no direcionamento de fármacos a tumores, entrega de genes terapêuticos e a permanência de quimioterápicos na corrente sanguínea, aumentando assim, a eficácia do tratamento e evitando a rápida eliminação destes pelo organismo. Uma das formas de modular esses nanotransportadores de fármacos por meio do revestimento de complexos DNA – ligantes, com a formação de agregados mediante a interação destes complexos com polipeptídeos [21-27].

A área de Física Biológica vem contribuindo de forma significativa na obtenção de informações sobre complexos DNA-ligantes. Neste trabalho, a técnica utilizada para tais estudos foi a Eletroforese em gel de agarose. Esta é uma técnica de múltiplas moléculas que permite estudar o comportamento da intercalação entre os fármacos e os pares de base da molécula de DNA, mediante análise de fluorescência [1].

O principal objetivo deste estudo, baseado na técnica de eletroforese em gel de agarose em que se mede o valor médio sobre um conjunto de grandezas, é a caracterização do revestimento da molécula de DNA e complexos DNA – fármacos pela interação do polipeptídeo recombinante ( $C_4K_{12}$ ), cuja interação é eletrostática [4]. Outro objetivo relevante deste trabalho é definir a competição entre intercalantes na molécula de DNA medida através da variação da intensidade de fluorescência dos complexos DNA – Brometo de Etídio, devido ao aumento da concentração de Doxorrubicina, por pares de base. Esta competição foi estudada com e sem a adição do polipeptídeo recombinante ( $C_4K_{12}$ ) [4, 29, 30].

Este trabalho está dividido em 5 capítulos. No capítulo seguinte, serão discutidas propriedades estruturais que formam e caracterizam o DNA, assim como características e propriedades dos intercalantes usados: a Doxorrubicina, o Brometo de Etídio e o polipeptídeo recombinante. Este polipeptídeo foi desenvolvido pelo grupo do professor

Renko de Vries, da Universidade de Wageningen, Holanda. Além disso, também são observados os princípios da técnica de eletroforese, a interação eletrostática e os nanocarreadores e o efeito EPR. No terceiro capítulo serão discutidos a preparação das amostras, as concentrações envolvidas e o procedimento dos experimentos. No quarto capítulo, têm-se a apresentação dos resultados experimentais obtidos, assim como as devidas discussões. E por fim, o último capítulo trata-se das conclusões e perspectivas para continuidade deste trabalho e também propostas para trabalhos futuros.

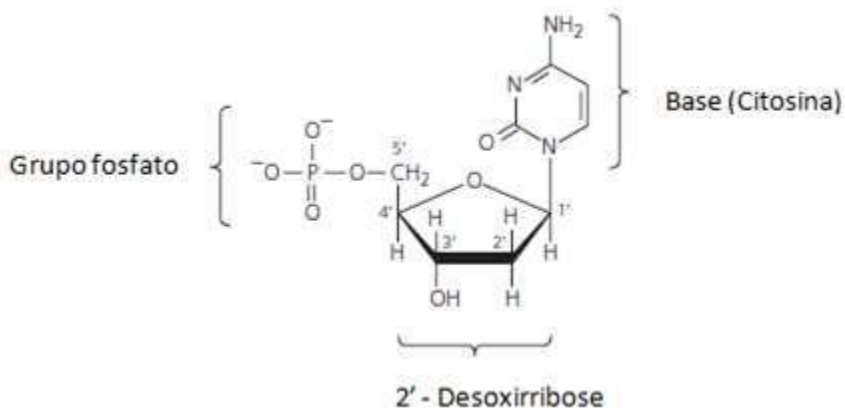
## Capítulo 2: DNA e seus ligantes

Neste capítulo apresentaremos algumas características da molécula de DNA e dos fármacos, Brometo de Etídio e Doxorrubicina e o polipeptídeo recombinante C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>. Além disso, é feita uma breve revisão da técnica de eletroforese em gel de agarose e da interação eletrostática da molécula de DNA, assim como uma sucinta discussão sobre os nanocarreadores e o efeito EPR.

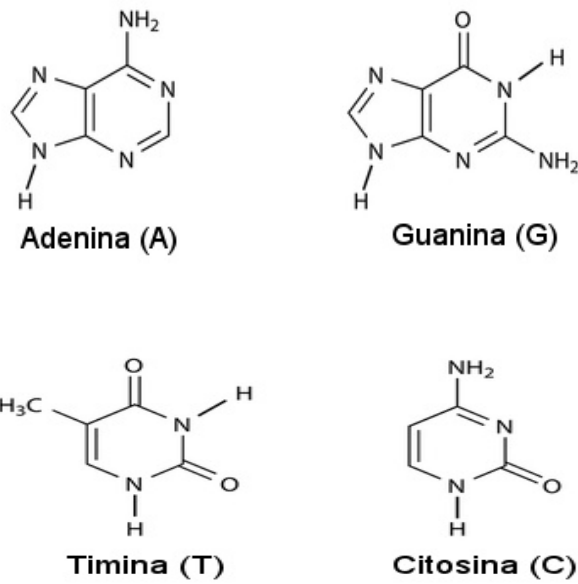
### 2.1 – Caracterização estrutural da molécula de DNA

A determinação estrutural do DNA em 1953, feita por Watson e Crick, é desde a sua descoberta, de extrema relevância na área da biologia molecular, bioquímica, física biológica, medicina entre outras [16, 17].

A molécula de DNA é composta basicamente por monômeros (subunidades) chamados de nucleotídeos, estes por sua vez, por um grupo fosfato ( $PO_4^-$ ), um açúcar do tipo pentose e por uma das quatro bases nitrogenadas (adenina ou timina ou guanina ou citosina) os nucleotídeos diferem entre si por suas bases [16]. O açúcar do tipo pentose, é chamado assim, por possuir cinco carbonos em sua estrutura, e ausência do grupo hidroxila (-OH) no carbono 2' da desoxirribose. A seguir, na Figura 1 temos a composição estrutural de um nucleotídeo e na Figura 2, as quatro bases nitrogenadas que diferenciam os nucleotídeos e compõem a molécula de DNA.

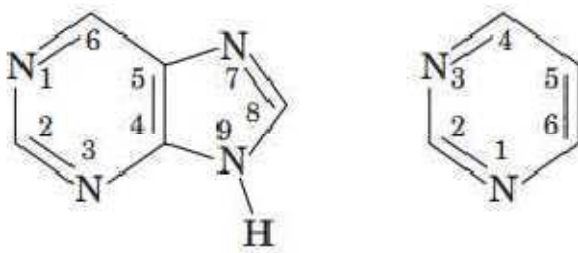


**Figura 1:** Composição de um nucleotídeo no DNA: Grupo fosfato  $PO_4^-$ , uma pentose (açúcar desoxirribose) e uma base nitrogenada [1,2].



**Figura 2:** As quatro bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos e os diferem entre si [54].

As bases nitrogenadas se dividem em duas classificações: purinas e pirimidinas. As purinas são maiores e possuem mais de um anel aromático, já as pirimidinas são menores e possuem apenas um anel aromático. Sendo duas bases nitrogenadas purínicas, adenina (A) e guanina (G), e duas bases nitrogenadas pirimídicas, timina (T) e citosina (C) [1,2]. Estas bases caracterizam-se, por serem moléculas planas e heterocíclicas. Como mostrado na Figura 3.

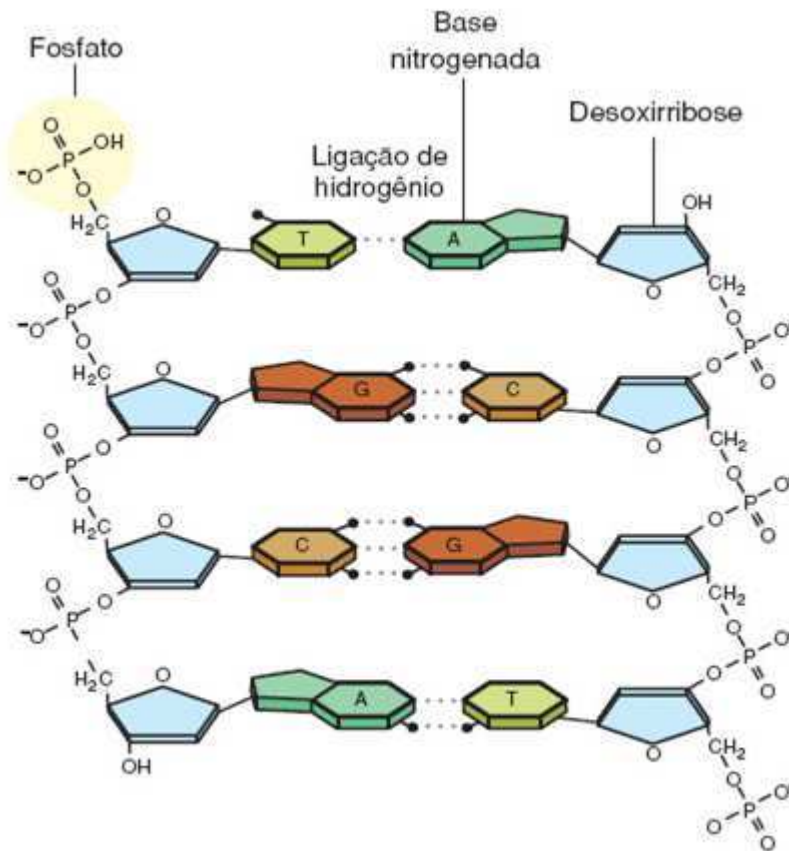


**Figura 3:** a) Purina

b) Pirimidina [16].

Os números de guanina e citosina são idênticos, assim como os de timina e adenina, ou seja,  $[G] = [C]$  e  $[T] = [A]$ . A ligação entre as bases nitrogenadas do DNA são sempre formadas por ligações de hidrogênio entre as fitas duplas. Os pares são sempre formados por guanina-citosina e timina-adenina, adenina se liga a timina através

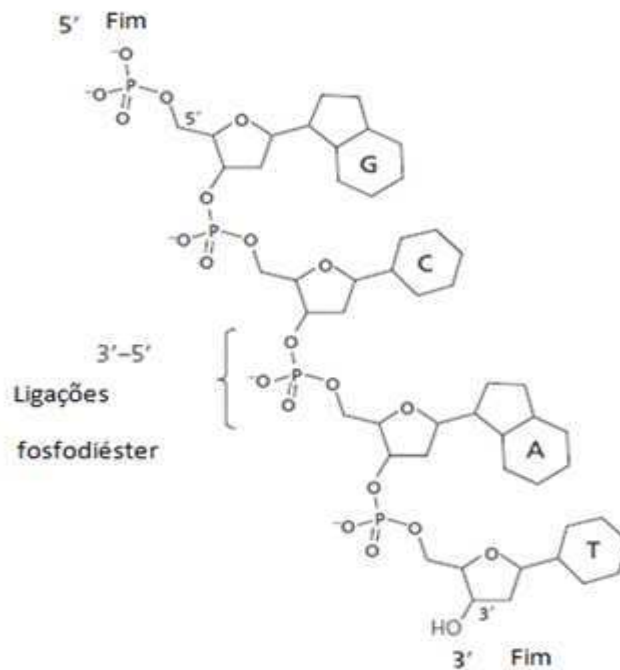
de duas ligações de hidrogênio (A=T), e a guanina se liga a citosina mediante três ligações de hidrogênio (C≡G), como mostrados na Figura 4.



**Figura 4:** Pontes de hidrogênio formadas entre pares de bases nitrogenadas. Figura retirada de [60].

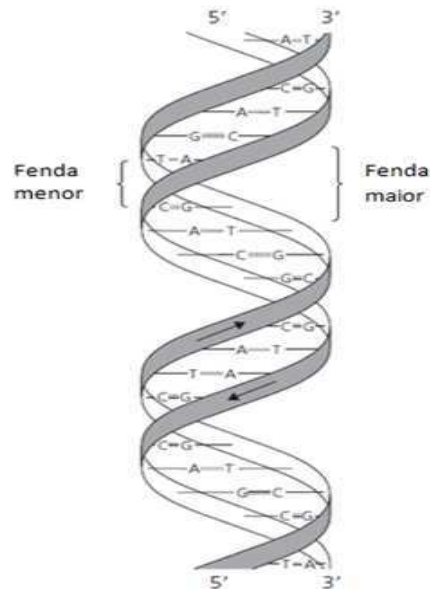
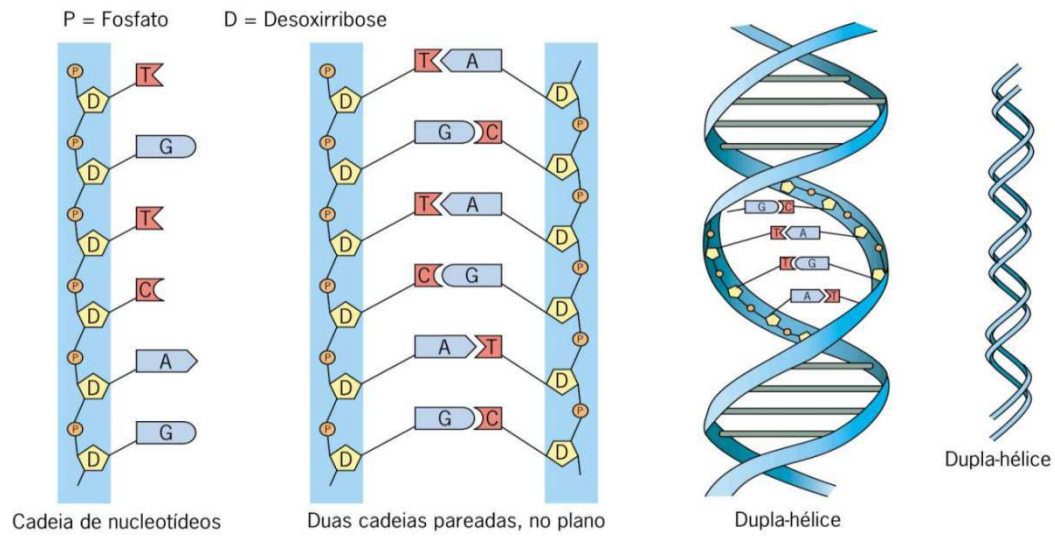
Watson e Crick observaram que a estrutura do DNA é composta por duas fitas polinucleotídicas enroladas em torno de um único eixo, com uma torção para a direita, formando uma hélice dupla de  $\approx 20 \text{ \AA}$  de diâmetro. Perceberam também, que estas duas fitas são antiparalelas. As bases encontram-se no centro da hélice, enquanto as cadeias de açúcar e fosfato localizam-se na periferia. Como podemos observar na Figura 4 acima. Este arranjo das fitas, quanto à posição dos componentes dos nucleotídeos, implicam na minimização das repulsões entre os grupos fosfatos carregados [16].

Observaram também que cada base em uma fita forma ligações de hidrogênio com a base da fita oposta a ela, gerando um par de bases planar. O eixo da hélice é aproximadamente perpendicular aos planos das bases [16].



**Figura 5:** Pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas e sentido da síntese da fita complementar, direção  $5' \rightarrow 3'$  para uma ligação fosfodiéster de vários nucleotídeos [1, 2, 54].

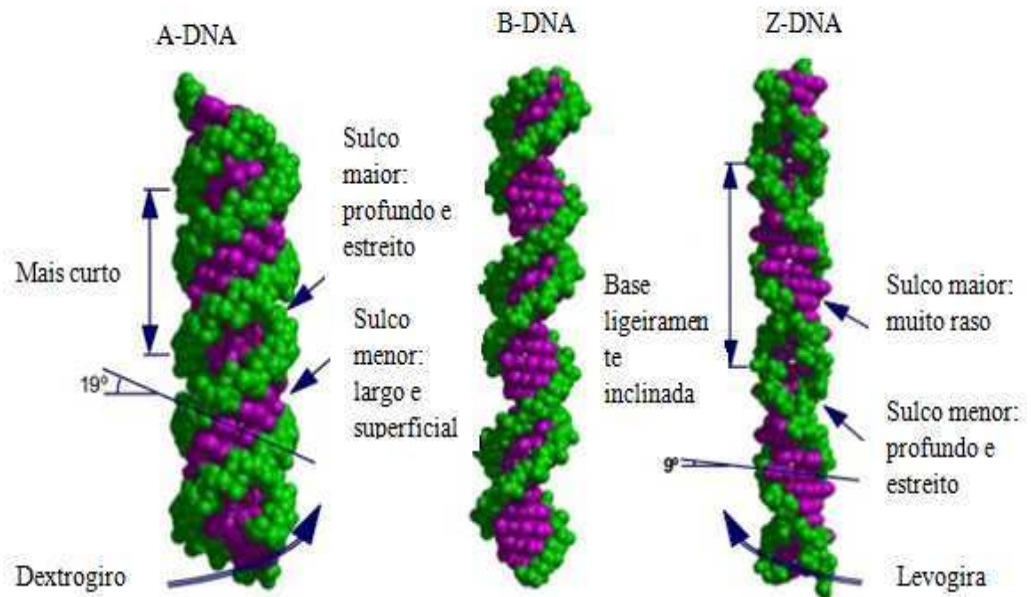
A ligação formada entre a hidroxila ligada ao carbono 3' da pentose e o fosfato do nucleotídeo formam cadeias, e a esta ligação dar-se o nome de pontes fosfodiéster. Estas pontes fosfodiéster é dada devido ao fato do grupo hidroxila do carbono 3' da pentose do primeiro nucleotídeo unir-se ao grupo fosfato ligado ao carbono 5' da pentose do segundo nucleotídeo, formando a fita de DNA. As cadeias formadas são complementares, ou seja, a sequência de base em uma cadeia necessariamente implica na sequência complementar na outra e vice e versa [2, 16].



**Figura 6:** Formação da dupla hélice [1, 2].

A molécula de DNA admite basicamente três conformações estruturais, sendo nas formas A, B e Z, como mostradas na Figura 7. A forma A-DNA possui diâmetro médio da hélice de 2,55 nm e a distância entre os pares de base é de aproximadamente 0,26 nm. Já a forma B-DNA apresenta diâmetro médio da hélice de 2,37 nm, distância entre os pares de base de aproximadamente 0,34 nm e possui por volta de 10,4 pares de

base de uma fenda a outra. Enquanto a forma Z-DNA possui diâmetro médio da hélice de 1,84 nm e a distância entre os pares de base é de 0,456 nm [2, 60-64].



**Figura 7:** Conformações do DNA.

Como podemos observar na Figura 7, as conformações A-DNA e B-DNA apresentam um dextrogiro em relação ao sentido da hélice, ou seja, uma rotação para a direita, enquanto a forma Z-DNA apresenta um levogiro, uma rotação para a esquerda. O A-DNA possui fenda (sulco) maior: estreita e profunda, o B-DNA é larga e profunda e o Z-DNA é plana. Quanto à fenda menor: o A-DNA é larga e rasa, o B-DNA é estreita e profunda e o Z-DNA é estreita e profunda. As formas que o DNA pode assumir dependem do meio o qual é inserido, podendo mover-se de uma conformação para a outra mediante o resultado, por exemplo, da ação de forças iônicas e umidade do meio o qual se encontra [2, 17, 61-65].

Darei ênfase em meu trabalho, a forma B-DNA por ser a mais encontrada no meio intracelular, na natureza, considerada biologicamente funcional e objeto de grandes e relevantes estudos. O DNA utilizado neste trabalho é o de 3000 pares de base (3kbp), um DNA produzido por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) como mostrado no Apêndice A [17].

## 2.2 - Interação eletrostática

Devido à presença dos grupos fosfatos ( $PO_4^-$ ), a molécula de DNA em solução aquosa apresenta densidade de carga negativa. Cada nucleotídeo possui um grupo fosfato, sendo a densidade ao longo do eixo da molécula do DNA dada por 2 cargas elementares para cada 0,34 nm, causando uma forte interação repulsiva entre diferentes partes da molécula do DNA. Espera-se a ocorrência de interações atrativas entre a molécula de DNA e ligantes carregados positivamente. Em condições próximas às fisiológicas, o DNA encontra-se em solução com íons monovalentes positivos ( $Na^+, K^+$ ) e negativos ( $Cl^-$ ). Para os íons positivos (contra-íons) observa-se atração eletrostática à molécula de DNA. A aproximação dos contra-íons diminui a densidade de carga efetiva assim como a interação repulsiva entre as fitas, causada pelos grupos fosfatos ao longo da molécula [1].

O estudo analítico da distribuição dos contra-íons e a molécula de DNA é baseado na equação de Poisson-Boltzmann. Trata-se de uma abordagem de campo médio, que assume que a densidade de carga da molécula de DNA é basicamente homogênea e está distribuída em uma superfície de formato cilíndrico. No equilíbrio termodinâmico, a distribuição espacial de todos os íons segue uma distribuição de Boltzmann, resolvendo a equação de Poisson para a distribuição de carga encontramos o potencial eletrostático médio  $\phi(\vec{r})$ : [1]

$$\nabla^2 \phi(\vec{r}) = \frac{-\sum_i z_i e \rho_i^0}{\epsilon} e^{\left(\frac{-z_i e \phi}{k_B T}\right)} \quad (3.1)$$

Em que:  $z_i$  é a valência dos íons do tipo  $i$ ;

$e$  é a carga elementar ( $1,6 \times 10^{-19}$  C);

$\rho_i^0$  é a concentração em solução de íons do tipo  $i$ ;

$\epsilon$  é a permissividade elétrica do solvente;

$k_B$  é a constante de Boltzmann;

$T$  é a temperatura absoluta.

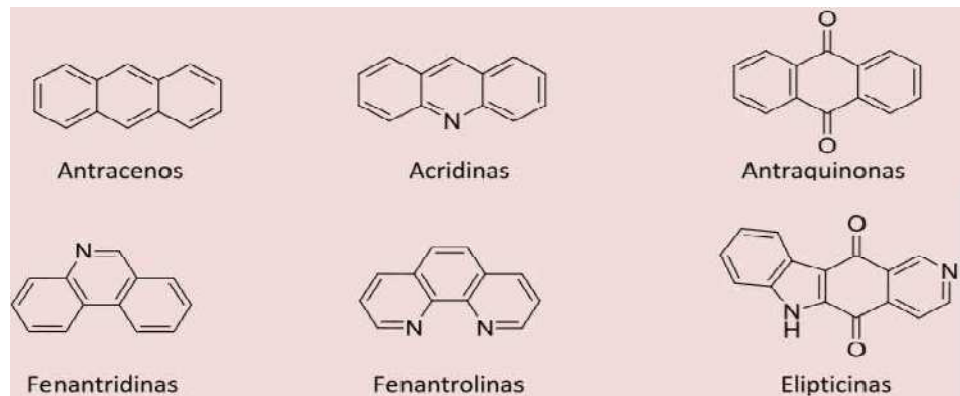
Podemos expandir a Eq. (3.1) e manter apenas o primeiro termo linear, quando a superfície carregada não possui uma densidade efetiva de carga muito alta e a concentração dos contra-íons é moderada. Para eletrólitos, a equação resultante é conhecida como equação de Debye-Huckel (DH), dada por: [1]

$$\nabla^2\phi(\vec{r}) = k^2\phi \quad (4.2)$$

## 2.3 - Intercalantes e Efeitos de Intercalação

### 2.3.1- Intercalação e Brometo de Etídio

A intercalação é dada pela inserção de compostos que possuem anéis aromáticos planares entre os pares de base da molécula de DNA. A estabilização desta ligação não covalente é dada principalmente pelas interações de empilhamento que ocorre entre os anéis aromáticos do intercalante e os orbitais aromáticos heterocíclicos dos pares de base do DNA, assim como, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. A Figura 8 apresenta a estrutura química dos principais intercalantes [55].

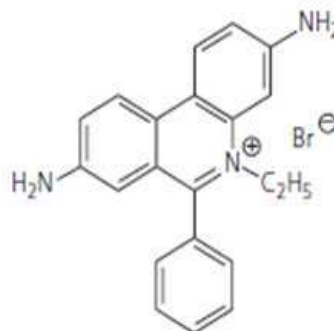


**Figura 8:** Estrutura química dos intercalantes [55].

O Brometo de Etídio, de fórmula molecular  $C_{21}H_{20}N_3Br$ , é um intercalante que se liga fortemente à cadeia dupla do DNA, alterando sua torção helicoidal. Exposto à luz ultravioleta entre (260 nm e 360 nm), emite luz vermelho-laranja (590 nm). Ligado à molécula de DNA este composto fluoresce, sendo sua intensidade acrescida cerca de 20 vezes. Este é um dos motivos pelo qual o Brometo de Etídio é muito utilizado em experimentos de eletroforese em gel de agarose, como marcador de DNA.

O Brometo de etídio pode ser usado de três formas distintas, no tampão da amostra a ser aplicada, diretamente no gel e ainda após a corrida quando o gel é mergulhado em solução de Brometo de Etídio. O Brometo de Etídio faz parte da família das Fenantridinas [2, 19, 20].

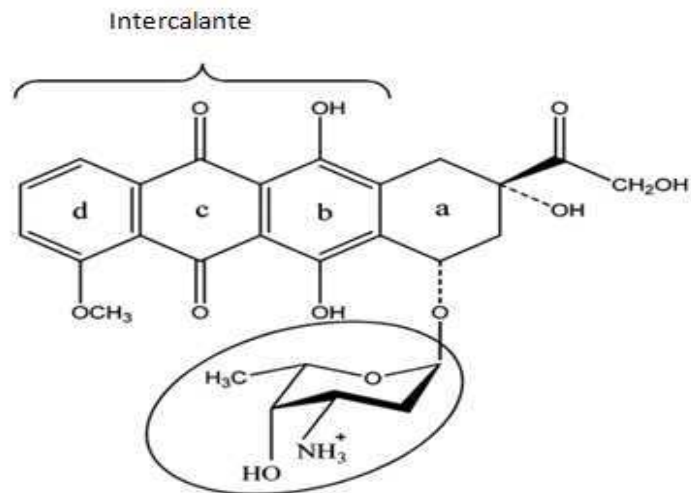
Detentor de um grande efeito mutagênico, a intercalação do Brometo de Etídio ao DNA, gera efeitos na molécula de DNA, como alteração da rigidez da molécula, do seu comprimento e de sua massa. O Brometo de Etídio possui estrutura aromática que possibilita sua inserção entre dois pares de base da cadeia dupla do DNA, causando, assim, um desenrolamento local da dupla hélice, girando a molécula em 26°. O resultado é uma significativa diminuição da repetição helicoidal, aumentando o passo da hélice, ou seja, aumentando a distância entre os pares de base do DNA em 0,34 nm em relação ao DNA puro [1, 2, 19, 20]. A quantidade de moléculas intercaladas à molécula de DNA varia com a concentração iônica da solução aquosa [20]. Já sua constante química de ligação  $K_i$  é dependente da concentração de  $\text{Na}^+$  presente na solução.



**Figura 9:** Brometo de Etídio, figura adaptada [2].

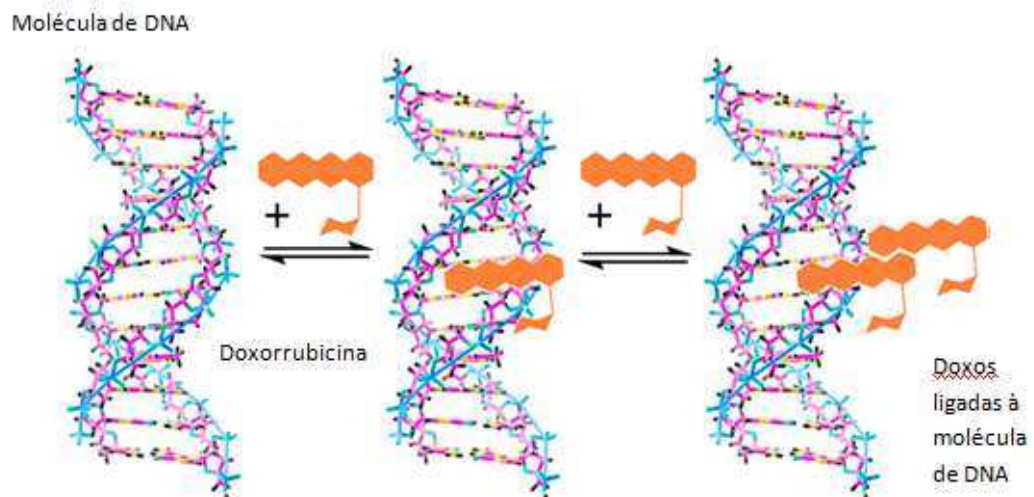
### 2.3.2- Doxorubicina

A doxorubicina faz parte da família das antraquinonas entre os intercalantes. É um intercalante de extrema importância e largamente utilizada em processos de quimioterapias, em tratamentos de mielomas, sarcomas, leucemia entre diversos outros tipos de câncer de diversas regiões do corpo [55]. Sua ação interfere na multiplicação e também na ação das células tumorais. A sua eficácia vem despertando cada dia mais o interesse de pesquisadores e, tornando-a um objeto de estudo valioso [3].



**Figura 10:** Doxorubicina - Figura adaptada [3].

A Figura 11 representa a intercalação da doxorubicina na molécula de DNA.



**Figura 11:** Doxorubicina intercalando ao DNA - Figura adaptada [3].

### 2.3.3- Proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>

As proteínas fazem parte do grupo de macromoléculas presentes nos seres vivos em geral. Além das proteínas, temos os ácidos nucleicos (RNA e DNA) e os polissacarídeos. Estas macromoléculas são sintetizadas através da união de unidades monoméricas de forma modular. As unidades monoméricas são adquiridas pela célula

como nutrientes ou a partir de substâncias mais simples, sintetizadas enzimaticamente [17].

Em relação à síntese de proteínas, sabemos que todas são formadas através dos mesmos 20 tipos de aminoácidos. Temos 8 nucleotídeos que formam os ácidos nucléicos, sendo 4 para o RNA e 4 para o DNA, e quanto aos polissacarídeos, temos 8 açúcares formadores. Mediante a um enorme número de possibilidades pelas quais as unidades monoméricas podem ser combinadas e, além disso, modificadas em muitos casos, temos uma variação significativa nas propriedades de cada tipo de macromolécula [17].

A proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub> utilizada neste trabalho é um polipeptídeo recombinante desenvolvido pelo grupo do professor Renko de Vries, da Universidade de Wageningen, Holanda. Como mostrado na Figura 12, o polipeptídeo recombinante C<sub>4</sub>K<sub>12</sub> é constituído de dois blocos, um bloco de estabilidade coloidal que possui a combinação de 400 aminoácidos, sendo eles: *Glicina (G)* e *Prolina (P)* aminoácidos com cadeias laterais apolares, ou seja, apresentam grupos químicos de hidrocarbonetos apolares ou hidrocarbonetos modificados, é importante ressaltar a exceção deste grupo, a *Glicina (G)*, que possui apenas um átomo de hidrogênio em sua cadeia lateral. Já a *Prolina (P)* é o único aminoácido secundário cíclico entre os 20 aminoácidos ditos “padrão”, esse fator cíclico em sua fórmula estrutural, conferi restrições conformacionais em sua cadeia lateral. *Asparagina (N)*, *Serina (S)*, *Glutamina (Q)* são aminoácidos com cadeias laterais polares sem carga e *Ácido glutâmico (E)* e *Lisina (K)* aminoácidos com cadeias polares com carga. E um bloco de ligação, possuindo 12 resíduos de *Lisina (K)*, formando um bloco de ligação catiônico, pois a Lisina é um aminoácido que apresenta o grupo amino, sendo básico e hidrofílico, este bloco é ligado a uma *Glicina (G)* [17].

O propósito da utilização do polipeptídeo C<sub>4</sub>K<sub>12</sub> para revestimento do DNA é justificado por um bloco de estabilização coloidal C<sub>4</sub>, formado por uma cadeia aleatória de 400 aminoácidos hidrofílicos, o que não confere propriedades auto montantes em solução, e um bloco de ligação catiônica K<sub>12</sub> (estrutura composta por 12 resíduos de lisinas). Os aspectos importantes do bloco coloidal são: seu grande volume, sendo capaz de proporcionar uma forte estabilidade sem que impeça a ligação com o DNA e que não o condense. Quanto ao bloco de ligação catiônica, deve ser pequeno, evitando assim ligações intra e inter moleculares, impedindo ligações de várias moléculas, assim como

a agregação destas, e ao mesmo tempo ser suficientemente longo para se ligar fortemente ao DNA [4].

A junção desses dois blocos distintos acarreta um revestimento de moléculas individuais de DNA termodinamicamente estável, sem a presença de qualquer ponte e/ou condensação do DNA [4].

Proténa C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>:



Bloco de estabilização coloidal C<sub>4</sub> (400aa):



Bloco de ligação catiônica K<sub>12</sub> (12aa):



**Figura 12:** Diblocos da Proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>. Bloco de estabilização coloidal e o bloco de ligação catiônica. Figura modifica de [4].

Na Figura 13 temos os aminoácidos que compõem a proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>.

Nome, símbolo de três letras e símbolo de uma letra	Fórmula estrutural
<b>Aminoácidos com cadeias laterais apolares</b>	
Glicina Gly G	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Prolina Pro P	
<b>Aminoácidos com cadeias laterais polares sem carga</b>	
Serina Ser S	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Asparagina <sup>f</sup> Asn N	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Glutamina <sup>f</sup> Gln Q	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
<b>Aminoácidos com cadeias laterais polares com carga</b>	
Lisina Lys K	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Ácido glutâmico <sup>f</sup> Glu E	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

**Figura 13:** Estrutura química dos aminoácidos presentes na Proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>. Figura modifica de [17].

## 2.4 – A Técnica de Eletroforese

A Eletroforese foi utilizada pela primeira vez em 1937 pelo bioquímico sueco Arne Tiselius como mecanismo de separação de proteínas. A técnica incorporada por Tiselius, chamada de eletroforese de fronteira móvel, foi pioneira, poderosa e de extrema importância para os estudos de química de proteínas [5-15].

No entanto, esta técnica apresentava limitações significativas: ela necessitava de amostras grandes e só poderia ser realizada inteiramente em solução, para assim evitar as forças de convecção e também, a mistura das proteínas durante o processo de migração [5-17].

Devido essas limitações, houve a necessidade da substituição da eletroforese de fronteira móvel pela eletroforese de zona. A eletroforese de zona consiste na migração de amostras em suportes sólidos, não fazendo presente as limitações da eletroforese de fronteira móvel [5-17].

A migração de íons em um campo elétrico é amplamente utilizada para a separação de moléculas biológicas. A força elétrica ( $F$ ) sobre um íon de carga  $Q$  em um campo elétrico  $E$  esta relacionada por,

$$F_{\text{elétrica}} = Q \cdot E$$

A migração resultante desses íons através da solução sofre oposição da força de atrito, também chamada força de fricção. Esta força está relacionada com a velocidade de migração destes íons e também o coeficiente de atrito da solução em que os íons estão migrando. Este coeficiente de atrito depende da viscosidade da solução, da forma, do tamanho e do estado de solvatação do íon. Na presença de um campo elétrico constante temos a igualdade entre as forças elétricas e as forças de atrito [5-17, 53].

$$F_{\text{atrito}} = v \cdot f$$

A eletroforese em gel é um poderoso método de separação de macromoléculas. Os poros do gel de agarose são capazes de filtrar e migrar essas moléculas, retardando as moléculas maiores em relação às menores, separando moléculas de diferentes pesos moleculares. Os géis possuem uma resistência intrínseca ( $R$ ). Esta resistência é determinada pela força iônica do seu tampão. O tampão utilizado para produção dos géis de agarose é o mesmo da solução eletrolítica presente na cuba [5-17, 53].

Durante a corrida eletroforética é impressa uma tensão ( $V$ ) ao longo do gel, fluindo uma corrente ( $I$ ) por todo sistema. A técnica de eletroforese é realizada sobre

tensão (V), corrente (I) e potência (P), constantes. Essas grandezas são assim mantidas, graças a uma fonte de energia capaz de transformar corrente alternada em corrente contínua [5-17, 53].

Durante o processo de eletroforese, ocorre o que chamamos de efeito Joule, a energia elétrica é convertida em energia térmica. Essa energia térmica, ou seja, o calor se não mantido sobre condições adequadas, é capaz de alterar a atividade da enzima, desnaturar proteínas, distorcer bandas e aumentar a difusão.

As proteínas são substâncias compostas por aminoácidos, ácidos, básicos e neutros, ou seja, elas possuem a capacidade de assumir tanto carga positiva, quanto carga negativa em função do pH das soluções que se apresentam. A carga líquida total das moléculas é dada pelo somatório de todas as cargas dos aminoácidos presentes em solução. O uso de solução-tampão em eletroforese é de suma importância, pois ela, mantém constante o pH das soluções protéicas durante a realização do experimento. O pH da solução-tampão deve assumir um valor dentro do intervalo, em que as proteínas em estudo permaneçam estáveis, mantendo sua atividade biológica [5-17, 53].

Sendo assim podemos relacionar essas grandezas, pelas seguintes leis:

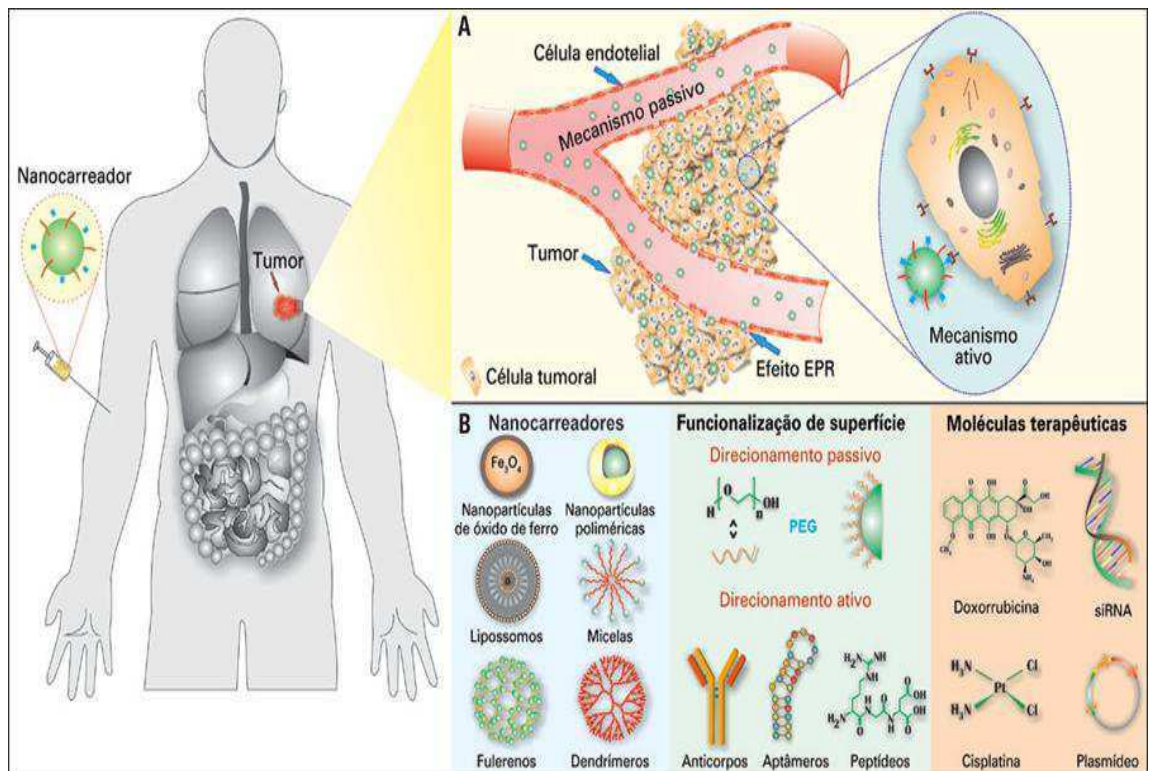
- Lei de Ohm:  $V=IR$ , onde a tensão (V) é dado em volts, à corrente (I) em ampères e a resistência (R) em ohms.
- Lei de Joule:  $P=V^2/R$ , onde a potência ou também chamado de fluxo de calor (P) é dada em watts.

## 2.5 – Nanocarreadores e Efeito EPR

Almeja-se em diversas áreas como a nanomedicina, nanociência voltada à física biológica e à física médica a entrega de fármacos de forma específica, tendo maior eficácia e um melhor direcionamento ao alvo doente, ou seja, diminuindo assim os efeitos colaterais devido ao tratamento com a admissão do fármaco e um resultado mais rápido e eficaz contra a doença. Para alcançar tais objetivos diversos estudos vem sendo realizados. Observaram que o encapsulamento de fármacos e/ou a produção de nanopartículas, capazes de transportar e liberar os fármacos de forma controlada e direcionada é um instrumento poderosíssimo para tal propósito [65-70].

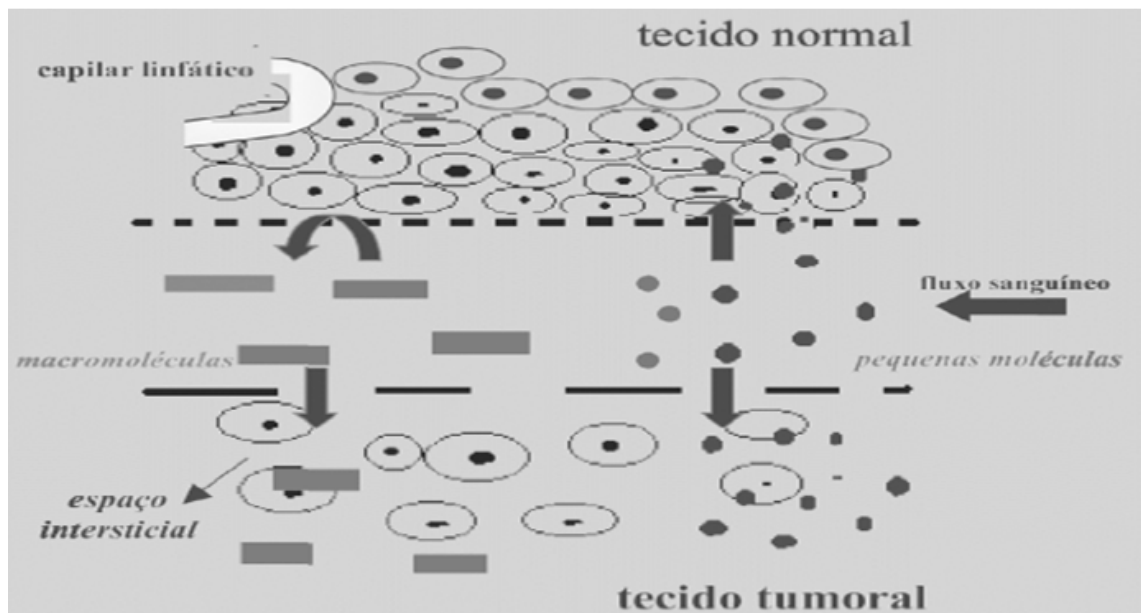
A figura 14 ilustra a aplicação dos nanocarreadores na corrente sanguínea com o objetivo de atingir e atacar o tumor localizado no pulmão. A figura 14 A apresenta os

dois mecanismos em que os nanocarreadores podem se acumular no tumor, sendo o mecanismo passivo, conhecido como efeito *Enhanced Permeability and Retention*, mediante a permeabilidade vascular aumentada na região tumoral, e o mecanismo ativo, também mediante a permeabilidade vascular aumentada, mas que possui a característica de modificar a superfície dos nanocarreadores através de moléculas que possuem a capacidade de serem reconhecidas mediante receptores protéicos existentes na superfície da membrana celular. As principais nanopartículas estudadas até o momento, capazes de fazer o nonocarreamento, ou seja, a entrega e liberação controladas de nanopartículas são apresentadas na figura 14 B. Observe, ainda, em 14-B, a nanopartícula de Doxorubicina, como sabe, é um fármaco largamente utilizado em tratamentos de vários tumores e que necessita o aumento de sua eficácia e a inibição de seus efeitos colaterais [65-70].



**Figura 14:** Aplicação de nanocarreadores, em A, ilustração do mecanismo passivo e ativo e em B exemplos de nanocarreadores, funcionalização da superfície e as moléculas terapêuticas [69].

Os efeitos colaterais mediante a admissão do fármaco surgem devido à ineficiência do direcionamento, tempo de retenção no alvo tumoral e o ataque tanto de células tumorais quanto às células saudáveis. Isso acontece, pois os fármacos em geral são pequenos o suficiente para atravessar o endotélio em todas as regiões do corpo, atacando sem distinção, matando assim, tanto as células cancerosas como as normais. As células saudáveis possuem uma distância uma das outras de aproximadamente 15 a 30 nm em média, já os fármacos encapsulados dentro de nanopartículas de 50 a 800 nm o que inviabilizara a inserção desses fármacos encapsulados em células saudáveis, atacando assim somente as células tumorais as quais estão mais espaçadas umas das outras [68-71].



**Figura 15:** Atuação de macromoléculas, ou seja, fármacos encapsulados, e pequenas moléculas, ou seja, fármacos livre, sobre a distinção devido ao tamanho desses, nos tecidos normais e em tecidos tumorais [71].

Como podemos observar na Figura 15 existe uma expressiva diferença na estrutura anatômica dos vasos dos tecidos normais em relação aos tecidos tumorais. Os vasos dos tecidos tumorais apresentam um espaço intersticial maior e possuem as propriedades de retenção e a permeabilidade aumentadas as quais exercem um importante papel na distribuição do fármaco, conhecido como o efeito EPR, *Enhanced Permeability and Retention*. Os vasos dos tecidos tumorais apresentam as seguintes características: falta de sistema linfático para drenagem, resultando na aglomeração de fármacos encapsulados no interior de seus tecidos; aumento da

permeabilidade microvascular ocorrendo o favorecimento de inserção dos fármacos encapsulados e também o possível retardamento do extravasamento de macromoléculas devido à alta pressão intersticial [67-71].

O encapsulamento de fármaco é altamente promissor em tratamento de cânceres, essas macromoléculas trazem diversos benefícios se comparadas à admissão do fármaco livre na corrente sanguínea, como, por exemplo, aumenta a absorção do fármaco no tecido tumoral, altera a farmacocinética dos fármacos, protege o fármaco contra a degradação no organismo evitando assim diversos efeitos colaterais, entre outros benefícios.

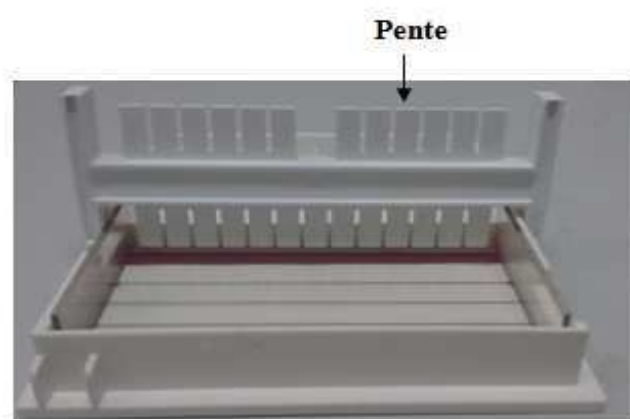
## Capítulo 3: Materiais e Métodos

Neste capítulo descreve-se detalhadamente o procedimento experimental utilizado para obtenção, a partir dos gráficos  $I_N/I_{Max} \times C_T$ , o revestimento dos complexos, assim como, a competição entre fármacos intercalados entre os pares de base da molécula de DNA 3000 pares de base.

### 3.1 – Metodologia

A técnica de eletroforese em gel de agarose é um poderoso método de separação de macromoléculas. No presente trabalho, a agarose utilizada para a preparação do gel foi da SIGMA-ALDRICH, preparado a 1%, a concentração do gel é de suma importância, pois é responsável pelo sucesso da separação da amostra. Se a concentração é demasiada, pode ocorrer a exclusão de proteínas pelo gel durante a corrida eletroforética [12, 65].

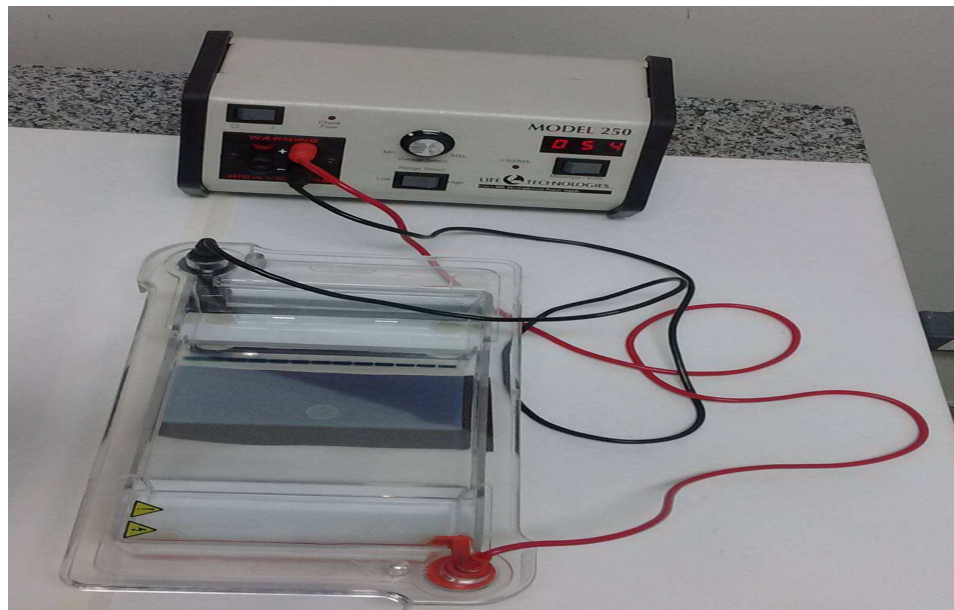
A Figura 16 mostra o recipiente utilizado para a formação do gel de agarose, no decorrer de todos os experimentos deste trabalho. Este recipiente possui capacidade para a formação de 13 poços com o auxílio de um pente de plástico o qual é inserido na solução do gel ainda em forma líquida e sendo retirado após a solidificação do gel de agarose.



**Figura 16:** Recipiente utilizado para formação do gel e poços de deposição, produção de um gel com 13 poços de alocação de solução.

Após a formação do gel de agarose, retira-se o pente do mesmo, o qual é responsável pela formação dos poços onde se deposita as soluções que serão estudadas, emerge o gel de agarose na cuba eletrolítica e em seguida realiza a inserção da respectiva solução ao poço, dando início logo após, a corrida eletroforética. É importante ressaltar que, cada poço possui a capacidade máxima de 20  $\mu$ l de locação de volume de solução. Outro fator importante quanto à preparação das soluções, é agitarmos os eppendorfs da Doxorubicina, Brometo de Etídio e da proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>, antes de começar a realização das soluções, essa ação é feita com o auxílio do Vortex (VELP scientific) durante aproximadamente 30 segundos, com velocidade angular de 2000 rotações por minuto e garante a uniformidade da solução em todo o volume contido no eppendorf, sem uma maior concentração em diferentes partes da solução, o que pode interferir no experimento, mediante a diferença de concentração.

Na Figura 17, tem-se o equipamento de eletroforese, onde os poços do gel estão ocupados com as soluções estudadas neste trabalho.



**Figura 17:** Cuba eletrolítica com soluções depositadas no gel, experimento em funcionamento.

O tampão (TAE) Tris-acetato (400 mM) e EDTA (10mM), diluído dez vezes, foi utilizado para a preparação da solução eletrolítica presente na cuba de acrílico, a qual é realizada a corrida eletroforética, e também na preparação da solução tampão utilizado para produção do gel de agarose. Durante toda a corrida eletroforética, a temperatura da sala é mantida a 20°C com o auxílio de um ar condicionado. Todos os experimentos

foram realizados a uma diferença de potencial de 54 V, responsável pelo aparecimento do campo elétrico através do gel de agarose, o que leva a corrida das macromoléculas presentes nos poços do gel e as separações das mesmas mediante as características como o tamanho da molécula e seu peso molecular. A duração da corrida foi de 1 hora, em seguida procedeu-se a revelação das imagens pelo trans-iluminador. As imagens foram analisadas com o auxílio do software ImageJ 1.37v.

### **3.2- Preparação das Soluções**

O pH do tampão TRIS-HCl (10mM) utilizado na preparação de todas as soluções foi de 7,4. O DNA utilizado em todos os experimentos no presente trabalho foi o DNA 3kbp da Thermo SCIENTIFIC, inicialmente à concentração de 0,5µg/µl. Sendo diluído a 50 ng/µl e desta solução de estoque, foi utilizado 1µl para a produção da solução de cada amostra. Os experimentos foram realizados de forma comparativa referente à solução de cada poço. Foram efetuados dois experimentos: No primeiro experimento, o primeiro poço continha apenas DNA 3kbp (50 ng), Brometo de Etídio e o tampão, no segundo poço a concentração de DNA e Brometo de Etídio permaneceram constantes, acrescentando a concentração de Doxorrubicina. E a partir do segundo poço um aumento gradual na concentração de Doxorrubicina, mediante as mesmas concentrações de Brometo de Etídio e DNA 3kbp. No segundo experimento, o primeiro poço possuía a mesma solução que o primeiro experimento, sendo que a partir do segundo as soluções eram acrescidas da proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>. As reações ocorrem em um intervalo de tempo de aproximadamente 30 min, à temperatura 20° C e pressão ambiente. A concentração do DNA 3kbp em pares de base utilizado em todos as amostras foi de 3,75µM, sendo a concentração do Brometo de Etídio de 1mM e a concentração do polipeptídeo recombinante, proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub> de 0,6 µM.

## Capítulo 4: Resultados e Discussões

Neste capítulo apresenta-se os resultados obtidos para a interação da Doxorubicina e o DNA 3000 bp, assim como, o deslocamento do Brometo de Etídio intercalado ao DNA, devido a presença da Doxorubicina. Além disso, elucida-se o revestimento do complexo DNA - fármacos pelo polipeptídeo C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>.

A interação entre a doxorubicina e o DNA vem sendo estudada através de diversas técnicas como espectroscopia Raman de ressonância [50], espectroscopia de dicromismo circular [51], eletroforese em gel de agarose, AFM, [31] espectrofotometria UV-Vis, voltametria, espectrofluorometria, pinças ópticas entre outras. Técnicas essas que vem confirmando a intercalação de Doxorubicina nos pares de base do DNA. Esta interação, faz ocorrer a diminuição da fluorescência do DNA já intercalado com algum fármaco marcador, indicando o deslocamento de um intercalante fluorescente [29-31]. Como sabe-se a Doxorubicina quando intercalada não fluoresce; fluorescendo somente quando não intercalada [29-31].

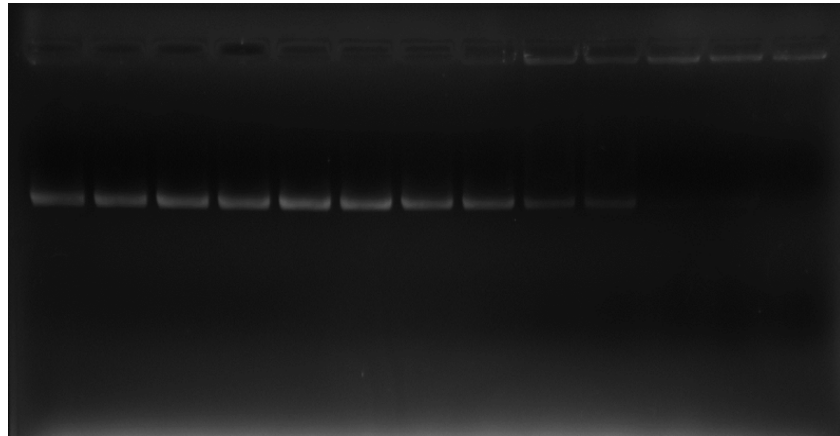
Na Tabela 1, temos a relação da razão entre a variação das concentrações de Doxorubicina por pares de base do DNA 3000 bp, mantendo constante a concentração molar de Brometo de Etídio.

Poço												
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
DNA												
3kbp												
(3,75µM)	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO
+ BrEt	1/6bp	1/5bp	1/4bp	1/3bp	1/2bp	1/1bp	2/1bp	3/1bp	4/1bp	5/1bp	6/1bp	7/1bp
(1mM)												

**Tabela 1:** Variação das Concentrações de Doxorubicina em relação ao DNA 3kbp.

Pode-se observar, na Figura 18, no decorrer dos poços, no sentido da esquerda para direita, um decaimento significativo da intensidade de fluorescência do Brometo de Etídio intercalado ao DNA, implicando no deslocamento deste devido à intercalação da Doxorubicina [31]. Ao ligar-se à molécula de DNA, a Doxorubicina vai deslocando o Brometo de Etídio, de forma a contribuir na diminuição da intensidade de fluorescência

deste, ao DNA. Este decréscimo de intensidade de fluorescência será avaliado neste trabalho pela técnica FID, análise de deslocamento de intercalante fluorescente. Esta técnica é de alta resolução e rapidez e não possui exigências para estabelecer a afinidade de pequenas moléculas e a seletividade de DNA [29-30]. Sabe-se também que a porcentagem do decréscimo de intensidade está diretamente relacionada à extensão de ligação do DNA [29, 30].



**Figura 18:** Comportamento da intensidade de fluorescência devido a competição da intercalação entre os fármacos Brometo de Etídio e Doxorubicina, para concentração fixa de Brometo de Etídio,  $C_T = 1\text{mM}$ , e aumento da concentração de Doxorubicina.

Observe que o valor da intensidade de fluorescência descrece em função do aumento da concentração de Doxorubicina por pares de base do DNA, implicando na substituição de intercalação do Brometo de Etídio pela Doxorubicina, ou seja, o deslocamento do Brometo de Etídio devido a intercalação de Doxorubicina.

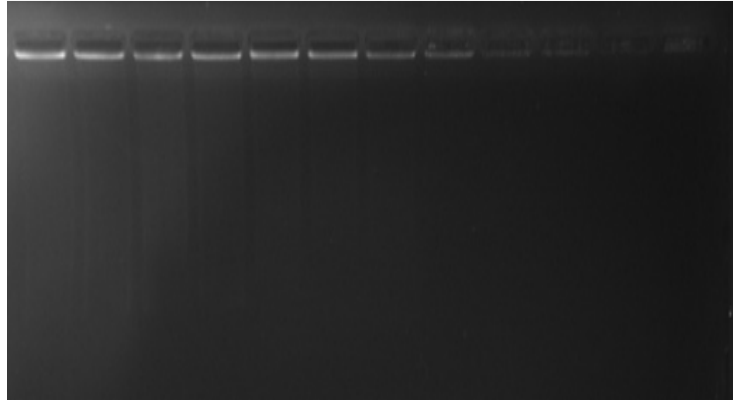
No primeiro poço de cada experimento, tem-se a ausência da Doxorubicina na solução, presentes DNA 3000 bp ( $3,75\ \mu\text{M}$ ), BrEt (1mM) e Tris (10 mM). Logo, a intensidade de fluorescência dar-se somente pela intercalação do Brometo de Etídio à molécula de DNA 3000 bp. Para construção dos gráficos referentes às Figuras 18 e 19, o primeiro poço será o parâmetro de referência de medida de intensidade ( $I_{\text{MAX}} = 1$ ), chamado de concentração zero de Doxorubicina ( $C_{\text{zero}}$ ), ou seja, nenhuma concentração de Doxorubicina presente no poço e, portanto, máxima intensidade de fluorescência.

Na Tabela 2, como podemos ver, tem a mesma relação da razão entre a variação das concentrações de Doxorubicina por pares de base de DNA da Tabela 1, diferindo somente o acréscimo do polipeptídeo  $C_4K_{12}$ .

Poço												
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
DNA												
3kbp												
(3,75µM)	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO	DOXO
+ BrEt	1/6bp	1/5bp	1/4bp	1/3bp	1/2bp	1/1bp	2/1bp	3/1bp	4/1bp	5/1bp	6/1bp	7/1bp
(1,0mM												
+ C <sub>4</sub> K <sub>12</sub>												
0,6 µM)												

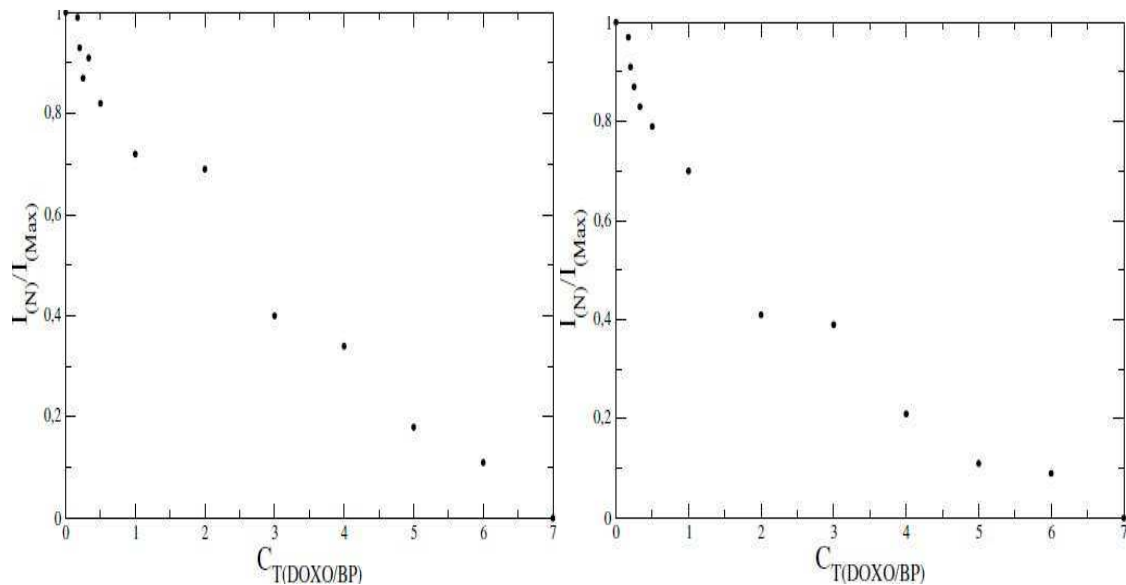
**Tabela 2:** Variação das Concentrações de Doxorubicina em relação ao DNA 3kbp, na presença da proteína C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>.

Na Figura 19, uma expressiva semelhança no decréscimo de fluorescência da Figura 18, é observada. Mostrando-nos que a presença do polipeptídeo não altera a capacidade de intercalação entre fármacos e DNA, verificando o revestimento do composto pelo polipeptídeo devido a inexistência de interações intra e inter moleculares do polipeptídeo com o composto fármaco-DNA, causado pelo domínio catiônico acoplado ao domínio hidrofílico do polipeptídeo [4, 21-28, 32-45]. Muitas aplicações deste revestimento vem sendo estudado, como por exemplo DeRouchey et al. que estudaram o revestimento de moléculas únicas de DNA, Osada et al. que estudaram a indução de múltiplas dobras em moléculas de DNA, entre tantos outros estudos extremamente relevantes. Podemos observar também, um retardamento da corrida pelo composto no gel de agarose durante a eletroforese [29-31, 52], mediante a presença do polipeptídeo C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>, sabe-se que a ligação deste, ao composto DNA – fármaco, altera a carga, a forma e o tamanho, alterando assim, a mobilidade eletroforética do composto encapsulado, como observado [4].



**Figura 19:** Comportamento da intensidade de fluorescência devido a competição da intercalação entre os fármacos Brometo de Etídio e Doxorubicina, para concentração fixa de Brometo de Etídio,  $C_T = 1\text{mM}$ , e aumento gradual da concentração de Doxorubicina na presença do polipeptídeo  $C_4K_{12}$ .

Observe que o decréscimo da intensidade de fluorescência em função do aumento da concentração de Doxorubicina por pares de base do DNA permaneceu inalterado com a presença do polipeptídeo  $C_4K_{12}$  e temos, também, um atraso na corrida do gel de agarose. Este atraso na corrida, reafirma o revestimento do complexo DNA – Doxorubicina - Brometo de Etídio pelo polipeptídeo  $C_4K_{12}$ , pois como vimos o polipeptídeo possui carga líquida positiva o que fez retardar a mobilidade do complexo durante a corrida, o que não ocorreria se o complexo não estivesse encapsulado.

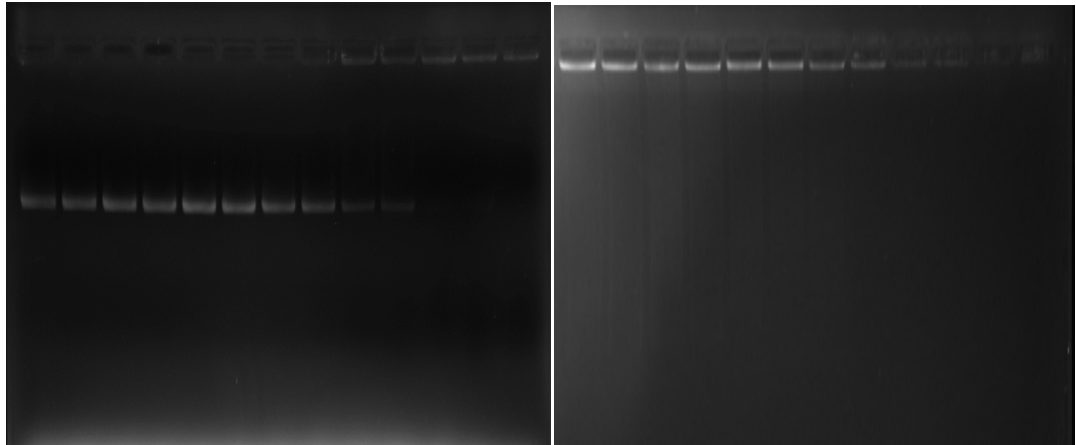


**Gráfico 1:** Gráficos da razão da intensidade de fluorescência,  $I_N/I_{MAX}$ , em função da concentração total de Doxorubicina. A) sem a presença do polipeptídeo  $C_4K_{12}$ . B) na presença do polipeptídeo  $C_4K_{12}$ .

Ao compararmos o decréscimo de porcentagem de fluorescência no Gráfico 1 A e B, tomando como 100% de fluorescência o primeiro ponto de ambos os gráficos podemos comprovar uma semelhança significativa destes. Das razões de Doxorubicina por pares de base de DNA 1:6 e 1:5, ou seja, no segundo e terceiro poço do gel de agarose, segundo e terceiro pontos dos Gráficos 1 A e 1 B, temos um decréscimo de 1% para o gráfico A e 3% para o gráfico B, ou seja, apenas 2% difere o decréscimo de fluorescência na presença do polipeptídeo  $C_4K_{12}$ . O sexto, o sétimo e o nono pontos também apresentaram uma média de 2%. Sendo que o quarto poço, apresentou 0% de diferença, ou seja, o quarto ponto do Gráfico 1 A e B são idênticos quanto a razão da intensidade de fluorescência. A média da diferença entre os outros pontos foram 4%, que também é considerada baixa.

Devemos levar em consideração, na Figura 20, que as imagens apresentam uma diferença de tonalidade e brilho e isto possivelmente influenciou na análise de comparação da porcentagem, mas mesmo na presença desta diferença de tonalidade e brilho das imagens, ainda obtivemos uma semelhança muito expressiva quanto ao decréscimo da porcentagem de fluorescência.

Provando que a presença do polipeptídeo  $C_4K_{12}$  não interfere na interação do composto, de forma que este composto foi encapsulado pelo polipeptídeo.



**Figura 20:** Comparação das imagens da corrida do gel de agarose na ausência da proteína e na presença da proteína  $C_4K_{12}$ .

Para a construção do Gráfico 2 que concede a constante de ligação da Doxorubicina, utiliza-se a técnica FID, a qual medimos o deslocamento de Brometo de Etídeo em função do decréscimo de fluorescência devido a intercalação de Doxorubicina. Esta técnica proporciona constantes de ligações consistentes com o modelo de Scatchard e McGhee e von Hippel entre outros [29,30]. Observe que o gráfico é dado pela razão entre a variação de fluorescência pela concentração de Doxorubicina livre,  $\Delta F/ \text{Dox}$ , em função da variação de fluorescência,  $\Delta F$ .

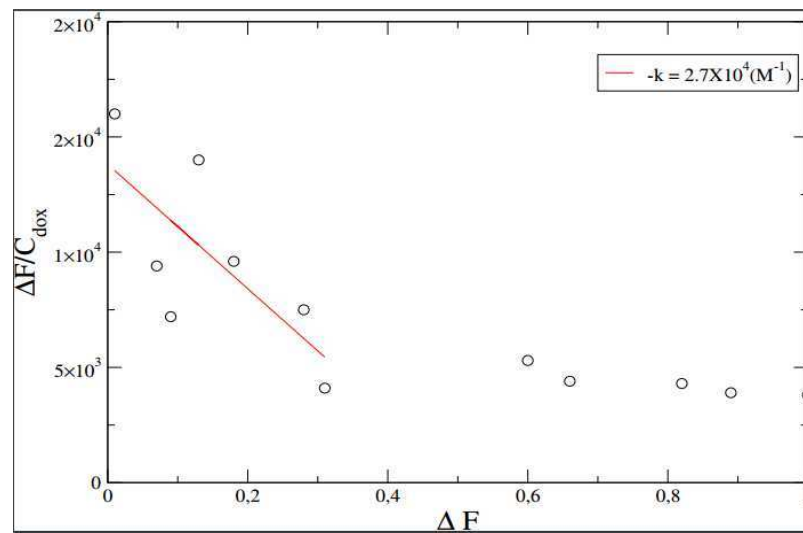
Para determinarmos a concentração de Doxorubicina livre realizamos o seguinte procedimento, tomamos como parâmetro o primeiro poço, onde temos somente Brometo de Etídeo intercalado ao DNA na concentração saturada, ou seja, todos os pares de base do DNA encontram-se intercalados ao Brometo de Etídeo. E para o DNA 3000 bp utilizado, teremos 1500 moléculas de Brometo de Etídeo intercaladas inicialmente. Nessas condições a intensidade de fluorescência é máxima, e chamaremos de  $I_{MÁX} = 1$ . Para  $I_{MÁX} = 1$  teremos zero moléculas de Doxorubicina intercaladas ao DNA. Para calcularmos a razão entre as intensidades de fluorescência devemos levar em consideração a razão das moléculas de Brometo de Etídeo que se deslocaram devido à intercalação das moléculas de Doxorubicina.

De forma,

$$I_{MÁX} / I_i = m_s / m_i, \quad (4.1)$$

onde  $I_{MÁX}$  e  $I_i$  representam, respectivamente, a intensidade de fluorescência dos complexos de DNA - Brometo de Etídeo saturado com moléculas ligadas  $m_s$  e a

intensidade de fluorescência dos complexos de DNA com as moléculas de Brometo de Etídio ligadas  $m_i$ . À medida que aumentamos a razão da concentração total de Doxorrubicina ao composto DNA - Brometo de Etídio, as moléculas de Brometo de Etídio já intercaladas ao DNA são deslocadas, substituindo-as pela Doxorrubicina. No primeiro poço da Figura 18, inicialmente tínhamos 1500 moléculas de Brometo de Etídio e zero moléculas de Doxorrubicina. Ao acrescentarmos a Doxorrubicina, obtemos no segundo poço mediante a equação 4.1, a exclusão de 255 moléculas de Brometo de Etídio, ou seja, ficaram intercaladas somente 1245 moléculas de Brometo de Etídio ao DNA, resultando em 510 pares de base do DNA intercalados pela Doxorrubicina. Com base no número de pares de base do DNA intercalados pela Doxorrubicina, calculamos o número de moléculas de Doxorrubicina e assim sua concentração ligada. Sabe-se que a concentração total de Doxorrubicina é igual à soma da concentração livre e a concentração ligada ao DNA, dessa forma encontramos a concentração de Doxorrubicina livre em cada poço do gel de agarose. De posse da concentração de Doxorrubicina livre, podemos encontrar a razão da variação de fluorescência pela concentração de Doxorrubicina livre,  $\Delta F/ \text{Dox}$  e assim construímos o Gráfico 2.



**Gráfico 2:** Gráfico da razão entre a variação de fluorescência pela concentração de Doxorrubicina livre,  $\Delta F/ \text{Dox}$ , em função da variação de fluorescência,  $\Delta F$ .

O gráfico 2 nós dá a razão entre a variação de fluorescência pela concentração de Doxorrubicina livre,  $\Delta F/ \text{Dox}$ , em função da variação de fluorescência,  $\Delta F$ , a inclinação deste gráfico dá a medida da constante de ligação. Este gráfico foi realizado com base

na literatura [29,30]. A constante química de ligação da Doxorrubicina dada pela inclinação do gráfico 5,2 foi  $K_i = 2,7 \times 10^4 M^{-1}$ . Que está em bom acordo com aquele obtido por Chem et al ( $3,2 \times 10^4 M^{-1}$ ) [31].

## Capítulo 5: Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho ao utilizar o método FID [29-30], foi possível estudar o revestimento do complexo DNA-Brometo de Etídio -Doxorrubicina pelo polipeptídeo C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>, assim como, o deslocamento do intercalante Brometo de Etídio inicialmente intercalado ao DNA 3000 pares de base, devido a intercalação do fármaco Doxorrubicina. Os estudos foram medidos em função da variação da intensidade de fluorescência. Além disso, mostramos a constante de ligação química da Doxorrubicina, através da inclinação da reta do gráfico entre a razão da variação de intensidade de fluorescência pela concentração molar da Doxorrubicina versus a variação de fluorescência, que apresentou valor coerente em relação a literatura. O aprofundamento e o enriquecimento das informações quanto ao encapsulamento de fármacos trarão inúmeros benefícios em diversas áreas como física biológica, biomedicina, engenharia genética entre outras, devido a aprimoramentos e aumento significativo da eficiência de tratamentos quimioterápicos mediante a permanência de fármacos na corrente sanguínea e o direcionamento somente a células tumorais [27-31].

Pretende-se para o enriquecimento de informações estruturais do complexo DNA - ligante - proteína (C<sub>4</sub>K<sub>12</sub>) deste trabalho, o uso de outras técnicas experimentais. Mais precisamente, a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), que é uma técnica de molécula única, que possibilita um estudo mais detalhado de um único complexo DNA - ligante, sendo possível observar mudanças estruturais minuciosas deste complexo.

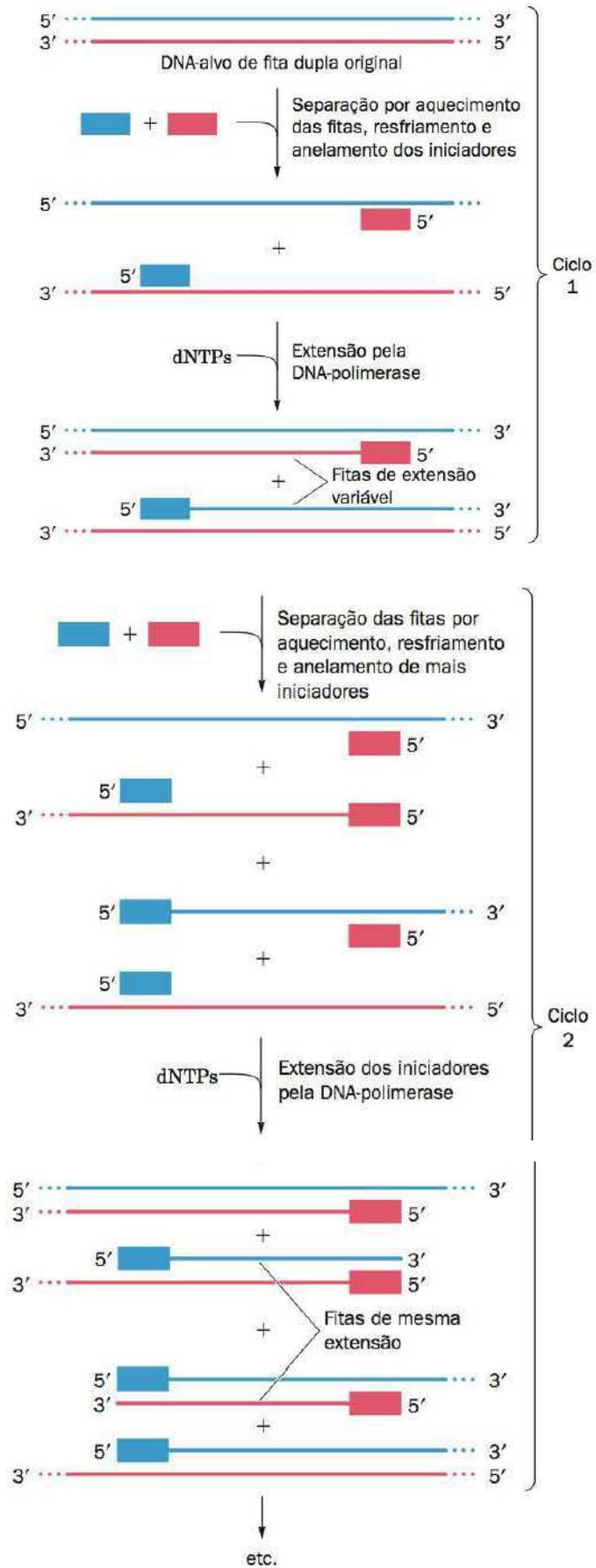
## Apêndice A

### Reação em cadeia da polimerase (PCR) - [17]

A PCR é uma técnica de amplificação de um segmento de DNA de até 6kb inventada por Kary Mullis em 1985, esta técnica é extremamente rápida, cerca de 30 minutos em procedimentos *in vitro* e consiste de uma “clonagem molecular livre de células” [17].

A amplificação por PCR possui inúmeras aplicações, tornando-se uma ferramenta indispensável na área clínica, principalmente pela sua utilização diagnóstica célere em mutações cancerosas, doenças infecciosas e patologias raras [17].

O procedimento consiste em dois ciclos, no primeiro ocorre basicamente, desnaturação térmica da fita dupla do DNA original, seguida do resfriamento deste, para que assim, ocorra o anelamento dos iniciadores sintéticos de DNA, com os segmentos complementares de cada fita inicialmente desnaturadas, e por fim o alongamento destes iniciadores sintéticos pela DNA-polimerase, como mostrado na figura abaixo [17].



**Figura 21.** Figura Amplificação por PCR [17].

## Referências Bibliográficas

- [1] Rocha, M. S. “Interações DNA- Ligantes: uma introdução” (2014), notas de aula.
- [2] Bates, A. D., Maxwell, A. “*DNA topology*” *Oxford Bioscience*”. 2005 - 2nd ed.
- [3] Arnaiz, C. P., Busto, Natalia, Leal, J. M., and Garcia, Begoña\*. “New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction”.
- [4] Garcia, A. H., Werten, M. W. T., Stuart, M. C., Wolf, F. A., and Vries, Renko. “Coating of Single DNA Molecules by Genetically Engineered Protein Diblock Copolymers”. *Small*, 8, 3491-3501 (2012).
- [5] Hames, B. D. & Rickwood, D. *Gel Electrophoresis of Proteins*. 2ed. New York, 1990.
- [6] Sigma, Aldrich. (Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com>>. (Acesso em 26 de novembro de 2015).
- [7] Naoum, P. C. *Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA*. São Paulo: Editora Santos.
- [8] Andrews, A.T. (1986). *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications* (2nd edn). Oxford University Press, Oxford.
- [9] Dunn, M. J. (1993). *Gel electrophoresis: proteins*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- [10] Allen, R.C. and Budowle, B. (1994). *Gel electrophoresis of proteins and nucleic acids*. De Gruyter, Berlin.
- [11] Garfin, D. E. (1995). In *Introduction to biophysical methods for protein and nucleic acid research* (ed. J.A. Glasel and M.P. Deutscher), p. 53. Academic Press, SanDiego.

- [12] Westermeier, R. (1997). *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations* (2nd edn). VCH Press, Weinheim.
- [13] Hames, B. D. (ed.) (1998). *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach* (3rd edn). Oxford University Press, Oxford.
- [14] Chramba, A. (1985). *The practice of quantitative gel electrophoresis*. VCH Press, Weinheim.
- [15] Caglio, S. and Righetti, P. G. (1993). *Electrophoresis* 14, 554.
- [16] Daune, M. (ed.) (1999). *Molecular Biophysics Structures in motion*. Oxford University Press, Oxford.
- [17] Donald, V. G. (ed) (2011) - 4nd ed. *Biochemistry*. John Wiley & sons, inc. pags. 1147, 1148, 1158.
- [18] Watson, J. D. and Crick, F. H. C., *Molecular structure of nucleic acids – a structure for deoxyribose nucleic acid*, *Nature* 171 (1953), no. 4356, 737-738.
- [19] Wahl, P., Paoletti, J. et al. Le Pecq “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 (1970).
- [20] Vardevanyan, P. O., Antonvan, A. P., Manukyan, G. A., Karapetian, A. T. “Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA *Experimental and Molecular Medicine*” 33 205-208 (2001).
- [21] Ringsdorf, H. “Structure and properties of pharmacologically active polymers”. *J. Polym. Sci. Sym.* 51, 135-153 (1975).
- [22] Mulligan, R. C. *The basic science of gene-therapy*. *Science* 260, 926-932 (1993).

- [23] Hubbell, J. A. & Chilkoti, A. Nanomaterials for drug delivery. *Science* 337, 303-305 (2012).
- [24] Kopecek, J. Polymer-drug conjugates: origins, progress to date and future directions. *Adv. Drug Deliver. Ver.* 65, 49-59 (2013).
- [25] Cabral, H., Nishiyama, N. & Kataoka, K. Supramolecular nanodevices: from design validation to theranostic nanomedicine. *Acc. Chem. Res.* 44, 999-1008 (2011).
- [26] Osada, K., Christie, R. J. & Kataoka, K. "Polymeric micelles from poly (ethylene glycol) – (amino acid) block copolymer for drug and gene delivery". *J. R. Soc. Interface.* 6, 325- 339 (2009).
- [27] Osada, K., Christie, R. J. & Kataoka, K. "Development of functional polyplex micelles for systemic gene therapy". *Polymer Journal.* 46, 469-475 (2014).
- [28] Tang, R., Palumbo, R. N, Nagarajan, L., Krogstad, E & Wang, C. "Well-defined Block Copolymers for Gene Delivery to Dendritic Cells: Probing the effect of Polycation Chain-length" 142(2): 229-237 (2010).
- [29] Boger, D. I., Fink, B. E., Brunette, S. R., TSE, W. C. & Hedrick, M. P. "A Simple, High-Resolution Method For Establishing DNA Binding Affinity and Sequence Selectivity" 123, 5878-5891 (2001).
- [30] Tse, W. C. & Boger, D. I., Fink. "A Fluorescent Intercalator Displacement Assay for Establishing DNA Binding Selectivity and Affinity". *Acc. Chem. Res.* 37, 61-69 (2004).
- [31] Hajian, R., Shams, N & Mohagheghian, M. "Study on the Interaction between Doxorubicin and Deoxyribonucleic Acid with the use of Methylene Bleu as a Probe". *J. Braz. Chem. Soc., Vol.20, No. 8,* 1399-1405 (2009).
- [32] Kakizawa, Y. , Kataoka, K., *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002 , 54 , 203.

- [33] Lam, J. K. W., Ma, Y., Armes, S. P., Lewis, A. L., Baldwin, T., Stolnik, S. J. *Controlled Release*. 2004, 100, 293.
- [34] Keren, K., Berman, R. S., Buchstab, E., Sivan, U., Bbraun, E. *Science*, 2003, 302, 1380.
- [35] G. F. Walker, C. Fella, J. Pelisek, J. Fahrmeir, S. Boeckle, M. Ogris, E. Wagner, *Mol. Ther.* 2005, 11, 418.
- [36] S. Y. Wong, J. M. Pelet, D. Putnam, *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 799.
- [37] Feuz, L., Leermakers, F. A. M., Textor, M., Borisov, O. *Macromolecules*. 2005, 38, 8891.
- [38] Hall, A. R, Dorp, S., Lemay, S. G., Dekker, C. *Nano Lett.* 2009, 9, 4441.
- [39] Numata, K., Subramanian, B., Currie, H. A., Kaplan, D. L. *Biomaterials*, 2009, 30, 5775.
- [40] Kabanov, A. V. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1998, 30, 49.
- [41] Kostiaainen, M. A. et al. *ACS Nano*, 2007, 1, 103.
- [42] Osada, K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 12343.
- [43] Canine, B. F., Wang, Y., Hatefi, A. J. *Controlled Release*, 2008, 129, 117.
- [44] Douglas, S. M. *Nature*, 2009, 459, 414.
- [45] Derouchey, J. et al. *Chem. B* 2006, 110, 4548.
- [46] Osada, K. et al. *Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 3544.

- [47] Kowalczyk, S. W., Hall, A. R., Dekker, C. *Nano Lett.* 2009. *10*, 324.
- [48] Hartmann, L. et al. *Chem. Eur. J.* 2008, *14*, 2025.
- [49] Manfait, M., Theophanides, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, *116*, 321.
- [50] Haj, H. T. B. et al. *Chem.-Biol. Interact.* 2003, *145*, 349.
- [51] Chaltin, P. et al. Comparison of library screening techniques used in the development of dsDNA ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, *13*, 47-50.
- [52]<[http://www2.iq.usp.br/docente/miyamagostoto/DEG\\_5\\_Tecnicas\\_eletroforeticas.pdf](http://www2.iq.usp.br/docente/miyamagostoto/DEG_5_Tecnicas_eletroforeticas.pdf)>. (Acesso em 16 de janeiro de 2016).
- [53]<<http://ead.hemocentro.fmrp.usp.br/joomla/index.php/publicacoes/folhetins/469-dna-o-sentido-da-vida>>. (Acesso em 21 de agosto de 2016).
- [54] Wheate, N. J., Brodie, C. R., Collins, J. G., Kemp, S., Aldrich-Wright, J. R. DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 7, 627-648, (2007).
- [55] Nafisi, S., Saboury, A. A., Keramat, N., Neault, J. F., Tajmir-Raihi, H. A., Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. *Journal of Molecular Structure*, 2006.
- [56] Vardevanyan, P. O., Antonyan, A. P., Parsadanyan, M. A., Torosyan, M. A. & Karapetian, A. T.. Joint Interaction of Ethidium Bromide and Methylene Blue with DNA. The Effect of Ionic Strength on Binding Thermodynamic Parameters. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2015.
- [57] Vardevanyan, P .O., Antonyan, A .P., Parsadanyan, M.A., H.G. Davtyan and A.T . Karapetyan. The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and

double-stranded structures *Experimental and Molecular Medicine*, Vol. 35, No. 6, 527-533, 2003.

[58] Vardevanyan, P.O., Antonyan, A.P., Manukyan, G.A. and Karapetyan, A.T.. Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA. *Experimental and Molecular Medicine*, Vol. 33, No. 4, 205-208, 2001.

[59] <<https://thinkbio.wordpress.com/2012/02/12/o-dna>> (Acesso em 6 de novembro de 2016). Somente a imagem.

[60] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. "Biologia Molecular da Célula", 50 edição, Editora Artmed, Porto Alegre (1999).

[61] Cantor, C. R., Schimmel, P.R. "Biophysical chemistry - part I: The conformation of biological macromolecules", W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980).

[62] Ricci, C. G. A, B e Z-DNA: Caracterização conformacional e importância biológica. 2007. (Trabalho para conclusão de disciplina).

[63] Calladine, C. R.; Drew, H. *Understanding DNA: the molecule and how it works*. Academic press, 1997.

[64] Peer, D., Karp, JM, Hong, S., Farokhzad, O. C, Margalit, R., Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007; 2(12):751-60. Review.

[65] Allen, T. M, Cullis, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. 2004; 303(5665): 1818-22.

[66] Coelho, S. C, Pereira, M. C, Juzeniene, A, Juzenas, P, Coelho, M. A. Supramolecular nanoscale assemblies for cancer diagnosis and therapy. *J Control Release*. 2015; 213:152-167. Review.

[67] Gharpure, K. M, Wu, S. Y, Li C, Lopez- Berestein, G, Sood, A. K. Nanotechnology: future of oncotherapy. Clin Cancer Res. 2015; 21(14): 3121-30. Review.

[68] Vieira, B. D; Gamarra, F. L. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. Einstein, Vol.14, no.1 Jan/Mar, 2016.

[69] Le Droumaguet, B., Nicolas, J., Brambilla, D, Mura, S., Maksimenko, A., De Kimpe, L, et al. Versatile and efficient targeting using a single nanoparticulate platform: application to cancer and Alzheimer's disease. ACS Nano. 2012; 6(7): 5866-79.

[70] Chung, M.C; Silva, A. T. A; Castro, L.F; Guido, R.V. C.; Nassute, J. C.; Ferreira, E. I. F. Latentiation and advanced drug transport forms. Rev. Bras. Cienc. Farm. Vol. 41 no.2 Abr/Jun, 2005.