

TIAGO DE ASSIS MOURA

**EFEITOS DA CAFEÍNA SOBRE A ESTRUTURA DA
MOLÉCULA DE DNA: UM ESTUDO POR
ESPECTROSCOPIA DE FORÇA**

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

M929e
2017

Moura, Tiago de Assis, 1991-
Efeitos da cafeína sobre estrutura da molécula de DNA : um
estudo por espectroscopia de força / Tiago de Assis Moura. –
Viçosa, MG, 2017.
xi, 95f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.92-95.

1. Biofísica. 2. Instrumentos ópticos. 3. DNA. 4. Cafeína.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Física.
Programa de Pós-graduação em Física Aplicada. II. Título.

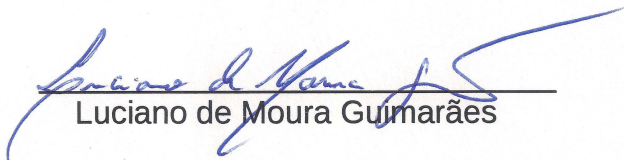
CDD 22 ed. 571.4

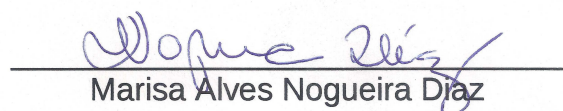
TIAGO DE ASSIS MOURA

EFEITOS DA CAFEÍNA SOBRE A ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE DNA: UM ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

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: 25 de julho de 2017.


Luciano de Moura Guimarães


Marisa Alves Nogueira Diaz


Márcio Santos Rocha
(Orientador)

Primeiramente, FORA TEMER!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me carregar nos momentos em que eu já não podia mais andar, por me fortalecer quando eu mais perecia e por permitir que eu conheça um pouco de sua criação.

Aos meu pais, meus eternos professores, Marta e Jurandy, por acreditarem em mim mais do que eu mesmo pude acreditar, por sempre estarem presente e por me ensinarem que o trabalho e a honestidade valem mais do que qualquer diploma ou título.

À minha tia Raquel (*in memoriam*) por sempre ter enxergado o melhor em mim. Infelizmente não poderemos comemorar essa juntos (agora) mas em breve nos reencontraremos e compartilharemos as risadas que o tempo (só) adiou.

Agradeço a minha família, amigos e colegas de curso. Aos DeMolays por todo companheirismo e fraternidade.

Agradeço ao meu orientador, professor Marcio, por ter me despertado a paixão e o entusiasmo por essa técnica tão fascinante, por me ensinar e me permitir contribuir (um pouco que seja) para o avanço da ciência. A todos os colegas de laboratório e curso, em especial ao Eduardo e ao Fabiano que me ajudaram bastante quando eu entrei no laboratório. À Fernanda e ao Victor da bioquímica, pela companhia nas longas horas de experimento e por me ajudar a compreender a parte bioquímica desse trabalho. Aos professores e funcionários da UFV e principalmente do DPF, meu muito obrigado.

Agradeço por último, e não menos importante, ao povo brasileiro, representado pelas agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo financiamento da pesquisa e pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. Introdução.....	1
2. Aspectos gerais de uma pinça óptica	4
2.1 <i>Breve histórico sobre o desenvolvimento da técnica de pinça óptica.</i>	<i>4</i>
2.2 <i>Princípio de funcionamento.</i>	<i>5</i>
2.3 <i>Calibração pinça óptica</i>	<i>10</i>
3. O DNA.....	15
3.1 <i>Estrutura da Molécula de DNA.....</i>	<i>15</i>
3.2 <i>Dupla hélice e polimorfismo no DNA.....</i>	<i>18</i>
3.3 <i>Breve resumo da mecânica de polímeros semiflexíveis.....</i>	<i>22</i>
3.3.1 <i>Flexibilidade.....</i>	<i>22</i>
3.3.2 <i>Modelo Kratky-Porod (Curvatura contínua).....</i>	<i>23</i>
3.3.3 <i>Calculo da Energia de Flexibilidade</i>	<i>26</i>
3.3.4 <i>Modelo Worm-Like-Chain (WLC).....</i>	<i>29</i>
3.4 <i>Interação DNA-ligantes.....</i>	<i>34</i>
3.4.1 <i>Associação simples entre duas moléculas- o Modelo de Scatchard</i>	<i>34</i>
3.4.2 <i>Cooperatividade e o modelo de Hill.....</i>	<i>37</i>
3.4.3 <i>O modelo de exclusão de vizinhos (McGhee e von Hippel).....</i>	<i>39</i>
4. Uso da Pinça Óptica e da Videomicroscopia na Caracterização da Interação DNA-Cafeína	46
4.1 <i>Cafeína</i>	<i>46</i>
4.1.1 <i>Hétero-complexos de Cafeína</i>	<i>49</i>
4.1.2 <i>A forma protonada da cafeína</i>	<i>51</i>
4.2 <i>Preparação das amostras</i>	<i>53</i>
4.2.1 <i>Construção do porta-amostras</i>	<i>54</i>

4.2.2	Preparação da Solução DNA-microesferas	55
4.2.3	Preparação da Soluções de cafeína	56
4.3	<i>Procedimento experimental</i>	57
4.3.1	Escolha da molécula de DNA	57
4.3.2	Estiramento do DNA e análise dos dados	59
4.3.3	Adição e troca da cafeína	62
5.	Resultados e discussão	64
5.1	<i>Análise dos resultados do comprimento do contorno</i>	64
5.1.1	Primeiro crescimento do comprimento de contorno	67
5.1.2	Queda do comprimento de contorno	73
5.1.3	Segundo crescimento do comprimento de contorno	76
5.2	<i>Análise dos resultados do comprimento de persistência</i>	76
5.2.1	Determinação dos parâmetros físico-químicos da interação	79
5.2.2	Força iônica alta (PBS 150)	83
5.2.3	Baixa força iônica (PBS 1)	85
6.	Conclusões	87
	Apêndice A: Regime entrópico	89
	Referências bibliográficas	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1: Pressão de radiação. A força resultante neste caso, empurra a microesfera no sentido de incidência do feixe.	7
Figura 2-2: Efeito da refração. A microesfera está situada na região abaixo do foco e, nesse caso, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe	8
Figura 2-3: Efeito da refração. A microesfera está situada na região acima do foco e, mais uma vez, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe.	9
Figura 2-4: Microesfera presa na posição de equilíbrio no poço de potencial gerado pela pinça óptica.	11
Figura 2-5: Ao ligar o motor, a microesfera é empurrada pelo fluido e fica em equilíbrio em uma nova posição no poço de potencial gerado pela pinça. A microesfera azul, na nova posição de equilíbrio e a microesfera vermelha, na posição de equilíbrio original.	12
Figura 3-1: O monômero de DNA.	15
Figura 3-2: A molécula de fosfato e os açúcares dos ácidos nucleicos. Em destaque vermelho, o átomo C5' e em destaque azul, o átomo C3'.	16
Figura 3-3: As bases nitrogenadas púricas, Guanina e Adenina.	17
Figura 3-4: As bases nitrogenadas pirimídicas, Citosina e Timina.	17
Figura 3-5: Desenho esquemático da molécula de DNA baseado no modelo de Watson e Crick , mostrando: a estrutura em dupla hélice, o pareamento das bases nitrogenadas e as ligações de hidrogênio [53].	19
Figura 3-6: As três formas canônicas do DNA de dupla fita em duas perspectivas especiais. Lateral e por cima, respectivamente. [54].	20
Figura 3-7: Modelo planar de Kratky-Porod, consistindo de N segmentos de tamanho a fazendo um ângulo θ_i com o segmento adjacente. Neste exemplo, h é soma das projeções dos N-1 segmentos sobre o primeiro segmento e r é o vetor que liga as duas extremidades do polímero.	23
Figura 3-8: Variação do vetor posição e do vetor tangente unitário ao longo de uma curva arbitrária.	31
Figura 3-9: Força \times extensão para uma molécula de DNA no regime entrópico. Círculos: experimento; Linha sólida: previsão da Eq.3.47 [25].	34
Figura 3-10: Gráfico da razão de sítios ligados, r , em função da concentração de ligantes livres em solução, C_f . O valor de r está compreendido entre $0 \leq r \leq 1$ [53].	36

Figura 3-11: Comportamento gráfico da Eq. 3.57 para alguns valores de n , fixando $K_i = 104M - 1$ [25].	39
Figura 3-12: Uma lacuna (gap) com $g=5$ sítios ligáveis situado entre duas moléculas ligadas. Nesse exemplo, temos $N=3$, o que dá $s=3$.	41
Figura 3-13: Notação usada para calcular a probabilidade $P_{g.f}$ é um sítio livre (ligável) da rede e b_i são os sítios ligados.	42
Figura 3-14: Isoterma de McGhee e von Hippel para $K_i = 105M - 1$ e $N = 3$ [25].	44
Figura 4-1: A molécula de cafeína.	46
Figura 4-2: Esquema do efeito de inibição dos receptores de adenosina pela cafeína. Note que os neuro transmissores são interrompidos quando encontram um receptor ligado a adenosina. A cafeína blinda a ligação receptor-adenosina e portanto, mantém as neuro transmissões.	48
Figura 4-3: Desenho esquemático do modelo do complexo DNA-cafeína: ligação externa dos agregados de cafeína nas fendas do DNA. Os bastões representam os agregados de cafeína [11].	51
Figura 4-4: Esquema ilustrando o processo de protonação da cafeína.	52
Figura 4-5: Ilustração do porta-amostras usado nos experimentos.	54
Figura 4-6: Ilustração das moléculas ligadas no porta-amostras.	55
Figura 4-7: Configuração da ligação da molécula de DNA na laminula.	56
Figura 4-8: As configurações possíveis de serem encontradas no porta-amostras.	57
Figura 4-9: A configuração ideal do sistema microesfera-DNA-porta-amostras. h é a altura da pinça e θ é o ângulo entre o eixo de extiramento do DNA (eixo-z) e o eixo de movimento do porta-amostras (eixo-x).	58
Figura 4-10: Esquema da realização dos estiramentos da molécula de DNA. A esfera vermelha representa a posição de equilíbrio original e a esfera verde representa a nova posição em equilíbrio com a força feito pelo DNA. Como a velocidade do experimento é baixa, a força de Stokes é aproximadamente zero.	60
Figura 4-11: Ilustração do processo de troca das alíquotas contendo cafeína.	63
Figura 5-1: Comportamento do comprimento de contorno, L , em função da concentração de cafeína na amostra CT , dissolvida em PBS 150. A linha pontilhada é apenas um guia para os olhos.	65
Figura 5-2: Comportamento do comprimento de contorno, L , em função da concentração de cafeína na amostra CT , dissolvida em PBS 1. A linha pontilhada é apenas um guia para os olhos.	66
Figura 5-3: Esquema mostrando a intercalação de moléculas de um ligante entre as bases do DNA.	68
Figura 5-4: Esquema mostrando o aumento de contorno do DNA como sendo devido a intercalação.	69

Figura 5-5: PBS150-Pontos: dado experimental da figura 5.1 para a interação DNA-cafeína. Linha vermelha: ajuste com a eq. 5.7. Deste ajuste extraímos o número de exclusão de vizinhos $N = 1,0 \pm 0,1$.	71
Figura 5-6 : PBS1-Pontos: dado experimental da figura 5.2 para a interação DNA-cafeína. Linha vermelha: ajuste com a eq. 5.7. Deste ajuste extraímos o número de exclusão de vizinhos $N = 1,0 \pm 0,1$.	71
Figura 5-7: Pontos: dado experimental obtido de [25] para a interação DNA-EtBr. Linha vermelha: ajuste com a eq. 5.7. Deste ajuste extraímos duas propriedades físico-químicas importantes do sistema, $K_i = 4,5 \pm 2,0 \times 10^5 M^{-1}$ e $N = 1,7 \pm 0,1$. Isto indica que cada molécula de EtBr intercalada ocupa efetivamente cerca de dois pares de base na molécula de DNA.	73
Figura 5-8: Possíveis sítios para a adsorção da molécula de água para uma fita do DNA contendo as bases timina e guanina. Os sítios 1 e 2 são ao redor do grupo fosfato, o sitio 3 é ao redor dos açúcares e o sitio 4 é ao redor das bases. Foto obtida de [48]	74
Figura 5-9:PBS 150- Comprimento de persistência (A) em função da concentração total de cafeína CT para alta força iônica [150 mM]. Observe o comportamento não monotônico da persistência.	77
Figura 5-10:PBS 1- Comprimento de persistência (A) em função da concentração total de cafeína CT para baixa força iônica [1 mM]. Observe o comportamento monotônico da persistência.	78
Figura 5-11: Esquema demonstrando o comprimento de persistência local do modelo de desordem de sítios.	80
Figura 5-12:PBS 150- Ajuste do comprimento de persistência para forças iônicas altas. Ajuste de A feito pelas isortemas de Hill e exclusão de vizinhos (NEM). Note que ao contrário do modelo de Hill, o modelo de exclusão de vizinhos não consegue descrever os pontos experimentais.	83
Figura 5-13:PBS1- Ajuste do comprimento de persistência para força iônica baixa. Ajuste de A feito pelas isortemas de Hill e exclusão de vizinhos (NEM). Note que ao contrário do regime de alta força iônica, para esse caso, os dois modelos conseguem descrever bem os dados experimentais.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1: Os principais parâmetros das três formas canônicas do DNA de dupla fita. * A fenda maior é trocada por uma superfície convexa. ** O tamanho da fenda menor depende da sequência de nucleotídeos [55].	21
Tabela 4-1: Quantidade de cafeína encontrada em fontes alimentares [56].	47

RESUMO

MOURA, Tiago de Assis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Efeitos da cafeína sobre a estrutura da molécula de DNA: um estudo por espectroscopia de força.** Orientador: Márcio Santos Rocha.

Neste trabalho, utilizando a técnica de pinça óptica, foi possível estudar as alterações das propriedades mecânicas do complexo DNA-cafeína em função da concentração de cafeína na amostra, nos regimes de força iônica alta (concentração total de sódio de 150 mM) e força iônica baixa (concentração total de sódio de 1 mM). Utilizando o modelo de exclusão de vizinhos para ajustar os dados obtidos experimentalmente para o comprimento de contorno, demonstramos que a cafeína não possui comportamento de intercalante. Além disso, fomos capazes de observar uma mudança conformacional da molécula de DNA devido a ligação com a cafeína, onde essa mudança ocorre no sentido de transformar o B-DNA em A-DNA. A alteração da força iônica da solução foi capaz de mudar a forma de interação da cafeína ao DNA. Para força iônica alta, a ligação da cafeína ao DNA apresenta cooperatividade positiva, possuindo um coeficiente de Hill (n) igual a 3. No regime de força iônica baixa, a cooperatividade da ligação desapareceu e o coeficiente de Hill diminuiu para 1. Fomos capazes também de estimar o constante de ligação da cafeína ao DNA como sendo $K_i = (0,3 \pm 0,02)10^{-1}M^{-1}$ para força iônica alta e $K_i = (7,3 \pm 4,0)10^{-1}M^{-1}$ no regime de força iônica baixa.

ABSTRACT

MOURA, Tiago de Assis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **The effects of caffeine on the DNA molecule: A force spectroscopy study**. Adviser: Márcio Santos Rocha.

In this work, by using the optical tweezer method, it was possible to study the changes of the mechanical properties of the DNA-caffeine compound according to the concentration of caffeine in the sample, for the high ionic strength regime (total sodium concentration of 150 mM) and for the low ionic strength regime (total sodium concentration of 1 mM). Using the neighbor-exclusion principle to adjust the data obtained experimentally to the contour length, we showed that the caffeine doesn't present intercalating behavior. Besides, we were able to observe a conformational change in the DNA molecule due to the bonding with the caffeine, where this change occurs in the sense of changing the B-DNA into A-DNA. For the high ionic strength, the bonding of the caffeine with the DNA presents positive cooperativity, having a Hill coefficient (n) equals to 3. For the low ionic strength regime, the bonding cooperativity disappeared and the Hill coefficient decreased to 1. We were able to estimate the binding constant of the caffeine with the DNA as $K_i = (0,3 \pm 0,02)10^{-1}M^{-1}$ for the high ionic strength and $K_i = (7,3 \pm 4,0)10^{-1}M^{-1}$ for the low ionic strength regime.

Capítulo 1

1. Introdução

A cafeína é uma das drogas mais consumidas no mundo [1]. Classificada como um alcaloide do grupo das xantinas é encontrada em várias fontes alimentares como: café, chás, refrigerantes, chocolates e etc. O principal mecanismo de ação biológica da cafeína ocorre no sistema nervoso autônomo por meio da inibição dos receptores de adenosina [2]. Além disso, a cafeína possui uma extensa aplicação clínica, por exemplo, podemos citar sua aplicação no tratamento de apneia em recém-nascidos [3], tratamento de depressão respiratória em adultos [1] e estimulante para o tratamento de cefaleia [4]. Existe ainda uma extensa literatura sobre os possíveis efeitos anticancerígenos da cafeína [1], [2], [5], além de sua ação na inibição e tratamento do mal de Alzheimer [6]–[8].

Em particular, despertou o nosso interesse a interação da cafeína com ligantes¹ aromáticos, que apresentaram uma considerável redução em sua atividade farmacológica (ou toxicidade, dependendo da natureza do ligante), frequentemente associada a sua interação com as moléculas de DNA [9], [10]. Além disso, dados de espectroscopia RMN (Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear) sugerem que a cafeína tem a capacidade de interagir com o DNA [11] e de formar hétero-complexos com ácidos nucleicos [12]. Os mecanismos da interação cafeína-DNA que levam a redução da atividade farmacológica (ou toxicidade) de ligantes aromáticos ainda permanecem em aberto na literatura. De fato, a própria interação da cafeína com o DNA não é bem conhecida.

Nesse sentido, desenvolvemos esse trabalho com a intenção de mostrar uma abordagem inédita sobre a interação DNA-cafeína usando a técnica de pinça óptica. A grosso modo, a pinça óptica consiste de um laser fortemente focalizado pela objetiva

¹ Nesse trabalho, ligante é qualquer molécula que tem a capacidade de interagir com o DNA, por exemplo: fármacos, proteínas, corantes biológicos, etc.

de um microscópio. No capítulo 2 detalharemos o processo de pinçamento e quais são as condições necessárias para que ele ocorra.

O fato de optarmos por essa técnica é porque acreditamos que a pinça óptica apresente algumas vantagens em relação as outras técnicas relatadas na literatura (como RMN [11], espectroscopia de absorção e espectroscopia fluorescência [10]), tais como: exclusão de efeitos coletivos (uma vez que a técnica de pinça óptica é uma técnica de molécula única), maior precisão para medir a baixa interação da cafeína no DNA (relatado em [11]), a possibilidade de medir as alterações mecânicas na molécula de DNA devido a interação com a cafeína, entre outros.

Os parâmetros mecânicos de interesse do DNA são: seu comprimento de persistência (A) e seu comprimento de contorno (L). O primeiro está ligado a rigidez da molécula de DNA, quanto maior o comprimento de persistência, mais rígida é a molécula e mais difícil de ser dobrada ela é; e quanto menor for o comprimento de persistência mais maleável é a molécula. O segundo é o comprimento da molécula esticada de uma ponta a outra, que fornece uma ideia direta do tamanho linear da molécula de DNA. No capítulo 3, mostraremos que a partir dos parâmetros mecânicos extraídos, podemos fazer uma conexão entre as propriedades mecânicas e físico-químicas do sistema.

Em resumo, no capítulo 2, discutiremos os aspectos gerais de uma pinça óptica, seu princípio de funcionamento e detalharemos o processo de calibração de uma pinça óptica.

No capítulo 3, começaremos discutindo algumas características da molécula de DNA que julgamos ser importantes para o entendimento desse trabalho, em seguida, faremos uma pequena revisão sobre a mecânica de polímeros e por último, discutiremos os modelos de Hill e McGhee-Von Hippel, usados para descrever a interação de ligantes em solução.

No capítulo 4, apresentaremos todo o procedimento experimental para a caracterização da interação DNA-Cafeína.

No capítulo 5, apresentaremos e discutiremos todos os resultados obtidos.

No capítulo 6, apresentaremos as conclusões e perspectivas desse trabalho.

Por fim, o apêndice A é dedicado a explicar o regime entrópico, que é o regime sobre o qual nossos experimentos são realizados.

Capítulo 2

2. Aspectos gerais de uma pinça óptica

Neste capítulo, apresentaremos um breve resumo histórico da criação e desenvolvimento da técnica de pinça óptica. Além disso, discutiremos alguns aspectos teóricos relacionado ao fenômeno do pinçamento óptico e a técnica de calibração da pinça óptica utilizada nesse trabalho. Esse capítulo foi baseado na tese de doutorado de Marcio Santos Rocha, que apresentou de maneira simples e elegante o funcionamento das pinças ópticas.

2.1 Breve histórico sobre o desenvolvimento da técnica de pinça óptica.

Johannes Kepler (1571-1630) foi um dos primeiros cientistas a intuir que a luz seria capaz de empurrar alguns objetos, ele acreditava que os raios solares atuando na cauda dos cometas os varreria para longe, em uma direção sempre oposta ao Sol.

Alguns séculos mais tarde, o físico e matemático escocês James Clerk Maxwell (1831-1879), através de seu brilhante trabalho em eletrodinâmica, demonstrou que Kepler estava certo, entretanto, as forças exercidas pelos feixes de luz são insignificantes frente a objetos macroscópicos. Além disso, são extremamente rarefeitos, o que leva na prática, serem fracos até para objetos microscópicos.

Com o surgimento do raio laser em 1960, que é capaz de concentrar uma grande quantidade de luz em um único feixe, passa a surgir a possibilidade de utilizar a luz como uma ferramenta para manipulação de objetos na escala microscópica.

Foi Arthur Ashkin em 1969, trabalhando nos laboratórios Bell, nos Estados Unidos, que primeiro utilizou os lasers para manipulação e aprisionamento de pequenas partículas dielétricas dando início a uma revolução tanto na física como na biologia [13]. Em particular, chamou a atenção a grande aceleração que as partículas adquiriam ao serem colididas com o feixe de um laser, mesmo por um laser de baixa potência (a concentração dos feixes garante a eficácia).

No começo, a técnica foi desenvolvida para a manipulação e aprisionamento de pequenos átomos, o que lhe rendeu o nome de pinça óptica, mas foi a partir de 1987, que as pinças ópticas encontraram sua maior utilidade, dentro da Biologia [14], [15]. Dentre as várias aplicações da técnica de pinça óptica dentro da biologia, podemos destacar o aprisionamento de vírus e bactérias, manipulação de células individuais, estudo de propriedades mecânicas de membranas celulares, estudo de proteínas, interação DNA-compostos, entre outras.

2.2 Princípio de funcionamento.

Durante o século XIX, com o desenvolvimento da teoria eletromagnética de Maxwell, foi possível demonstrar que a luz transmite momento ao incidir sobre o meio. Essa força depende da potência da luz incidente e da velocidade de propagação no meio de incidência. Então, para um único raio (me refiro a uma porção de largura infinitesimal do feixe), a força devido à pressão de radiação é:

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

onde:

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

onde P_r é a potência do laser e n é o índice de refração do meio de incidência.

Para entendermos a origem quântica do fenômeno do pinçamento óptico, voltaremos para o início do século XX. Para explicar o fenômeno da radiação de corpo negro, o físico alemão Max Planck (1858-1947), postulou em 1901, que a energia emitida por eles era discretizada em pequenos pacotes de energia chamados de “quanta”. Em 1905, Albert Einstein (1878-1955), explicou o efeito fotoelétrico aplicando o conceito dos quanta de energia de Planck também à luz. Os quanta de luz, denominados fótons, possuíam momento que podiam ser transferido para o meio

ao incidir sobre ele. Essa transferência de momento é capaz de gerar uma força sobre o objeto, que é extremamente pequena, sendo mais fácil de verificá-la experimentalmente utilizando feixes de luz muito intensos, como o laser, e pequenos objetos de tamanho na escala de micrometros.

Para termos uma ideia da ordem de grandeza das forças envolvidas, vamos calcular a pressão de radiação produzida por um laser de poucos mW de potência (potência típica utilizada nos experimentos com pinça óptica), incidindo radialmente sobre uma microesfera.

Cada fóton absorvido possui um momento dado por:

$$\vec{p} = \hbar \vec{k}, \quad (2.3)$$

onde \vec{k} é o vetor de onda e \hbar é a constante de Planck dividida por 2π . Escrevendo a eq. 2.3 em modulo, temos:

$$p = \hbar k = \hbar \frac{\omega}{c} = \frac{E}{c}, \quad (2.4)$$

onde c é a velocidade do fóton, ω é frequência da luz incidente e $E = \hbar\omega$ é a energia de cada fóton. Em um feixe de N fótons, teremos $E_f = N\hbar\omega = NE$.

O feixe exerce uma força sobre a microesfera que pela 2ª lei de Newton é dada por:

$$F = \frac{dp}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{E_f}{c} \right) = \frac{P_f}{c}, \quad (2.5)$$

onde P_f é a potência do feixe incidente. Assim, podemos estimar a força sobre a microesfera como sendo:

$$F \approx \frac{1 \cdot 10^{-3} \text{ W}}{3 \cdot 10^8 \text{ m/s}} \approx 10^{-11} = 10 \text{ pN}. \quad (2.6)$$

Quando a luz interage com a matéria ela pode ser refletida, absorvida e refratada. Como mencionamos nos parágrafos anteriores, a reflexão da luz está associada a transferência de momento e chamamos esse efeito de pressão de radiação. Outra interação que exerce um papel fundamental no fenômeno de pinçamento óptico é a refração. Quando o raio de luz é refratado, ele muda a direção

da sua trajetória se os índices de refração do meio e do objeto são diferentes. Essa mudança de trajetória do raio de luz está acompanhada de uma mudança no momento linear da luz. Para conservar o momento linear do sistema luz-objeto, o objeto sofrerá uma mudança de momento linear igual e oposta a aquela sofrida pelo raio de luz ao refratar no objeto. Como o objeto possui massa, essa variação de momento está, de acordo com a 2ª lei de Newton, associada a uma força.

Vamos então fazer uma análise qualitativa do fenômeno de pinçamento óptico, considerando que o objeto seja uma microesfera dielétrica e a fonte de luz seja um laser com padrão gaussiano. Além disso, faremos nossa análise no regime da ótica geométrica, ou seja, quando o raio da microesfera é muito maior que o comprimento de onda da luz ($a \gg \lambda$).

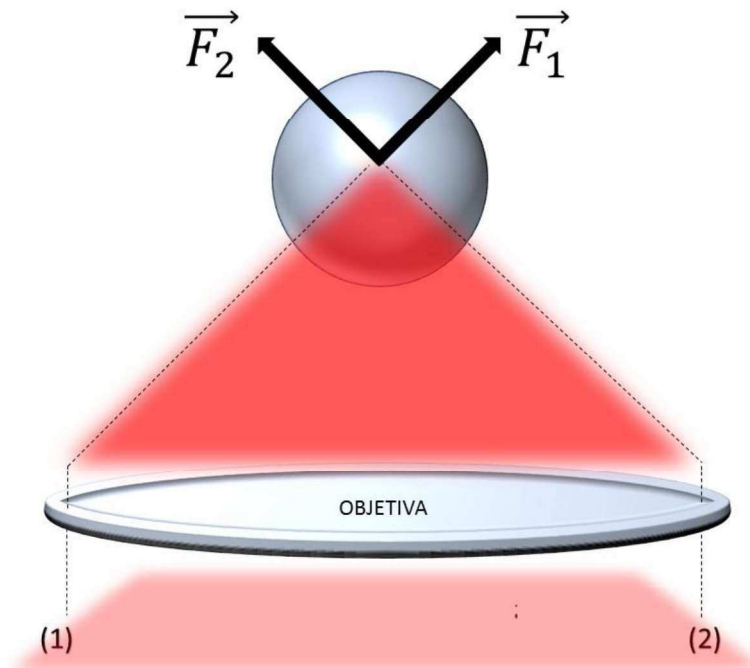


Figura 2-1: Pressão de radiação. A força resultante neste caso, empurra a microesfera no sentido de incidência do feixe.

A figura 2.1, mostra dois raios do feixe de extremidades opostas, que ao incidir sobre a superfície da microesfera são refletidos. A reflexão do raio 1 dá origem a força \vec{F}_1 na microesfera, e a reflexão do raio 2 dá origem a força \vec{F}_2 na microesfera. A força resultante nesse caso tende a empurrar a microesfera no sentido de incidência do feixe. Como já explicamos anteriormente, ao refletir sobre a superfície, o raio do laser

transfere momento através dos fótons o que causa a variação de momento da microesfera, o que de acordo com a 2ª lei de Newton, é igual a resultante das forças que atuam sobre a microesfera.

Como a figura 2.1, mostra claramente, a pressão de radiação tende a empurrar a microesfera no sentido de incidência do feixe, logo, isso dificulta o processo de pinçamento, assim a pressão de radiação não é a interação responsável pelo aprisionamento. Vamos então discutir os efeitos da refração. Para que tenhamos uma força que atue de forma oposta a força gerada pela reflexão é necessário que a variação de momento sofrida pelo raio seja tal que a força líquida que atue na microesfera seja no sentido de leva-la para o foco. Isso exige que o índice de refração da microesfera seja maior que a do meio no qual ela está inserida e que o laser possua um padrão gaussiano (mais intenso no centro) conforme mostra a figura abaixo.

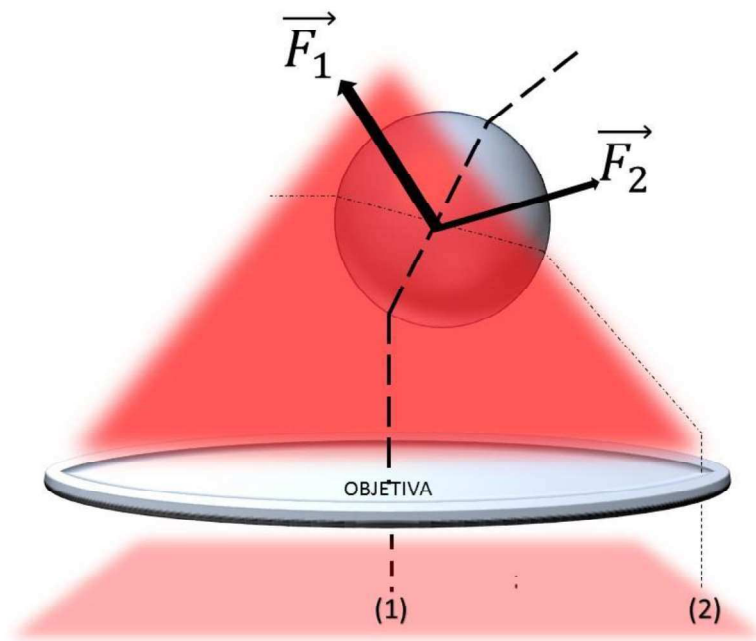


Figura 2-2: Efeito da refração. A microesfera está situada na região abaixo do foco e, nesse caso, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe

A figura 2.2, mostra uma situação na qual a microesfera está situada numa região abaixo do foco. O raio (1) sofre um desvio na sua trajetória ao passar pela microesfera e, portanto, varia seu momento linear. Para conservar o momento linear total do sistema raio-microesfera, a esfera sofre uma variação de momento de mesmo

modulo, mas, de sentido contrário ao sofrido pelo raio ao atravessar a interface meio-esfera. Devido a massa da microesfera, a variação de momento no raio (1) dá origem a força \vec{F}_1 sofrida pela microesfera. Da mesma forma, o raio (2) dá origem a força \vec{F}_2 . Mas, devido ao perfil gaussiano de intensidade do laser, a força \vec{F}_2 é menor que a força \vec{F}_1 , de forma que a força resultante aponta para a esquerda e para cima, empurrando a microesfera para o foco do feixe.

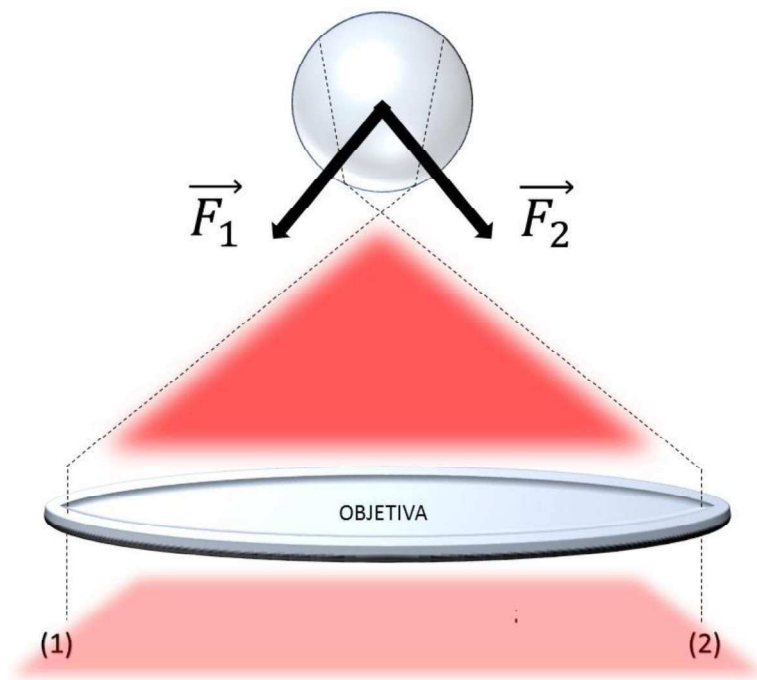


Figura 2-3: Efeito da refração. A microesfera está situada na região acima do foco e, mais uma vez, a força resultante empurra a microesfera para o foco do feixe.

A figura 2.3, mostra a situação na qual a microesfera está situada em uma região acima do foco. Analogamente ao que ocorre quando ela se encontra abaixo do foco, as refrações dos raios originarão forças na microesfera de forma a conservar o momento linear total do sistema raio-microesfera. Entretanto, nessa situação, a força resultante na microesfera irá apontar para baixo, de forma a empurrar a microesfera novamente em direção ao foco do feixe.

Portanto, temos que, a ação das forças de refração são a de aprisionar a microesfera próximo da região focal (como mostrado nas figuras 2.2 e 2.3) enquanto que a pressão de radiação tende a atrapalhar esse processo. Por isso, é necessário

escolher o padrão gaussiano junto com as microesferas dielétricas afim de diminuir o efeito da pressão de radiação.

Toda a discussão que fizemos foi feita no limite da óptica geométrica ($a \gg \lambda$). Quando o raio da microesfera é muito menor que o comprimento de onda da luz incidente, estamos no chamado limite de Rayleigh. Neste caso, a esfera se comporta como um dipolo elétrico induzido em um campo elétrico. A força que atua na microesfera é proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico da radiação incidente. Essa força faz com que a microesfera se mova para a direção de maior intensidade do campo, ou seja, o foco. Mais uma vez, a microesfera ficará presa na região focal.

Para finalizar essa seção, gostaríamos de salientar que o fenômeno do pinçamento óptico pode ocorrer em situações em que a partícula não seja dielétrica e o laser não possua o padrão gaussiano. A teoria MDSA (Mie Debye Spherical Aberration) desenvolvida pelo professor H. M. Nussenzverg e colaboradores [15], [16], é a teoria mais geral sobre pinças ópticas. A teoria MDSA descreve, quantitativamente, a força do laser sobre uma microesfera de raio, material e índice de refração arbitrários.

2.3 Calibração pinça óptica

Como discutimos na seção anterior, a força de gradiente em uma microesfera dielétrica de índice de refração maior que a do meio no qual ela está inserida, cria na região próxima ao foco do laser, um poço de potencial que para pequenos deslocamentos pode ser considerado harmônico.

Tal como a lei de Hooke, podemos associar a força gerada pela pinça como sendo do tipo $F = -\kappa x$, onde κ (constante de força da pinça) é um parâmetro que mostra o quão forte é a pinça. Então, o objetivo da calibração é conhecer o valor de κ para a configuração do experimento. Como veremos nessa seção, o valor de κ

depende de vários fatores como, por exemplo, raio da microesfera, temperatura do ambiente, etc.

Existem vários métodos que nos permitem calcular o valor de κ , alguns deles podem ser vistos na referencia [17]. Para nosso experimento, utilizamos o método de Stokes, que consiste em deslocar a lamínula no estágio do microscópio (com auxílio de um piezoelétrico) com velocidade \vec{v} (constante) e medir a nova posição de equilíbrio da microesfera.

Quando a lamínula está parada, a microesfera se encontra em “repouso” no fundo do poço de potencial como mostra a figura 2.4. A microesfera está sujeita as colisões aleatórias com as moléculas do meio onde ela se encontra (essencialmente água). Como o movimento é aleatório, a velocidade média da microesfera é nula e, conseqüentemente, a força de Stokes também é nula. Devido a essas colisões, a microesfera está sujeita tanto a força óptica restauradora quanto a força aleatória devido a interação com o fluido, configurando um oscilador harmônico browniano.

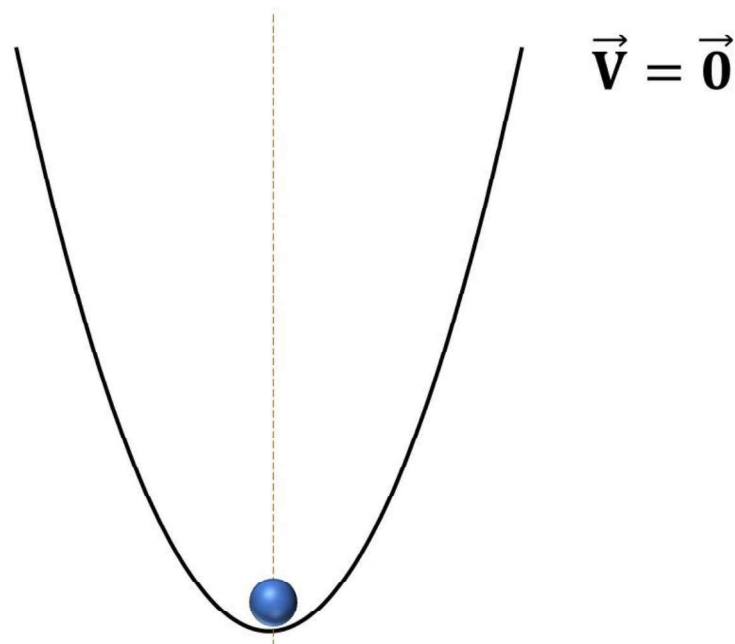


Figura 2-4:Microesfera presa na posição de equilíbrio no poço de potencial gerado pela pinça óptica.

A figura 2.5 mostra a situação quando movimentamos a lamínula com velocidade constante. O fluido na lamínula também se movimenta com a mesma

velocidade, o movimento do fluido através da microesfera dá origem a uma força de atrito denominada de força de Stokes. A força de Stokes faz com que a microesfera atinja uma nova posição² de equilíbrio dentro do poço de potencial. Nessa posição, a força de Stokes é igual, em módulo, a força óptica gerada pelo laser.

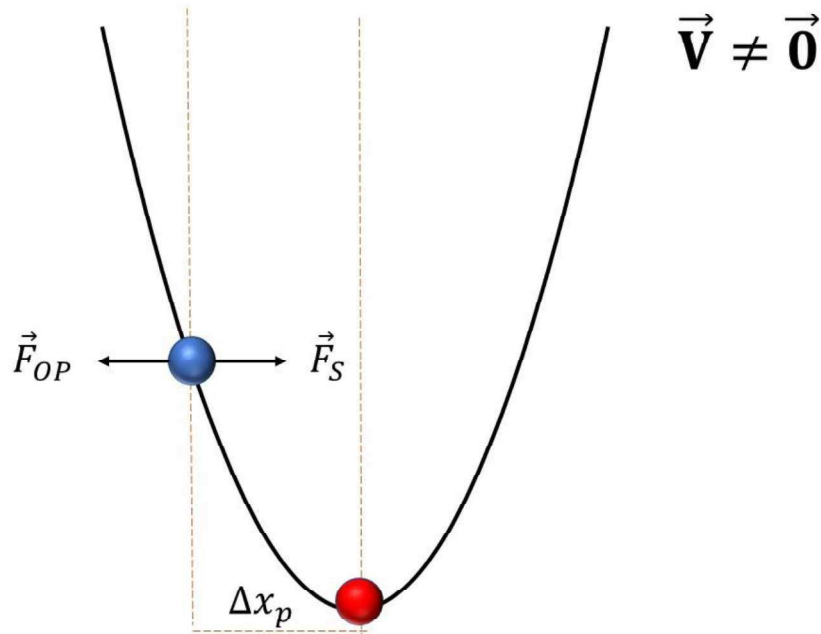


Figura 2-5: Ao ligar o motor, a microesfera é empurrada pelo fluido e fica em equilíbrio em uma nova posição no poço de potencial gerado pela pinça. A microesfera azul, na nova posição de equilíbrio e a microesfera vermelha, na posição de equilíbrio original.

A força de Stokes pode ser escrita como:

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

Onde γ é o atrito viscoso e \vec{v} é a velocidade.

O atrito viscoso sobre uma microesfera em solução aquosa é dado pela expressão aproximada [18],

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

² Cada velocidade de movimento do fluido, gera uma posição de equilíbrio diferente.

Onde a é o raio das microesferas, h é a distância do centro da microesfera em relação à lamínula e n_α é a viscosidade da água, que depende da temperatura via expressão empírica:

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

onde t_c é a temperatura em graus Celsius.

Na nova posição de equilíbrio, podemos escrever, em módulo, $F_{pinça} = F_s$, ou seja:

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

Reescrevendo a eq.2.10 temos:

$$v = b \Delta x_p, \text{ onde } b = \frac{\kappa}{\gamma}. \quad (2.11)$$

A calibração é feita medindo a nova posição de equilíbrio da microesfera no poço para diferentes velocidades de movimento do fluido. Com esses dados, plotamos um gráfico da velocidade por posição de equilíbrio, conforme mostra a eq. 2.11, podemos extrair o valor b a partir do gráfico.

Para descobrir o valor de Δx_p , foi feita uma filmagem de todo o experimento utilizando o programa “StreamPix”, que faz a captura das imagens formando um vídeo. O procedimento é composto por duas etapas:

1) O vídeo foi iniciado com a microesfera parada (ou melhor dizendo, executando movimento Browniano, parado aqui se refere ao fato que a posição média dela dentro do poço não muda) dentro do poço de potencial da pinça, afim de encontrar a posição do centro de massa da microesfera quando ela se encontra como mostrada na figura 2.4.

2) Após aproximadamente 5 segundos, o piezoelétrico movimenta a lamínula com uma velocidade constante e a microesfera atinge a nova posição de equilíbrio, como mostrada na figura 2.5. Utilizando o programa “ImageJ”, que fornece os valores do centro de massa da microesfera em função do tempo, é possível determinar o valor de Δx_p para cada velocidade utilizada.

Com o auxílio das eqs. 2.8 e 2.9, podemos calcular o valor de γ , conhecendo o valor do raio da microesfera a (que é fornecido pelo fabricante, no nosso caso o valor é $1,5 \mu\text{m}$), a altura h (que é encontrada movimentando o foco do microscópio) e a temperatura (que é mantida fixa durante todo o experimento, no nosso caso é a temperatura ambiente).

Conhecendo b e γ , podemos determinar o valor de κ . Em nossos experimentos, a constante de força era de $7,2 \text{ pN}/\mu\text{m}$, para estiramentos para o lado direito e $6,0 \text{ pN}/\mu\text{m}$, para estiramentos para o lado esquerdo. Com essa constante de força, obtemos nos experimentos com a molécula de DNA, forças na ordem de até 5pN , que como veremos no capítulo 3, está dentro do chamado regime entrópico.

Capítulo 3

3. O DNA

Nesse capítulo, apresentaremos alguns aspectos biológicos importantes sobre a molécula de DNA. Além disso, faremos um pequeno resumo sobre a mecânica de polímeros, com ênfase em polímeros semiflexíveis e realizando a dedução matemática do modelo Worm-Like-Chain (WLC) obtido por Marko e Siggia em 1995 [19]. Finalizamos esse capítulo descrevendo os modelos que descrevem a interação DNA-ligante.

3.1 Estrutura da Molécula de DNA

É surpreendente dizer que um artigo de apenas duas páginas tenha o poder de transformar o mundo. Entretanto, na manhã do dia 23 de abril de 1953 foi exatamente isso que aconteceu. Escrito por J. D. Watson and F. H. C. Crick [20] e publicado pela Nature, o artigo intitulado “**A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid**” foi um evento decisivo, desencadeando um desenvolvimento expressivo na biologia molecular.

A importância do papel desempenhado hoje pelos ácidos nucleicos é inquestionável. O ácido desoxirribonucleico (DNA) em cada célula comporta-se como um “banco de dados” e a informação nele armazenada permite que cada constituinte celular seja sintetizado, montado e regulado.

Todas as macromoléculas dos ácidos nucleicos são formadas pela cadeia regular de mesmo argumento:



Figura 3-1: O monômero de DNA.

Onde o açúcar é uma ribose (RNA) ou uma desoxirribose (DNA). A ligação ester³ entre o fosfato e o açúcar pode ser feita tanto com átomo C3' ou com o átomo C5' do açúcar criando uma polarização na cadeia polimérica, onde a unidade monomérica é chamada de nucleotídeo. A sequência de nucleotídeos é convencionalmente escrita como um conjunto de bases indo da esquerda para a direita, tal que cada ligação fosfodiéster⁴ é feita ligando o 3' do açúcar na esquerda e do 5' do açúcar da direita.

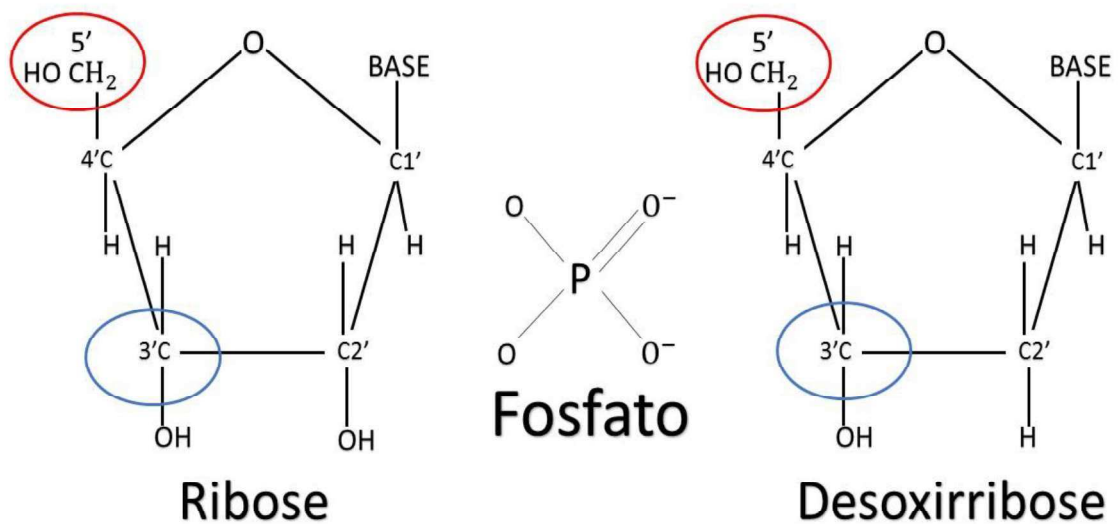


Figura 3-2: A molécula de fosfato e os açúcares dos ácidos nucleicos. Em destaque vermelho, o átomo C5' e em destaque azul, o átomo C3'.

³ Na química orgânica e bioquímica, um éster é o produto formal da reação de um oxiácido (geralmente orgânico) com um álcool, fenol, heteroarenol ou enol, pela perda formal de água, formada pelo hidrogênio ácido do primeiro com o grupo hidroxila do segundo [51].

⁴ Uma ligação fosfodiéster é um tipo de ligação covalente que é produzida entre dois grupos hidroxila (-OH) de um grupo fosfato e duas hidroxilas de outras duas moléculas por meio de uma dupla ligação éster [52].

Também deve ser apontado que, embora o grupo fosfato do nucleotídeo possa transportar duas cargas negativas, há apenas uma única carga negativa por argumento (e, portanto, por base) no polímero. Isso implica que ácidos nucleicos possuem uma grande carga negativa espalhada pela cadeia polimérica cuja importância se reflete tanto na conformação da molécula em um determinado meio como na interação com outras moléculas carregadas e íons.

As bases são agrupadas em duas categorias devido a sua estrutura molecular, Citosina (C) e Timina (T) são chamadas de pirimidinas porque todas elas derivam do anel de seis membros da pirimidina. Guanina (G) e Adenina (A) são denominadas purinas, pois possuem um segundo anel de 5 carbonos fundido ao anel de 6 carbonos. Cada uma dessas quatro bases estão ligadas à desoxirribose no DNA. No RNA mensageiro e RNA ribossomo, a Timina é trocada pela Uracila e as bases estão ligadas a ribose.

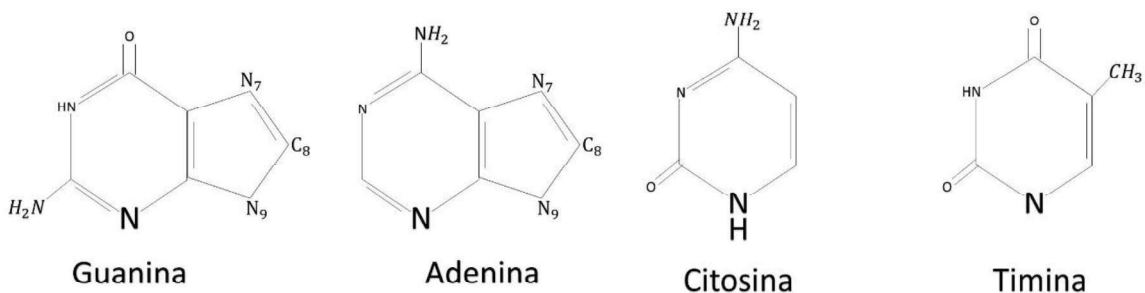


Figura 3-3: As bases nitrogenadas púricas, Guanina e Adenina.

Figura 3-4: As bases nitrogenadas pirimidicas, Citosina e Timina.

A forma e a estrutura das bases permitem que elas formem ligação de hidrogênio eficientemente entre uma purina e uma pirimidina. Cada base possui seu respectivo ligante, duas ligações de hidrogênio são formadas entre A e T, enquanto que três ligações de hidrogênio são formadas entre C e G. Assim, o DNA possui o mesmo número de (C e T) e de (G e A), de maneira que $C+T=A+G$.

As bases podem se parear dessa maneira apenas se as duas cadeias polinucleotídicas que as contem forem antiparalelas uma em relação a outra, isto é, se a polaridade de uma fita for orientada de forma oposta a outra. A conformação em dupla hélice será abordada na seção seguinte.

Os vários ácidos nucleicos podem interagir com diversas proteínas, fármacos, substâncias, etc. (que de uma maneira geral chamaremos apenas de ligante). Essas interações envolvem a estrutura, a conformação, a carga, a hidratação e a dinâmica de toda ou parte do DNA. Nos eucariotos, o DNA é empacotado em estruturas compactas, cromatina, organizadas em cromossomos cuja arquitetura típica é visível durante a metáfase.

3.2 Dupla hélice e polimorfismo no DNA.

Até a década de 1940, os biólogos tinham uma certa dificuldade de compreender como o DNA era capaz de armazenar e transmitir a informação genética. Toda a informação conhecida era que o DNA era um longo polímero composto por apenas 4 bases que se repetiam, e que essa repetição estava de alguma maneira relacionada com a informação genética que ela carregava. Na transição das décadas de 1940 e 1950, o DNA foi examinado com o uso da técnica de difração de Raios-x [21]. Os primeiros resultados sugeriam que o DNA era uma dupla fita polimérica enroladas entre si em forma de uma dupla hélice. Com base nesses dados, Watson e Crick formularam seu famoso modelo em 1953 [20].

A partir do modelo de Watson e Crick (figura 3.5), a semi-conservação do DNA pode ser finalmente explicada. Cada fita de DNA é composta de uma cadeia de nucleotídeos, a primeira fita possui uma certa polarização (3'-5') e uma certa sequência de nucleotídeos. A segunda fita é composta por uma cadeia de nucleotídeos complementar a primeira cadeia (A-T, C-G) e cuja polarização é oposta à da primeira fita (5'-3'). As fitas são mantidas unidas através de ligações de hidrogênio em suas bases (duas ligações de hidrogênio para o par A-T e três ligações para o par C-G). Dessa maneira, cada fita é uma imagem complementar da outra, o que permite a duplicação de uma molécula em duas idênticas. Enzimas são responsáveis por desfazer a dupla hélice e abrir a dupla fita (como um zíper, rompendo as ligações de hidrogênio entre as bases), enquanto outras são responsáveis por montar, a partir das duas fitas (usando como molde), duas moléculas idênticas de DNA (já que cada base só aceita uma única combinação).

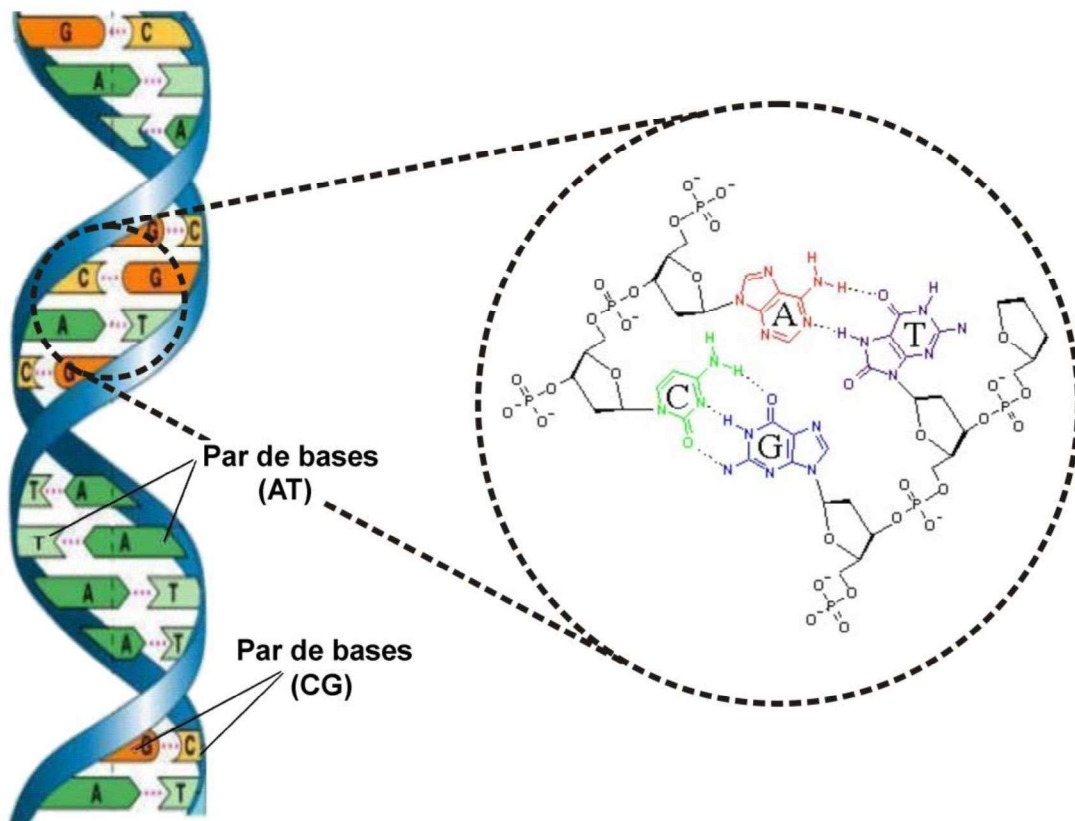


Figura 3-5: Desenho esquemático da molécula de DNA baseado no modelo de Watson e Crick , mostrando: a estrutura em dupla hélice, o pareamento das bases nitrogenadas e as ligações de hidrogênio [53].

A estrutura tridimensional do DNA em dupla hélice é decorrente das características químicas e estruturais das cadeias polipeptídicas, com as bases voltadas para dentro e o esqueleto de açúcar-fosfato na periferia. Além disso, a conformação da molécula depende das características físicas e químicas do meio onde ela está inserida⁵, isso fica mais evidente nas chamadas formas canônicas⁶ do DNA : A, B e Z.

⁵ Parâmetros como: temperatura, força iônica do meio, nível de hidratação, etc.

⁶ Na verdade, essas formas representam famílias de configurações que apresentam características em comum conforme veremos nos próximos capítulos.

Na figura 3.6, comparamos as três estruturas tridimensionais do DNA em duas perspectivas espaciais diferentes.

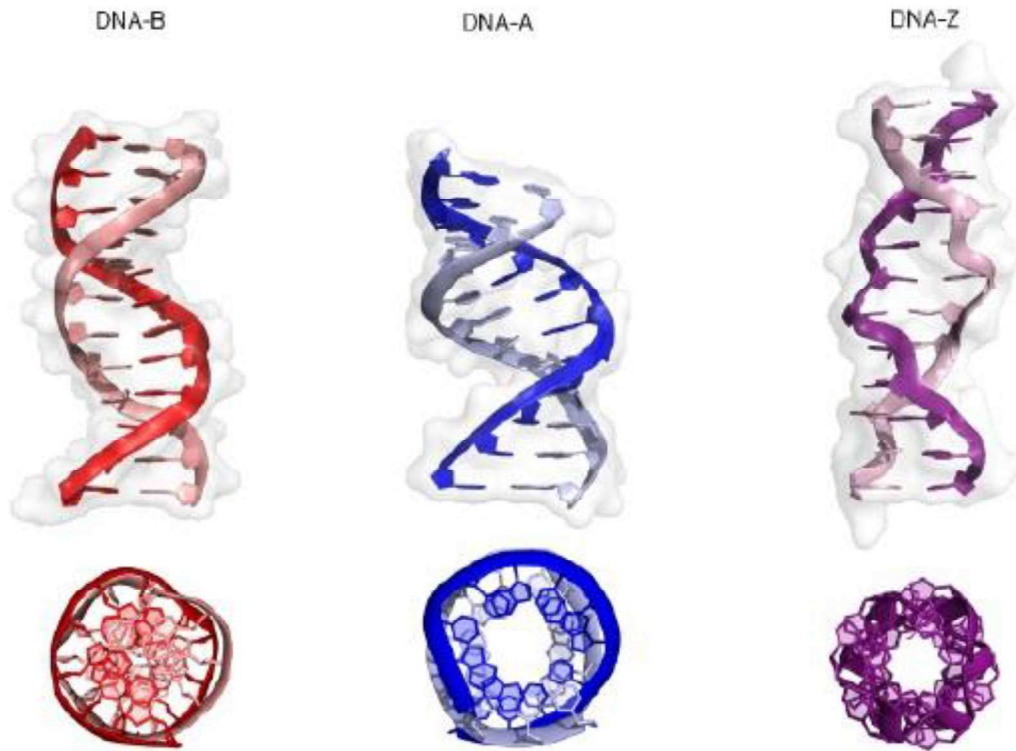


Figura 3-6: As três formas canônicas do DNA de dupla fita em duas perspectivas espaciais. Lateral e por cima, respectivamente. [54].

A forma B do DNA é a conformação mais comum de ser encontrada no *DNA in vivo* no meio fisiológico. A forma A é menos hidratada e mais compacta do que a forma B. Ao contrário das formas A e B, que possui o giro da hélice para a direita, a forma Z possui a hélice com giro para esquerda. A forma Z, além de ser mais longa e fina do que a forma B, possui estrutura em ziguezague.

Na tabela abaixo comparamos as características dos principais parâmetros de cada forma. Ao contrário das formas A e B, a forma Z não possui fenda maior na dupla hélice. A estrutura da fenda maior é trocada por uma superfície convexa. Além disso, na forma Z, o tamanho da fenda menor é variável, sendo dependente da sequência (ou tamanho da sequência) de nucleotídeos que ela contém.

Propriedade	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Giro da Hélice	Direita	Direita	Esquerda
Pares de Base por volta	10	11	12
Comprimento da hélice	34 Å	28 Å	44,6 Å
Distância entre os pares de base	3,4 Å	2,6 Å	3,7 Å
Ângulo de torção entre os pares de base	36°	32,7°	-30°
Ângulo de inclinação.	≈ 0°	≈ 20°	-7°
Comprimento da fenda maior	11,4 Å	2,4 Å	Não possui*
Comprimento da fenda menor	6,0 Å	11,0 Å	Não definido**

Tabela 3-1: Os principais parâmetros das três formas canônicas do DNA de dupla fita. * A fenda maior é trocada por uma superfície convexa. ** O tamanho da fenda menor depende da sequência de nucleotídeos [55].

3.3 Breve resumo da mecânica de polímeros semiflexíveis.

3.3.1 Flexibilidade

Estudos conformacionais do DNA e sua estrutura de dupla hélice mostram que existe apenas um intervalo limitado de ângulos na cadeia de nucleotídeos [22]. Em outras palavras, existe alguma rigidez na estrutura. Como já mencionamos nas seções anteriores, a cadeia possui uma carga líquida negativa devido ao grupo fosfato. Então, se considerarmos a repulsão Coulombiana, devido ao grupo fosfato, devemos descrever o DNA como uma molécula rígida, pelo menos em pequenos pedaços da molécula.

O DNA apresenta também polimorfismo entre as três famílias A, B e Z e a mudança de uma conformação para a outra exige uma certa plasticidade na molécula [23]. Além disso, a molécula de DNA é compactada para dimensões muito menores que seu tamanho real, nos cromossomos por exemplo, o que é feito com o auxílio de moléculas carregadas positivamente (histona, polyaminas, etc.) [24].

O termo flexibilidade abrange assim tanto os aspectos estáticos (curvatura) quanto os aspectos dinâmicos relacionados a existência da dupla hélice. O estudo da flexibilidade deve começar, portanto, com um olhar geral sobre a molécula de DNA, que envolverá o princípio geral da mecânica de polímeros em um dado meio.

3.3.2 Modelo Kratky-Porod (Curvatura contínua)

Este modelo foi proposto por Kratky e Porod em 1949, ele é capaz de descrever todos os estados entre os dois modelos extremos: cadeia perfeitamente flexível com rotação livre (cadeia gaussiana) e da cadeia perfeitamente rígida em forma de vareta.

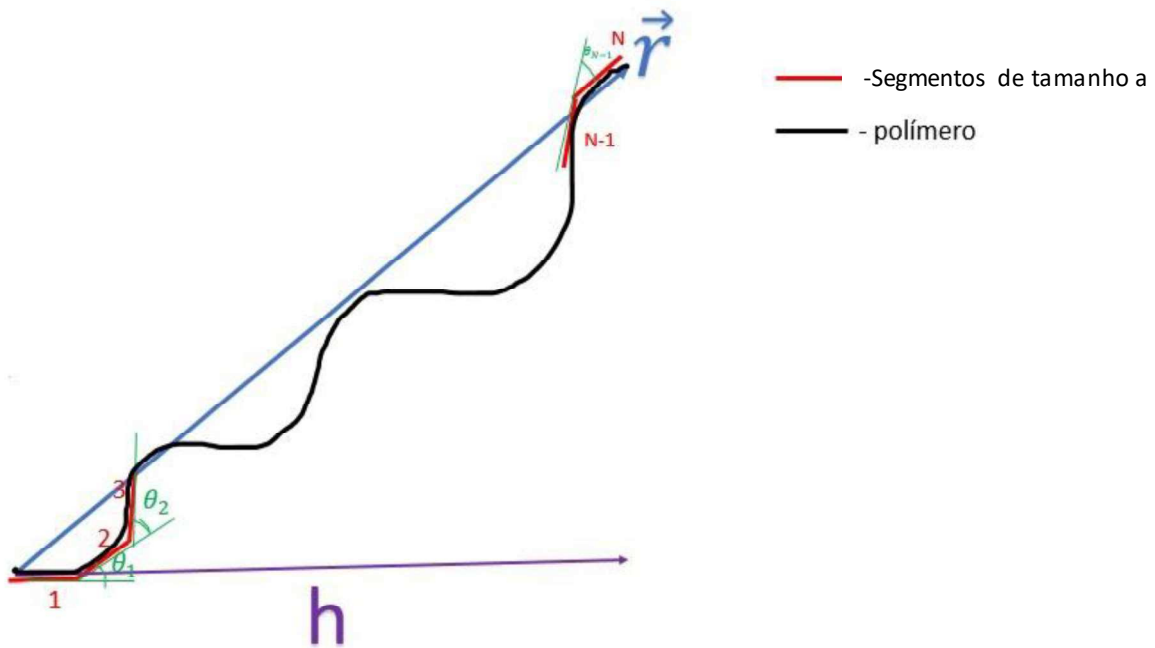


Figura 3-7: Modelo planar de Kratky-Porod, consistindo de N segmentos de tamanho a fazendo um ângulo θ_i com o segmento adjacente. Neste exemplo, h é soma das projeções dos $N-1$ segmentos sobre o primeiro segmento e \vec{r} é o vetor que liga as duas extremidades do polímero.

Considere N segmentos de tamanho a fazendo um pequeno ângulo θ_i com o segmento anterior (veja a figura 3.7). h é definido como sendo a soma das projeções dos $N-1$ segmentos sobre o primeiro segmento do polímero. Como o ângulo θ_i entre os segmentos adjacentes é pequeno, temos que $\cos \theta_1 = \cos \theta_2 \dots = \cos \theta_N = \cos \theta$, de modo que:

$$\langle h \rangle = a \sum_{k=0}^{N-1} x^k = a(1 - x^N)/(1 - x), \quad (3.1)$$

onde $x = \cos \theta$ e a média sobre h reflete o fato de o polímero executar movimento browniano ,devido ao choque com as moléculas do meio aquoso.

O comprimento de persistência A é definido como o valor limite de h quando $n \rightarrow \infty$. Então temos:

$$A = a/(1 - x). \quad (3.2)$$

Quando $\theta \rightarrow 0$, a cadeia pode ser vista como aquela para o qual A permanece finita, ou seja, na qual $a \rightarrow 0$, o que equivale a introduzir a curvatura contínua. Uma vez que θ é pequeno, podemos expandir o $\cos \theta$ em série de potências, desprezando os termos mais altos, de modo que $\cos \theta \approx 1 - \frac{\theta^2}{2}$ e então:

$$A = \frac{2a}{\theta^2}. \quad (3.3)$$

Note que o comprimento de persistência não depende do comprimento de contorno L ($L = Na$) da molécula (como definido por Rocha: “O comprimento de contorno é o comprimento do polímero propriamente dito, medido ao longo da cadeia polimérica. Em outras palavras, é a distância ponta-a-ponta do polímero quando este encontrasse numa configuração retilínea” [25]). De fato, o comprimento de persistência é uma propriedade intrínseca do polímero em um determinado meio, ele nos fornece uma ideia indireta da rigidez do polímero, quando mais rígido for o polímero, maior será seu comprimento de persistência e menos dobras ele apresentará. Logo, quanto menor o valor do comprimento de persistência, mais flexível é o polímero e mais dobras ele apresenta. Além disso, o comprimento de persistência pode ser interpretado como uma medida do alcance de perturbações locais na conformação global da molécula, representando assim, uma espécie de comprimento de correlação da cadeia polimérica.

Note que:

$$x^N = \left(1 - \frac{\theta^2}{2}\right)^N = \exp\left(-N\theta^2/2\right), \text{ para } \theta \ll 1 \quad (3.4)$$

$$\frac{L}{A} = \frac{Na\theta^2}{2a} = \frac{N\theta^2}{2}. \quad (3.5)$$

Substituindo a eq. 3.6 na eq. 3.5 temos:

$$x^N = \exp\left(-\frac{L}{A}\right) \quad (3.6)$$

Substituindo a eq. 3.6 na eq. 3.1 temos:

$$\langle h \rangle = A \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{A}\right) \right] \quad (3.7)$$

Quando $L \rightarrow \infty$, $\langle h \rangle \rightarrow A$, como previsto na definição de A. Se por outro lado a cadeia é muito pequena de modo que $L \ll A$, obtemos $\langle h \rangle \approx L$. Essa cadeia curta comporta-se como uma vareta rígida de tamanho L. Com esse modelo, podemos levar em conta, tanto a rigidez de cadeias pequenas (rigidez local) e a flexibilidade de cadeias suficientemente longa.

Podemos obter a interpretação geométrica do comprimento de persistência calculando $\langle h^2 \rangle$. Seja \vec{r} o vetor que liga as duas extremidades do polímero (figura 3.7), nós temos então $\langle h^2 \rangle = \langle \vec{r} \cdot \vec{r} \rangle$. Logo:

$$d\langle h^2 \rangle = d\langle \vec{r} \cdot \vec{r} \rangle = 2\langle \vec{r} \cdot d\vec{r} \rangle = 2\langle h \rangle dL \quad (3.8)$$

Trocando $\langle h \rangle$ pela eq. 3.7, obtemos $\langle h^2 \rangle$ por integração:

$$\langle h^2 \rangle = 2A \int_0^L \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{A}\right) \right] dL. \quad (3.9)$$

O que resulta em:

$$\langle h^2 \rangle = 2A \left\{ L - A \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{A}\right) \right] \right\}. \quad (3.10)$$

Quando $L \rightarrow \infty$, a eq. 3.10 converge para:

$$\langle h^2 \rangle = 2AL. \quad (\text{Limite flexível}) \quad (3.11)$$

A quantidade $2A$ aparece para ser a ligação estatística entre a cadeia Gaussiana e o modelo de Kratky-Porod.

Quando $L \rightarrow 0$, a eq. 3.10 converge para:

$$\langle h^2 \rangle = L^2 \left[1 - \left(\frac{1}{3}\right) \left(\frac{L}{A}\right) + \dots \right] \approx L^2 \quad (\text{Limite rígido}) \quad (3.12)$$

No limite rígido, a distância quadrática entre as extremidades do polímero é o próprio comprimento de contorno do polímero, já que nesse regime o polímero se comporta como uma vareta rígida.

Em outras palavras, podemos associar o comprimento de persistência ao comprimento de correlação da cadeia, ou seja, é uma medida do alcance de perturbações locais na conformação da molécula.

3.3.3 Calculo da Energia de Flexibilidade

Agora calcularemos a energia necessária para produzir uma curvatura no polímero. Vamos assumir inicialmente que a curvatura acontece no plano. Podemos definir uma energia por unidade de comprimento da cadeia (dG/ds) requerida para produzir uma curvatura $d\theta/ds$. Onde dG é uma mudança elementar na energia livre. Para pequenos valores da curvatura, podemos escrever:

$$\frac{dG}{ds} = \frac{dG}{d\theta} \cdot \frac{d\theta}{ds} + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2G}{ds^2} \right) \left(\frac{d\theta}{ds} \right)^2 + \dots \quad (3.13)$$

Na ausência de qualquer momento de flexão permanente, $dG/d\theta = 0$, temos:

$$\frac{dG}{ds} = \frac{g}{2} \left(\frac{d\theta}{ds} \right)^2, \quad (3.14)$$

onde⁷ $g = \frac{d^2G}{ds^2}$.

A energia total requerida para dobrar uma cadeia de comprimento L , é portanto:

$$\Delta G = (g/2) \int_0^L \left(\frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds. \quad (3.15)$$

Assumindo que, para pequenos deslocamentos $\theta = ks \rightarrow k = d\theta/ds$ seja uma constante (dobra circular), então:

$$\Delta G = (g/2)k^2 \int_0^L ds. \quad (3.16)$$

Se θ_l é o angulo entre as extremidades da cadeia (figura 3.7), então:

$$\theta_l = \int_0^L k ds = kL. \quad (3.17)$$

⁷ g é o coeficiente de rigidez flexural da cadeia, para o caso do DNA puro (sem nenhum ligante) ela pode ser considerada constante.

Logo, $k = \theta_l/L$, de modo que:

$$\Delta G = g \theta_l^2 / 2L. \quad (3.18)$$

$$g = 2\Delta G \frac{L}{\theta_l^2}. \quad (3.19)$$

Ou seja, o coeficiente de dobra é então igual a duas vezes a energia requerida para dobrar uma unidade de comprimento do polímero por um radiano.

A dobra na cadeia polimérica é um fenômeno relacionado a agitação térmica, e a probabilidade de curvatura caracterizada por uma energia ΔG é dada pelo fator de Boltzmann $[\exp(-\Delta G/K_b T)]^8$. Com base nisso vamos calcular o valor esperado de θ_l^2 ,

$$\langle \theta_l^2 \rangle = \int_0^\pi \exp(-\Delta G/K_b T) \theta_l^2 d\theta_l / \int_0^\pi \exp(-\Delta G/K_b T) d\theta_l. \quad (3.20)$$

Usando a eq. 3.18 na eq. 3.19 temos:

$$\langle \theta_l^2 \rangle = \int_0^\pi \exp(-g\theta_l^2/2LK_b T) \theta_l^2 d\theta_l / \int_0^\pi \exp(-g\theta_l^2/2LK_b T) d\theta_l, \quad (3.21)$$

$$\langle \theta_l^2 \rangle = LK_b T/g. \quad (3.22)$$

Toda essa dedução foi realizada com a condição da curvatura no plano perpendicular à cadeia (figura 3.7). Entretanto, obteríamos o mesmo resultado para um eixo perpendicular tanto ao plano e a cadeia. Uma vez que os dois modos de deformação são independentes, temos que:

$$\langle \theta_l^2 \rangle = 2LK_b T/g. \quad (3.23)$$

A distância ponta-a-ponta média sobre a projeção do primeiro segmento é:

$$\langle h \rangle = \int_0^L \langle \cos \theta_s \rangle ds. \quad (3.24)$$

Como:

$$\langle \cos \theta_s \rangle = 1 - \frac{\langle \theta_s^2 \rangle}{2} + \dots \quad (3.25)$$

A eq. 3.23 é mais precisa para segmentos $s \ll L$, temos então:

⁸ onde K_b é a constante de Boltzmann.

$$\langle \cos \theta_s \rangle = 1 - \frac{K_b T s}{g} \approx \exp\left(-\frac{K_b T s}{g}\right). \quad (3.26)$$

Substituindo a eq. 3.26 na eq. 2.24 e integrando temos:

$$\langle h \rangle = \left(\frac{g}{K_b T}\right) \left[1 - \exp\left(-\frac{K_b T L}{g}\right)\right]. \quad (3.27)$$

Comparando a eq. 3.27 com a eq. 3.7 temos:

$$A = \frac{g}{K_b T}. \quad (3.28)$$

Note que o comprimento de persistência varia com $1/T$, para um coeficiente de curvatura constante. Substituindo o valor de g dado pela eq. 3.19, obtemos:

$$\Delta G = \frac{K_b T A \theta_l^2}{2L} \text{ (Landau-Lifschitz)}. \quad (3.29)$$

Esse modelo para cadeia com curvatura continua é extremamente útil somente se for possível medir as duas grandezas da cadeia: A (comprimento de persistência) e L (comprimento de contorno). Na próxima seção, analisaremos o modelo que permite extrair esses dois parâmetros através da técnica de pinça óptica.

3.3.4 Modelo Worm-Like-Chain (WLC)

O modelo Worm-Like-Chain (WLC) descreve de maneira bastante satisfatória o comportamento elástico de polímeros semiflexíveis produzidos por uma força externa, desde que a magnitude da força seja suficiente apenas para mudar a conformação do DNA, ou seja sua entropia. Tal regime de forças é denominado regime entrópico. Para polímeros, tipo o DNA, esse regime é respeitado para forças de até 5 pN.

Vamos começar tratando o problema nas duas situações limites: estiramentos próximo da conformação de equilíbrio (pequenos estiramentos) e para estiramentos longe da conformação de equilíbrio (estiramentos longos). Em seguida, vamos apresentar a equação de Marko e Siggia [19], que é uma interpolação dos dois casos anteriores e descreve satisfatoriamente estiramentos arbitrários

Estiramentos próximos da conformação

No limite de pequenos estiramentos, a força pode ser aproximada pela lei de Hooke,

$$F = -kz, \quad (3.30)$$

onde z é o estiramento do polímero.

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

$$z = \sqrt{\langle h^2 \rangle}, \quad (3.31)$$

mas, como vimos na seção anterior, no limite flexível ($L \gg A$), podemos usar a eq. 3.11, para rescrever a eq. 3.31 como:

$$z = \sqrt{2AL}. \quad (3.32)$$

Como temos 3 graus de liberdade no sistema, usando o princípio da equipartição da energia teremos que:

$$\frac{1}{2}kz^2 = \frac{3}{2}K_bT, \quad (3.33)$$

Assim, usando as eqs. 3.33 e a eq. 3.32 na eq. 3.30, podemos encontrar a constante de mola k,

$$k = \frac{3K_bT}{2AL}. \quad (3.34)$$

Trivialmente concluímos que a força nesse regime é:

$$F = -\frac{3K_bT}{2AL}Z. \quad (3.35)$$

Estiramento Longe da conformação de equilíbrio.

Nesse regime, o polímero se encontra numa conformação esticada. A energia aproximada nessa configuração, pode ser escrita como a energia de Kratky Porod menos o trabalho realizado pela força externa para manter essa configuração, ou seja:

$$E_{WLC} = (g/2) \int_0^L \left(\frac{d\theta}{ds}\right)^2 ds - Fz. \quad (3.36)$$

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

Para calcularmos o trabalho da força externa, iremos parametrizar a curva que representa a conformação do DNA, conforme a figura abaixo.

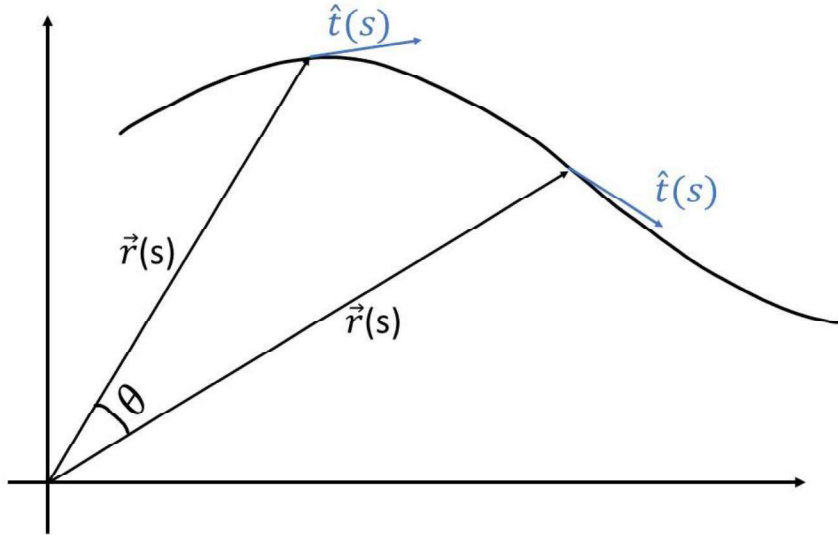


Figura 3-8: Variação do vetor posição e do vetor tangente unitário ao longo de uma curva arbitrária.

Na figura n, $\vec{r}(s)$ é o vetor posição que localiza um ponto na curva. O vetor unitário $\hat{t}(s)$ é o vetor tangente em cada ponto, de modo que $\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}(s)}{\partial s}$.

No regime de estiramento longo, $z \approx L$, de forma que o vetor \hat{t} é praticamente paralelo a curva $\vec{r}(s)$, que descreve a conformação do polímero. É trivial ver que a componente t_z se torna muito maior que t_x e t_y , de modo que:

$$\hat{t} = t_x \hat{i} + t_y \hat{j} + t_z \hat{k}, \quad (3.37)$$

e

$$|t|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = |t_z|^2 + |t_{\perp}|^2 = 1, \quad (3.38)$$

onde

$$|t_{\perp}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2. \quad (3.39)$$

Então:

$|t_z|^2 = \sqrt{1 - |t_{\perp}|^2}$ e $|t_{\perp}|^2 \ll 1$, Fazendo a aproximação em primeira ordem:

$$|t_z|^2 \approx 1 - \frac{|t_{\perp}|^2}{2}. \quad (3.40)$$

Com base na parametrização, podemos trocar $\left(\frac{d\theta}{ds}\right)^2$ por $\left|\frac{\partial f}{\partial s}\right|^2$ e escrever $z = \int_0^L |t_z| ds$. Fazendo essas substituições na eq. 3.36, temos:

$$\begin{aligned} E_{WLC} &= (g/2) \int_0^L \left|\frac{\partial f}{\partial s}\right|^2 ds - F \int_0^L \left(1 - \frac{|t_\perp|^2}{2}\right) ds = \\ &= \frac{1}{2} K_B T \int_0^L \left[A \left|\frac{\partial f}{\partial s}\right|^2 + \frac{F}{K_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - FL. \end{aligned} \quad (3.41)$$

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

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

$$\widetilde{t}_\perp(q) = \int ds \exp(iqs) t_\perp(s), \quad (3.42)$$

o que resulta em:

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} K_B T \int \frac{dq}{2\pi} \left[Aq^2 + \frac{F}{K_B T} \right] |\widetilde{t}_\perp(q)|^2 - FL. \quad (3.43)$$

Com o auxílio da eq.3.43, podemos calcular $\langle |\widetilde{t}_\perp|^2 \rangle$. Esse cálculo foi feito usando a função de partição do sistema, podendo ser encontrada na referencia [25].

$$\langle |\widetilde{t}_\perp|^2 \rangle = \sqrt{\frac{K_B T}{FA}}. \quad (3.44)$$

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

$$\frac{z}{L} \approx 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{K_B T}{FA}}. \quad (3.45)$$

Isolando F na eq. 3.45, obtemos a expressão para a força no regime de longos estiremos, temos:

$$F = \frac{1}{4} \frac{K_B T}{A} \left[\frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right]. \quad (3.46)$$

Estiramentos Arbitrários.

Podemos observar analisando a eq. 3.46, que se a expandirmos em primeira ordem, ela não nos retorna à eq. 3.35. Ou seja, o caso de pequenos estiramentos não

pode ser considerado como um caso particular do caso de longos estiramentos. De fato, se expandirmos a eq. 3.46, teremos:

$$F^1 \cong \frac{K_B T}{A} \left(\frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right), \quad (3.46-b)$$

que é diferente da eq. 3.35.

Para solucionar esse problema, Marko e Siggia, utilizando uma interpolação, acrescentaram dois termos no intuito de corrigir a equação para grandes estiramentos. Esses dois termos são desprezíveis no regime de grande estiramento, mas fornecem a expressão correta para pequenos estiramentos quando a equação corrigida é expandida em primeira ordem. A correção foi feita adicionando o termo $(z/L - 1/4)$ dentro do colchete da eq. 3.46.

Com essa alteração, obtemos a expressão de Marko e Siggia para a força entrópica da molécula de DNA em função do estiramento [19], que apesar de ser válida para estiramentos arbitrários, ainda apresenta algumas limitações por se tratar de uma aproximação.

$$F = \frac{K_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \text{ (Equação de Marko e Siggia).} \quad (3.47)$$

Note, que a eq.3.47 diverge para $z = L$, portanto o modelo é valido até aproximadamente $0,9L$. Além disso, vale a pena ressaltar novamente que, as forças externas utilizadas no estiramento, não podem ser capazes de deformar as ligações químicas entre os nucleotídeos, ou seja, a equação de Marko e Siggia é válida somente no regime entrópico.

A Fig. 2.6 compara a previsão teórica da Eq. 3.47 com um resultado experimental para a molécula de DNA. Observe que a Eq. 3.47 descreve bem o experimento no regime entrópico.

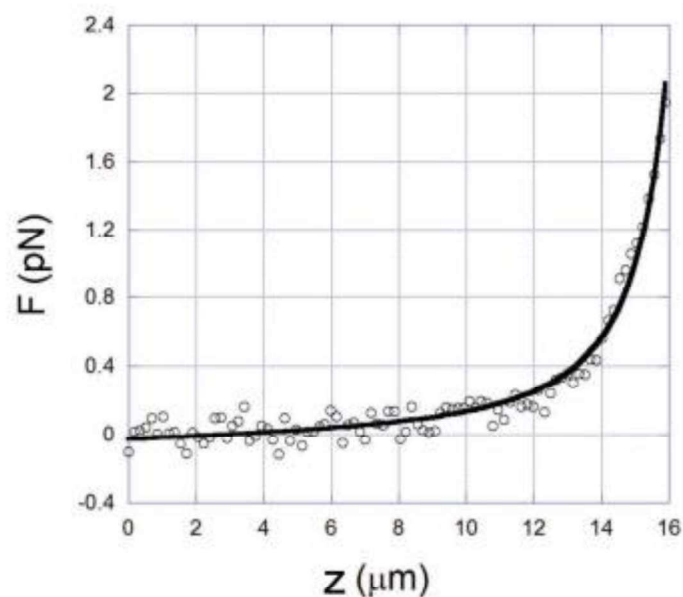


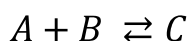
Figura 3-9: Força × extensão para uma molécula de DNA no regime entrópico. Círculos: experimento; Linha sólida: previsão da Eq.3.47 [25].

3.4 Interação DNA-ligantes

Nessa seção, será discutido os modelos mais utilizados para descrever a bioquímica básica da interação ligante-DNA. Começaremos apresentando o modelo de Scatchard, que é o modelo mais básico que descreve a interação entre dois compostos. Em seguida serão apresentados o modelo de Hill, que fornece alguns parâmetros químicos importantes, como por exemplo: a constante de ligação e o coeficiente de Hill. Por fim será apresentado o modelo de McGhee-Von Hippel que trata o problema de ligantes que ocupam mais de um sítio de ligação no DNA (modelo da exclusão de vizinhos).

3.4.1 Associação simples entre duas moléculas- o Modelo de Scatchard

As moléculas A e B se associam para formar um complexo C, conforme a reação:



Dessa associação, vamos relacionar uma constante denominada constante intrínseca de associação (K_i) dada por:

$$K_i = \frac{[C]}{[A][B]}, \quad (3.48)$$

onde $[x]$, indica a concentração da substância x . Quimicamente, K_i fornece uma ideia de até que ponto uma reação prossegue no sentido do produto que se deseja obter. Se as concentrações forem dadas em Mol (M), a unidade de K_i é M^{-1} .

Podemos definir também K_d (constante intrínseca de dissociação) como sendo:

$$K_d = \frac{[A][B]}{[C]} = K_i^{-1}. \quad (3.49)$$

Podemos aplicar esse modelo para estudar a interação DNA-ligante realizando algumas modificações. Considere que:

- $[A] \equiv C_f$, concentração de ligantes livres em solução.
- $[B] \equiv C_{bp} - C_b$, concentração de sítios livres da molécula de DNA. Onde C_{pb} é a concentração de pares de base do DNA e C_b é a concentração de sítios ligados.
- $[C] \equiv C_b$.

Fazendo essas alterações na eq.2, temos:

$$K_i = \frac{C_b}{C_f(C_{bp} - C_b)}. \quad (3.50)$$

Definimos a razão entre a concentração dos sítios ligados pela concentração de pares de base (uma constante que depende apenas do tipo de DNA utilizado) como sendo:

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}}. \quad (3.51)$$

Quando substituimos a eq. 3.51 na eq.3.50 e isolamos r , obtemos a equação de Scatchard:

$$r = \frac{K_i C_f}{1 + K_i C_f}, \quad (3.52)$$

que relaciona a fração de sítios ligados com a concentração de ligantes livres em solução. Essa equação também é conhecida como isoterma de ligação de Scatchard ou isoterma de ligação Langmuir. O termo "isoterma de ligação" é devido ao fato que a equação descrever experimentos que devem ser realizados a temperatura constante, uma vez que grandezas químicas como K_i apresentam variação com a temperatura.

Na figura 3.10 apresentamos o gráfico da fração de sítios ligados r em função da concentração de ligantes livres em solução.

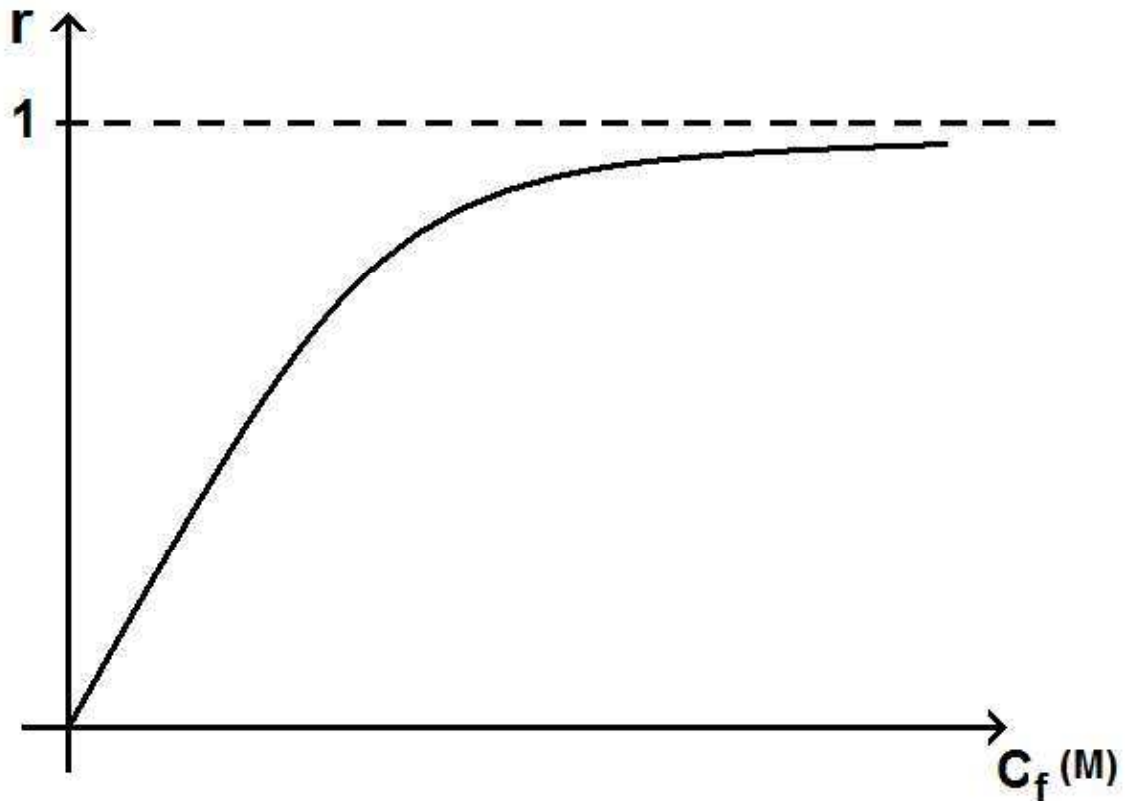


Figura 3-10: Gráfico da razão de sítios ligados, r , em função da concentração de ligantes livres em solução, C_f . O valor de r está compreendido entre $0 \leq r \leq 1$ [53].

Embora seja o modelo mais simples para descrever a interação entre ligantes e o DNA, o modelo de Michaelis -Menten apresenta limitações importantes, como por exemplo:

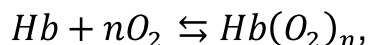
- Cada ligante só pode ocupar um par de base na molécula.
- A ligação do primeiro ligante não altera a afinidade com a qual os demais ligantes irão se ligar ao DNA, fazendo com que K_i seja, realmente, constante durante todo o processo de ligação.
- A ligação do ligante em um sítio não obstrui a ligação nos sítios vizinhos.

Como veremos na próxima seção, alguns ligantes ao interagir com o DNA alteram a afinidade com a qual os ligantes sucessivos irão interagir com o DNA, esse efeito é chamado de cooperatividade e proposto por Hill em 1910.

3.4.2 Cooperatividade e o modelo de Hill

Algumas moléculas apresentam uma propriedade chamada cooperatividade, isso significa que elas alteram a afinidade com a qual elas interagem com outras substâncias (moléculas, proteínas, enzimas, etc.) à medida com a qual a interação vai ocorrendo. De um ponto de vista químico, isso significa que o K_i da reação vai se modificando a medida que mais moléculas vão interagindo. Essa modificação pode ocorrer tanto no sentido de aumentar o valor de K_i , o que significa que uma molécula que interage facilita a interação para as outras ou a modificação pode ocorrer no sentido de diminuir K_i , ou seja, uma molécula que interagem dificulta a interação das outras moléculas. Dizemos que no primeiro caso ocorre uma cooperatividade positiva e o segundo caso ocorre uma cooperatividade negativa.

Fica evidente que K_i não consegue mais descrever a reação quando ocorre cooperatividade. Esse problema foi abordado por A.V. Hill em 1910 para explicar a isoterma observada experimentalmente na interação entre a hemoglobina e o oxigênio. Cada molécula de hemoglobina (Hb) possui quatro sítios de ligação, comportando, portanto, até (O_2) quatro moléculas de oxigênio na saturação. A reação química global é dada por:



onde $Hb(O_2)_n$ representa o composto final com (hemoglobina + n moléculas de oxigênio ligadas). O número n, de acordo com Hill, seria o número máximo de moléculas de oxigênio que podem ligar-se à hemoglobina, ou seja, quatro nesse caso.

Hill definiu uma nova constante K_A (constante de ligação aparente), como sendo a razão entre a concentração do composto resultante $[Hb(O_2)_n]$ pelo produto das concentrações dos solutos, com a concentração das moléculas de oxigênio elevada ao número de sítios de ligação n.

$$K_A = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb][O_2]^n} \quad (3.53)$$

Suponha que cada molécula de oxigênio se liga sequencialmente a hemoglobina e que a primeira molécula se ligue com uma constante intrínseca K_1 , a

segunda com K_2 , etc. É fácil ver que teremos então $K_A = K_1 \cdot K_2 \dots K_n$. Se as constantes intrínsecas são todas iguais ($K_1 = K_2 = \dots K_n \equiv K_i$, então teremos:

$$K_A = K_i^n. \quad (3.54)$$

Note que podemos escrever a eq. 3.53 da seguinte forma:

$$K_A = \frac{[HbO_2]}{[O_2]^n([Hb] - [HbO_2])}, \quad (3.55)$$

onde $([Hb] - [HbO_2])$ representa o número de sítios livres na hemoglobina onde o oxigênio pode se ligar.

Podemos ainda definir a fração de sítios ligados como sendo:

$$r = \frac{[HbO_2]}{[Hb]}. \quad (3.56)$$

Substituindo a eq. 3.56 na eq.3.55 e isolando r temos:

$$r = \frac{k_A [O_2]^n}{1 + k_A [O_2]^n} = \frac{k_i^n [O_2]^n}{1 + k_i^n [O_2]^n}, \quad (3.57)$$

onde, definimos o parâmetro n como sendo o coeficiente de Hill.

O parâmetro de Hill possui duas interpretações:

1. Representa o número de moléculas que se ligam cooperando efetivamente em sítios vizinhos.
2. Representa o parâmetro de cooperatividade, de forma que:
 - i. $n > 1 \rightarrow K_i$ Aumenta com o aumento de n .- Cooperatividade positiva.
 - ii. $n < 1 \rightarrow K_i$ Diminui com o aumento de n . -Cooperatividade negativa
 - iii. $n = 1 \rightarrow K_i$ Não ocorre cooperatividade entre os ligantes. -Não cooperativa.

A figura 3.11, mostra o comportamento da eq. 3.57 para vários valores de n , fixando $K_i = 10^4 M^{-1}$.

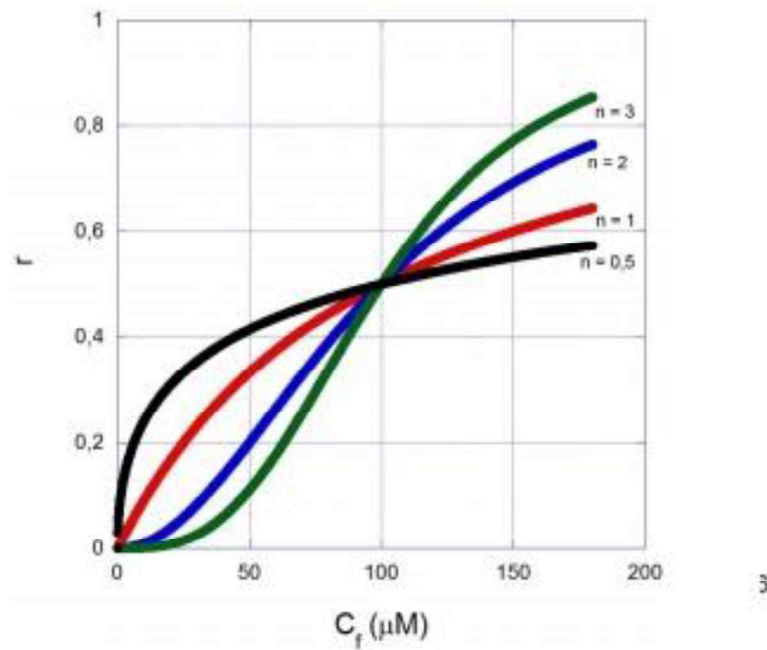


Figura 3-11: Comportamento gráfico da Eq. 3.57 para alguns valores de n , fixando $K_i = 10^4 M^{-1}$ [25].

Note que para o caso $n=1$ temos a isoterma de Scatchard, ou seja, o modelo de Michaelis-Menten é um caso particular do modelo de Hill. Além disso, observe que quando maior o valor de n for, em menores concentrações de ligante o sistema satura o que corrobora com a interpretação de cooperatividade feita para n no parágrafo acima.

Para reescrever a eq. 3.57 em termos da interação DNA-ligante, basta fazer a substituição $[O_2] \rightarrow [C_f]$, onde como antes,

$[C_f]$ = concentração de ligantes livres. Assim temos:

$$r = \frac{k_A [C_f]^n}{1 + k_A [C_f]^n} = \frac{k_i^n [C_f]^n}{1 + k_i^n [C_f]^n} \quad (3.58)$$

3.4.3 O modelo de exclusão de vizinhos (McGhee e von Hippel)

Eventualmente, ao se ligar em um sítio de ligação, o ligante acaba inviabilizando os sítios vizinhos para que outras moléculas se liguem. Essa inibição pode ocorrer tanto pelo fato de que a molécula necessite de mais de um sítio para ligar-se ao DNA ou pelo fato de que, devido as suas dimensões espaciais, ao ocupar

um sítio, ela ocupa (total ou parcialmente) o volume dos sítios vizinhos. Por exemplo, ao intercalar em um par de base, o ligante poderia “achatar” os pares de bases vizinhos o que impediria a ligação de outros ligantes nesses sítios.

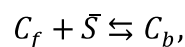
Para tratarem esse problema, McGhee e von Hippel propuseram, em 1974, um modelo que leva em conta a exclusão dos sítios ligáveis, que pode ocorrer na ligação de alguns ligantes. Para chegarem a sua conhecida expressão, eles adotaram o seguinte procedimento:

- A molécula de DNA livre de ligantes é considerada uma rede unidimensional com muitos sítios ligáveis (pares de base). Em geral, podemos considerar esta rede muito extensa, e numa primeira aproximação, desprezar os efeitos de borda.
- Considere que a constante química intrínseca K_i , é independente do número prévio de moléculas ligadas, ou seja, não há cooperatividade.
- Em uma lacuna (gap) da rede com g sítios livres, localizada entre duas moléculas ligadas (ver figura 3.12), o número de sítios ligáveis (s) nessa lacuna (ou seja, o número de configurações possíveis de ligar a molécula de ligante nessa lacuna) é:

$$s = \begin{cases} g - N + 1, & g \geq N \\ 0, & g < N \end{cases}, \quad (3.59)$$

onde N é o **número de exclusão**, ou seja, o número de sítios ocupados por uma molécula de ligante ao ligar-se a rede.

- O processo de interação pode ser sumarizado pela reação química:



onde C_f é o número de moléculas de ligante livres na solução, \bar{s} é o número médio total de sítios livres da molécula de DNA e C_b é o número de molécula de ligantes ligadas.

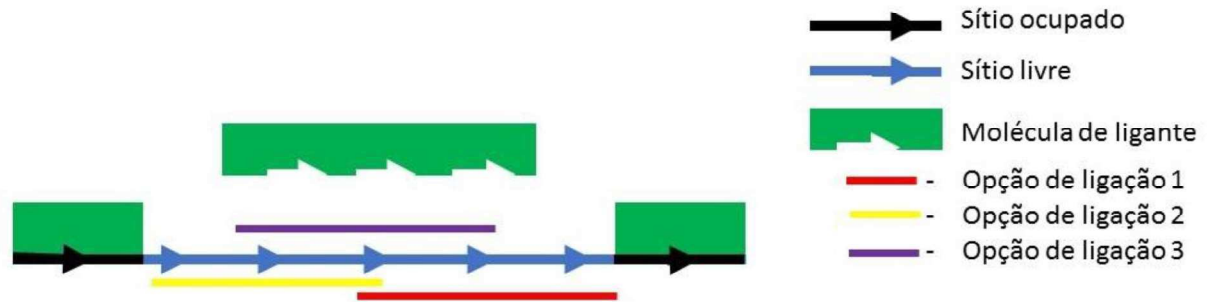


Figura 3-12: Uma lacuna (gap) com $g=5$ sítios ligáveis situada entre duas moléculas ligadas. Nesse exemplo, temos $N=3$, o que dá $s=3$.

Na figura 3.12, temos a situação onde $g = 5$ e $N = 3$, teremos nesse caso $s = 3$. A figura também mostra, as 3 possíveis posições de ligação da molécula de ligante (cada barrinha colorida indica uma opção), note que a escolha de uma posição exclui as outras duas.

No equilíbrio químico, podemos escrever:

$$K_i = \frac{C_b}{C_f \bar{s}}. \quad (3.60)$$

O número médio de moléculas de ligante livres em uma lacuna pode ser escrito como:

$$\bar{s} = \sum_{g=N}^{g_{max}} (g - N + 1) P_g, \quad (3.61)$$

onde P_g é a probabilidade de uma lacuna particular possui exatamente g sítios, e g_{max} é o valor máximo de g , correspondente a uma lacuna do tamanho da própria rede (ou seja, muito extensa).

Note que devido a geometria unidimensional da rede, quando tivermos C_b moléculas ligadas, teremos $C_b + 1$ lacunas. Assim podemos escrever:

$$\bar{S} = (C_b + 1)\bar{s}, \quad (3.62)$$

onde \bar{S} é o número médio total de sítios livres e \bar{s} é o número médio de sítios ligáveis. Assim usando as equações 3.61 e 3.62 na eq. 3.60, podemos escrever:

$$\frac{C_b}{C_f} = \bar{S}K_i = K_i(C_b + 1) \sum_{g=N}^{\infty} (g - N + 1) P_g, \quad (3.63)$$

onde fizemos a aproximação $g_{max} \rightarrow \infty$ por considerar a molécula de DNA muito extensa.

Nosso próximo objetivo, é encontrar uma expressão para a probabilidade P_g . Para isso, adotaremos a notação:

- f é um sítio livre da rede.
- b_1, b_2, \dots, b_n são o primeiro, segundo ... e último sitio ligado por uma única molécula. A figura 3.13 mostra o esquema para $N = 3$. Observe que chamamos de b_1 é a extremidade esquerda da molécula, enquanto b_n é a extremidade direita dessa molécula.

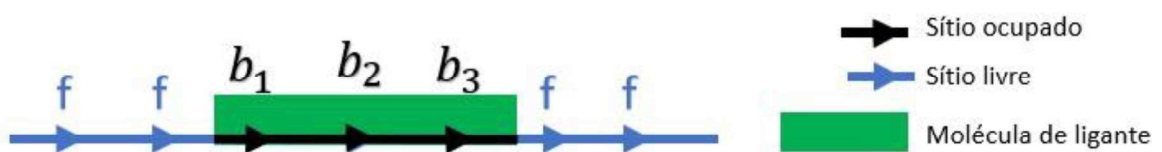


Figura 3-13: Notação usada para calcular a probabilidade P_g . f é um sítio livre (ligável) da rede e b_i são os sítios ligados.

Usando esta notação, definimos as probabilidades condicionais:

- $P\{f|f\}$ é a probabilidade de encontrar um sítio livre qualquer, se o sítio imediatamente anterior a este for também livre.
- $P\{f|b_1\}$ é a probabilidade de encontrar um sítio qualquer ligado, se o sítio imediatamente anterior a este for livre.

Note que devemos ter $P\{b_1|b_2\} = P\{b_2|b_3\} = P\{b_{n-1}|b_n\} = 1$, para uma molécula com número de exclusão N .

Além disso, devemos ter $P\{f|b_2\} = P\{f|b_3\} = P\{f|b_n\} = 0$, pois um sítio livre só pode ser vizinho (à esquerda) de outro sítio livre ou do primeiro sítio ligado (b_1) de uma molécula ligada. Assim, então temos:

$$P_g = P\{b_n|f\} \times [P\{f|f\}]^{g-1} \times P\{f|b_1\}. \quad (3.64)$$

O número de sítios ligados da rede é $C_b N$, e a fração de sítios ligados por número total de sítios da rede (número de pares de base no caso do DNA) é:

$$\frac{C_b N}{C_{pb}} = rN, \quad (3.65)$$

onde $r = C_b/C_{pb}$ é o número de pares de base (sítios da rede).

Dessa forma, a fração de sítios livres na rede é $1 - Nr$. Assim, a probabilidade de escolher um sítio livre aleatoriamente na rede é $1 - Nr$. O sítio anterior, pode estar livre (com probabilidade $1 - Nr$) ou ocupado (com probabilidade $Nr/N = r$). Temos então:

$$1 - Nr = (1 - Nr)P\{f|f\} + rP\{b_n|f\}. \quad (3.66)$$

Como não existe qualquer preferência para um sítio estar ligado ou ocupado, temos que $P\{f|f\} = P\{b_n|f\}$, assim temos:

$$P\{f|f\} = P\{b_n|f\} = \frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \quad (3.67)$$

e

$$P\{f|b_1\} = P\{b_n|b_1\} = 1 - P\{f|f\} = \frac{r}{1 - (N - 1)r}. \quad (3.68)$$

Substituindo a eq. 3.68 e a eq. 3.67 na eq. 3.64, temos:

$$P_g = \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \right]^g \left[\frac{r}{1 - (N - 1)r} \right] \quad (3.69)$$

Finalmente, substituindo a eq. 3.69 na eq. 3.61 e resolvendo o somatório, obtemos:

$$\bar{s} = \left(\frac{1 - Nr}{r} \right) \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \right]^{N-1} \quad (3.70)$$

Usando a eq. 6.33 podemos obter a famosa expressão de McGhee e von Hippel. Como a rede é muito extensa, é razoável fazer a aproximação $C_b + 1 \sim C_b$ na eq. 6.33 e assim obtemos:

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - Nr) \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \right]^{N-1} \quad (3.71)$$

(isoterma de McGhee e von Hippel)

A figura 3.14 mostra o comportamento da eq. 3.7, para $K_i = 10^5 M^{-1}$ e $N = 3$.

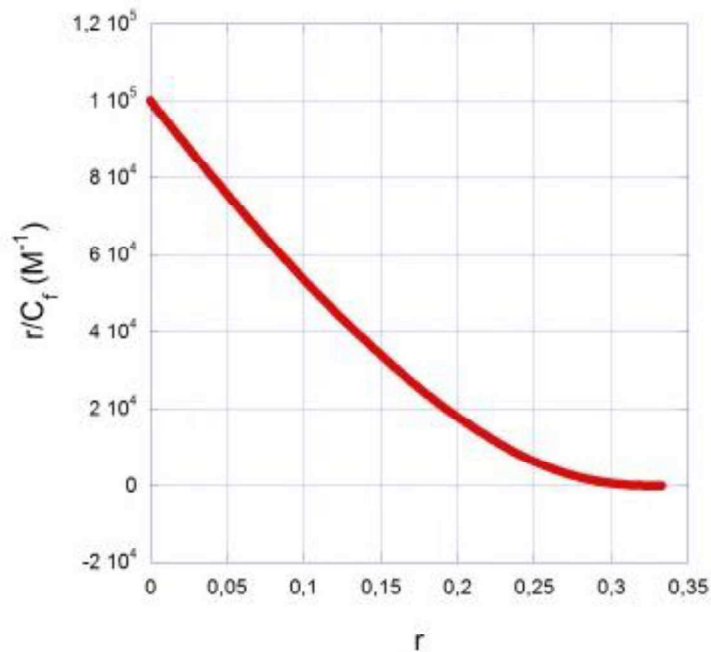


Figura 3-14: Isoterma de McGhee e von Hippel para $K_i = 10^5 M^{-1}$ e $N = 3$ [25].

A grande vantagem desse modelo é o de fornecer resultados mais precisos, quando usado para ajustar resultados experimentais, de ligantes que ao ocupar um sítio de ligação, exclui os sítios vizinhos. Porém, ele apresenta uma grande desvantagem que é o fato de não ser possível isolar o parâmetro r na isoterma de ligação (eq. 3.71), o que, na prática, dificulta o ajuste de dados experimentais.

Note que quando fazemos $N = 1$, na eq. 3.71, obtemos a isoterma de Scatchard (eq. 3.52). Logo o modelo de Scatchard é um caso particular do modelo de exclusão de vizinhos, quando a molécula do ligante, ao ligar em um sítio de ligação, não perturba os sítios vizinhos.

Capítulo 4

4. Uso da Pinça Óptica e da Videomicroscopia na Caracterização da Interação DNA-Cafeína

Neste capítulo faremos uma descrição sobre o ligante utilizado, apresentaremos os detalhes da preparação das amostras e discutiremos os métodos empregados para estudar as propriedades mecânicas da molécula de DNA. Começaremos com uma revisão da literatura sobre a cafeína, focando na área de interesse deste trabalho, ou seja, a interação entre a cafeína e o DNA.

4.1 Cafeína

A cafeína é classificada como um alcaloide do grupo das xantinas encontrada em mais de 60 tipos de plantas, onde atua como uma espécie pesticida natural [26].

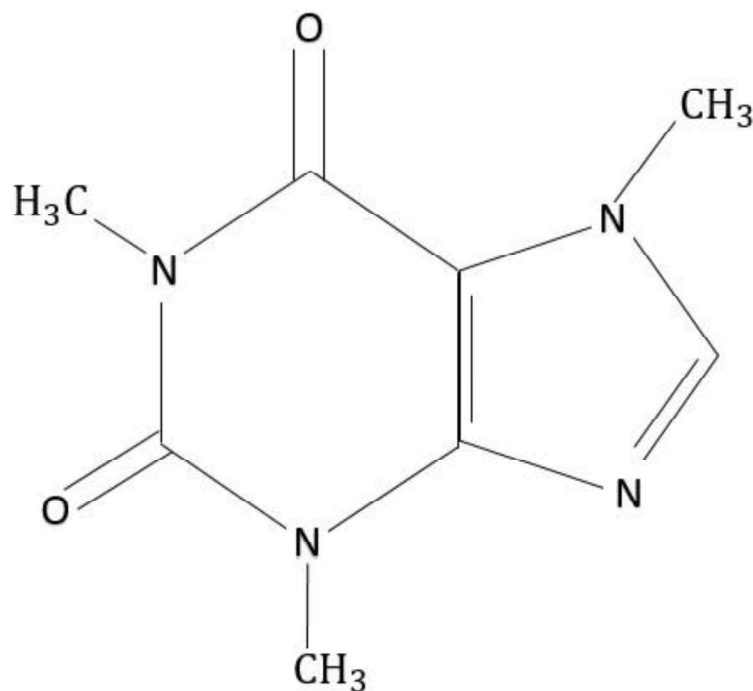


Figura 4-1: A molécula de cafeína.

As fontes alimentares mais comuns de cafeína são: café, chás, chocolate e derivados de cola, a tabela 4.1 mostra a quantidade de cafeína presente nesses alimentos. Além disso, muitos medicamentos possuem cafeína na sua composição. Por estar tão incorporada a dieta moderna, a cafeína é considerada uma das drogas mais consumidas em todo mundo [1].

Alimento	Quantidade	Teor de Cafeína
Café tradicional	200 ml	80 - 100 mg
Café solúvel	200 ml	70 mg
Café expresso	30 ml	40 - 80 mg
Café descafeinado	150 ml	2 - 4 mg
Bebida Ice Tea	1 lata	45 mg
Chá preto	200 ml	20 - 60 mg
Chá verde	200 ml	25 - 45 mg
Chá mate	200 ml	20 - 30 mg
Bebidas energéticas	250 ml	100 mg
Refrigerantes de cola	1 lata	35 mg
Refrigerantes de guaraná	1 lata	2 - 4 mg
Chocolate ao leite	40 g	10 mg
Chocolate amargo	40 g	30 mg
Achocolatados	250 ml	4 - 5 mg

Tabela 4-1: Quantidade de cafeína encontrada em fontes alimentares [56].

Clinicamente, a cafeína é um poderoso estimulante do sistema nervoso central [26], sendo indicada para tratar apneia em recém-nascidos [3], usada como estimulante para o tratamento de cefaleia [4] e para o tratamento de depressão respiratória em adultos [26]. Além disso, existe uma extensa literatura sobre os possíveis efeitos anticancerígenos da cafeína [26], [5], [27], além de sua ação na inibição e tratamento do mal de Alzheimer [6]–[8].

O principal mecanismo de ação biológica da cafeína ocorre no sistema nervoso autônomo por meio da inibição dos receptores de adenosina [2]. A adenosina é um neurotransmissor que age no controle da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e temperatura corporal. Quando a adenosina se anexa a uma célula nervosa (receptor neural), ela faz com que esses receptores diminuam sua atividade neural, causando a sensação de cansaço ou sono. Quando a cafeína é ingerida, ela é rapidamente absorvida pelo sangue e enviada ao cérebro, aonde anexa-se aos receptores bloqueando assim a ação da adenosina. Uma vez que a cafeína inibe os receptores de adenosina, ela bloqueia o efeito desse neurotransmissor, ou seja, faz com que continue ocorrendo a estimulação neural deixando o indivíduo mais disposto e alerta, evitando a fadiga e causando uma sensação de revigoração. A figura abaixo mostra o funcionamento da cafeína no cérebro [28].

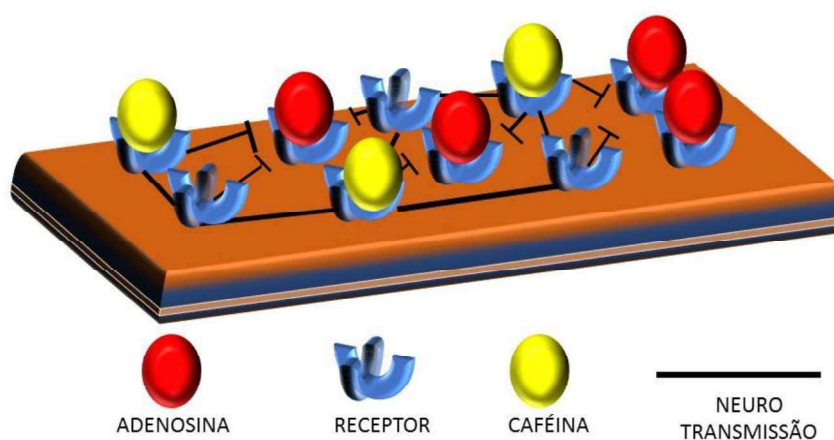


Figura 4-2: Esquema do efeito de inibição dos receptores de adenosina pela cafeína. Note que os neuro transmissores são interrompidos quando encontram um receptor ligado a adenosina. A cafeína blinda a ligação receptor-adenosina e portanto, mantém as neuro transmissões.

A cafeína possui ainda outros efeitos interessantes como por exemplo: bloqueio da enzima fosfodiesterase [29] (responsável pela quebra do mensageiro cAMP, fazendo com que os sinais excitatórios da adrenalina durem por mais tempo), efeito termogênico [30], entre outros. Porém, neste trabalho, estamos interessados na

capacidade da cafeína de formar hétero-complexos com outras moléculas, com destaque para os ácidos nucleicos [11]. Por isso, apresentaremos na próxima seção uma revisão sobre esse tema.

4.1.1 Hétero-complexos de Cafeína.

A cafeína tem a capacidade de interagir com ela mesma e com diferentes compostos aromáticos via agregação [10]. Ela pode formar hétero-complexos com corantes, tais como o laranja de acridina [9], brometo de etídio [31], DAPI [9], azul de metileno [32], com drogas anticâncer como: doxorubicina [33], mitoxantrona [34], daunomicina [35], assim como com nucleotídeos, polinucleotídeos [36] e com ácidos nucleicos [11].

Essa capacidade de interagir com tantos compostos chamou a atenção da comunidade científica que começou a investigar o efeito da cafeína sobre a ação dos compostos citados no parágrafo anterior. Os primeiros resultados sugeriam que a hétero-associação da cafeína com os ligantes aromáticos poderia diminuir a atividade farmacológica (ou toxicidade, dependendo da classificação) desses ligantes, que geralmente está relacionada com sua capacidade de interação com o DNA [36]. Porém, é conhecido na literatura que em altas concentrações (> 10mM) a cafeína tem a capacidade de aumentar a morte celular, potencializando o efeito de agentes danificadores do DNA como a Cisplatina [37], Ciclofosfamida [38] e Hydroxycarbamida [39].

Com base nesses dados, Jan Kapuscinski, levanta a seguinte questão: “por que a cafeína potencializa os efeitos tóxicos e farmacológicos de um grupo de ligantes do DNA, enquanto tem um efeito oposto com o outro grupo? “ [9]. Em seu artigo “*Thermodynamical model of mixed aggregation of intercalators with caffeine in aqueous solution*”, ele sugere que o motivo dessa múltipla ação da cafeína esteja relacionado com a interação química da cafeína com os compostos do primeiro grupo. De fato, podemos observar que os compostos do primeiro grupo correspondem aos intercalantes (ligantes que se “empilham” de forma não covalente entre os pares de base adjacentes do DNA. Mostraremos os detalhes dessa ligação no capítulo 5). Intercalantes possuem anéis aromáticos. J. Kapuscinski e colaboradores mostraram em [40] que a cafeína tem a capacidade de formar complexos não covalente com os

intercalantes devido a formação de hétero-agregados. A formação do complexo cafeína-intercalante em solução aquosa diminui a concentração de intercalante livre, reduzindo assim, sua capacidade efetiva de ligar-se ao DNA.

Muitos autores na literatura [9], [10], [31]–[33], [36], relatam a redução (ou de-intercalação) da ligação entre os intercalantes e o DNA na presença de cafeína. Porém, não existe um consenso sobre o mecanismo como essa de-intercalação ocorreria. Embora a de-intercalação sempre esteja acompanhada de um aumento na concentração do complexo cafeína-intercalante, faltam mais evidências para demonstrar que o modelo proposto por Kapuscinski seja o predominante.

Uma competição pelos sítios de intercalação do DNA poderia resultar na redução da intercalação do ligante quando posto em contato com a cafeína. Porém, na coleção de artigos apresentado por Fritzsche H., Lang H e colaboradores ([11], [35], [40]) essa possibilidade é descartada devido a fraca afinidade de intercalação entre a cafeína e o DNA. Para efeito de comparação, a constante de equilíbrio K para o complexo cafeína-DNA foi estimada como sendo na ordem de $10 M^{-1}$ [11], enquanto que para intercalantes típicos, temos K na ordem de $10^5 M^{-1}$ [41].

Usando a técnica de RMN, Lang H e colaboradores [35], mostraram que existe dois mecanismos de interação entre a cafeína e o DNA. Em baixas concentrações de cafeína, os resultados obtidos por estes autores sugerem que ocorre uma inserção das moléculas de cafeína no DNA, que atua no sentido de estabilizar o mesmo (intercalação). Em altas concentrações de cafeína, ocorre um processo de ligação que desestabiliza o DNA via uma interação indireta da cafeína com o eixo externo da dupla hélice do DNA. Como mencionamos no parágrafo anterior, a inserção da cafeína no DNA ocorre de forma muito fraca ($K = 10 M^{-1}$), de modo que o segundo mecanismo se torna predominante em altas concentrações.

Fritzsche H. e colaboradores investigaram em [11] a ligação da cafeína ao DNA em soluções altamente concentradas de cafeína e em filmes de DNA. Usando a espectroscopia RMN eles conseguiram determinar a ligação específica da cafeína ao DNA. A interação leva a um arranjo das moléculas de cafeína (especificamente dímeros) ao lado externo da dupla hélice com uma orientação paralela aos pares de base (o anel da cafeína fica perpendicular ao eixo da dupla hélice). Usando a técnica

de dicroísmo linear em filmes de DNA com e sem cafeína, eles perceberam que durante o ciclo de desidratação-reidratação do filme, ocorre uma perturbação da camada hidrostática do DNA devido a presença da cafeína. Essa perturbação é causada pelo deslocamento das moléculas de água entre as bases do DNA e os dímeros de cafeína, causando uma modificação conformacional do DNA que muda da forma B para a forma A. Além disso, os arranjos de cafeína no exterior da dupla hélice permanecem ortogonais ao mesmo durante todo o ciclo de desidratação-reidratação (ou seja, permanecem ortogonais tanto na forma B quanto na forma A e nas formas intermediárias do DNA).

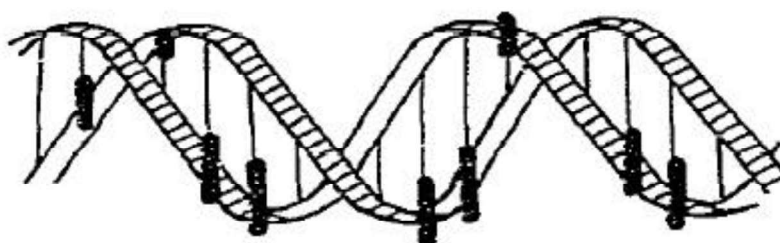


Figura 4-3: Desenho esquemático do modelo do complexo DNA-cafeína: ligação externa dos agregados de cafeína nas fendas do DNA. Os bastões representam os agregados de cafeína [11].

Também existem efeitos relacionados às células em ambientes com alta concentração de cafeína, entre eles podemos destacar: a inibição das enzimas requeridas para a síntese do DNA [39], [42] e o aumento da condensação da cromatina [43].

4.1.2 A forma protonada da cafeína

A molécula de cafeína pode apresentar protonação⁹ em soluções aquosas. Ou seja, quando a cafeína é diluída ela sofre ionização e apresenta carga elétrica. A figura 4.4

⁹ Em química, uma protonação é uma reação química que ocorre quando um íon H^+ liga-se a um átomo, molécula ou íon.

apresenta o esquema da reação da protonação da cafeína em solução aquosa com HCl¹⁰.

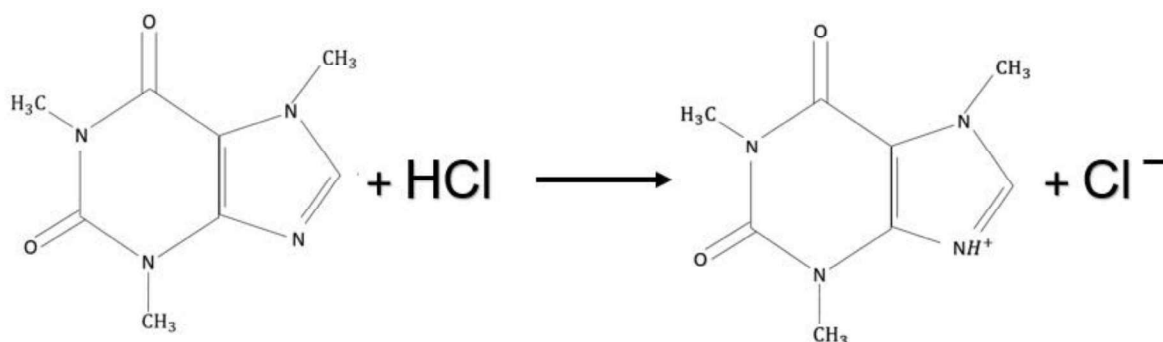


Figura 4-4: Esquema ilustrando o processo de protonação da cafeína.

Seja:

- $[A]$ a concentração de cafeína.
- $[HA]$ a concentração de cafeína na forma protonada.
- $[H^+]$ a concentração de íons H^+ na solução aquosa.

Podemos representar a figura 4.4 por meio da seguinte equação:



Em sua forma protonada a cafeína se torna um ácido fraco¹¹, cuja constante de acidez (K_a) é definida como:

$$K_a = \frac{[H^+][A]}{[HA]} \quad (4.2)$$

Fazendo a operação de aplicar o logaritmo negativo nos dois lados da eq. 4.2, temos:

$$-\log K_a = -\log \frac{[H^+][A]}{[HA]} = -\log[H^+] - \log \frac{[A]}{[HA]} \quad (4.3)$$

Por definição temos que:

- $pH = -\log[H^+]$.
- $pK_a = -\log K_a$.

¹⁰ A reação é a mesma para qualquer ácido presente na solução aquosa, o fator importante é o pH da solução.

¹¹ Um ácido é dito fraco quando não tem a capacidade de se dissociar completamente em solução.

Assim, podemos reescrever a eq. 4.3 como:

$$pK_a = pH - \log \frac{[A]}{[HA]}. \quad (4.4)$$

Em nosso trabalho, utilizamos cafeína diluída em solução aquosa, cujo pH era 7,4 (tanto o PBS1 quanto o PBS 150 possuem o mesmo pH). O pK_a da cafeína é 14,0[44]. Substituindo esses valores na eq. 4.3 temos:

$$-\log \frac{[A]}{[HA]} = (pK_a - pH) = 6,6, \quad (4.5)$$

a eq. 4.5 é equivalente à :

$$\frac{[A]}{[HA]} = 10^{-6,6}. \quad (4.6)$$

Note que $[A] + [HA] = [C]$, onde $[C]$ é a concentração total de cafeína. Assim utilizando a eq. 4.5 temos:

$$(1 + 10^{-6,6})[HA] = [C], \quad (4.7)$$

logo, a porcentagem de cafeína protonada (em relação a concentração total de cafeína adicionada na solução) é:

$$P = \frac{[HA]}{[C]} = \frac{1}{(1 + 10^{-6,6})} = 0,99. \quad (4.8)$$

Assim, para o $pH=7,4$, 99% da concentração de cafeína adicionada na solução de DNA apresentará carga positiva¹².

4.2 Preparação das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho consistem em uma solução aquosa de PBS (Tampão fosfato salino), em que utilizamos duas concentrações de sais: 150 mM denominado de PBS 150 (140mM de NaCl + 10mM de NaH_2PO_4) e 1mM denominado de PBS 1 (obtido da diluição do PBS150), ambas em pH próximo ao do meio celular (7.4). Além disso, utilizamos as microesferas de poliestireno com um diâmetro de $3,0 \mu m$ e o DNA. Utilizando o protocolo disponível na referência [45], uma ponta do DNA é adsorvida na lamínula do porta-amostras e a outra é adsorvida à microesfera de poliestireno (nas próximas seções mostraremos em detalhes esse processo). Com

¹² Todos os cálculos foram feitos para a temperatura de 25°C.

o auxílio da pinça óptica, podemos aprisionar a microesfera e realizar o estiramento da molécula de DNA.

4.2.1 Construção do porta-amostras

Nosso porta-amostras consiste de uma lamínula que possui uma espessura de aproximadamente 0,15mm com um o-ring com diâmetro de aproximadamente de 0,7 cm colado na superfície da lamínula com parafina, a figura 4.5 ilustra o porta-amostras.

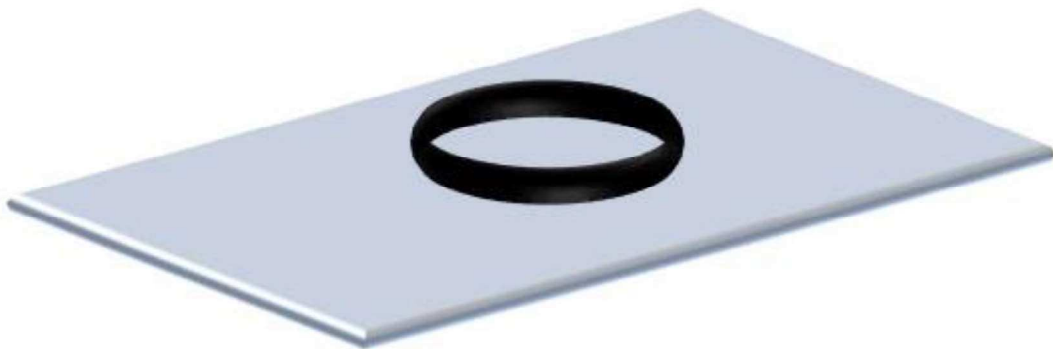


Figura 4-5: Ilustração do porta-amostras usado nos experimentos.

Para garantir a adsorção da ponta do DNA na lamínula, precisamos preparar o DNA e a lamínula previamente. A preparação do DNA ocorre através da biotinação das suas pontas. Com o auxílio da enzima DNA-polimerase, fundimos nas pontas do DNA pares de base marcados com biotina (uma vitamina que apresenta uma forte ligação com a proteína streptavidina). O DNA utilizado em nossos experimentos foi extraído do fago λ , um vírus que infecta a bactéria E. Coli. Ele é recomendado para experimentos de pinça óptica devido as suas características: 48.500 pares de base, comprimento de contorno médio de 16,5 μm e possuir a forma B em condições fisiológicas.

A preparação do porta-amostras ocorre da seguinte maneira: na região interior ao o-ring colocamos 20 μl de BSA-Biot¹³. (1,9 mg/ml diluída em Tampão¹⁴ A ,um tampão contendo magnésio) e esperamos cerca de 20 minutos. O tampão contendo magnésio é importante para realizarmos a fixação da biotina na lamínula eletrostaticamente, uma vez que, tanto o vidro quanto a BSA-biot., são negativamente carregados. Após esse intervalo enxaguamos a região com 40 μl de Tampão A. Após o enxague, colocamos cerca de 20 μl de streptavidina (0,2 mg/ml diluído em PBS 150) e aguardamos novamente 20 minutos. Durante esse tempo, devido à alta afinidade que possuem, a streptavidina se liga (de forma não covalente) a biotina. Após esse intervalo, enxaguamos a região com 40 μl de PBS 150 e colocamos o porta-amostras para secar sobre a luz do microscópio por aproximadamente 10 minutos.

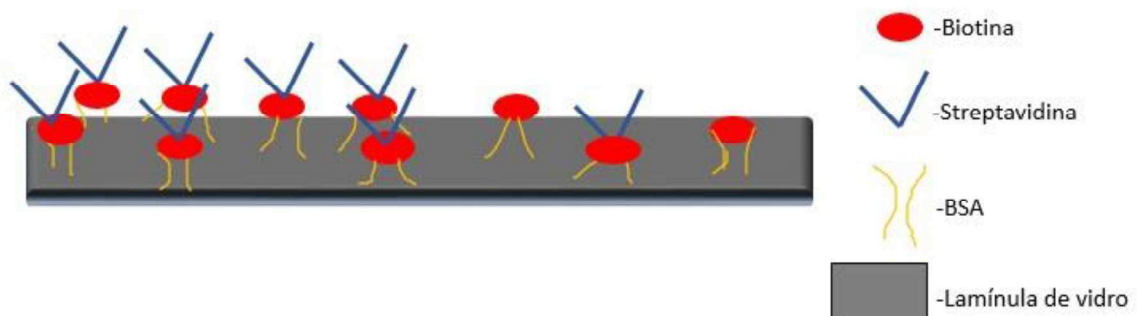


Figura 4-6: Ilustração das moléculas ligadas no porta-amostras.

4.2.2 Preparação da Solução DNA-microesferas

Em um microtubo, do tipo eppendorf, colocamos 20 μl de PBS 150 e 1,5 μl da solução estoque de microesferas de poliestireno revestida com streptavidina (diâmetro de 3 μm) e com o auxílio de um agitador a solução é homogeneizada. Após a homogeneização, 3 μl da solução estoque de λ -DNA biotinilado ($C_{\text{DNA}} = 200 \mu\text{M}$ em pares de base) é adicionado ao microtubo que é colocado em banho

¹³ Proteína BSA marcada com Biotina.

¹⁴ Uma solução tampão é uma solução aquosa de um ácido e da sua base conjugada que não sofre variações significativas de pH quando se adicionam pequenas quantidades de ácidos ou bases

térmico a 37° C por uma hora. Nessa temperatura, a reação biotina- streptavidina ocorre com maior eficiência e esperamos que uma ponta do DNA biotilado seja adsorvida na microesfera revestida com streptavidina. Após esse intervalo, adicionamos cerca de 75 μ l de PBS 150 ao microtubo, homogeneizando delicadamente com uma pipeta, e levamos a solução ao porta-amostras.

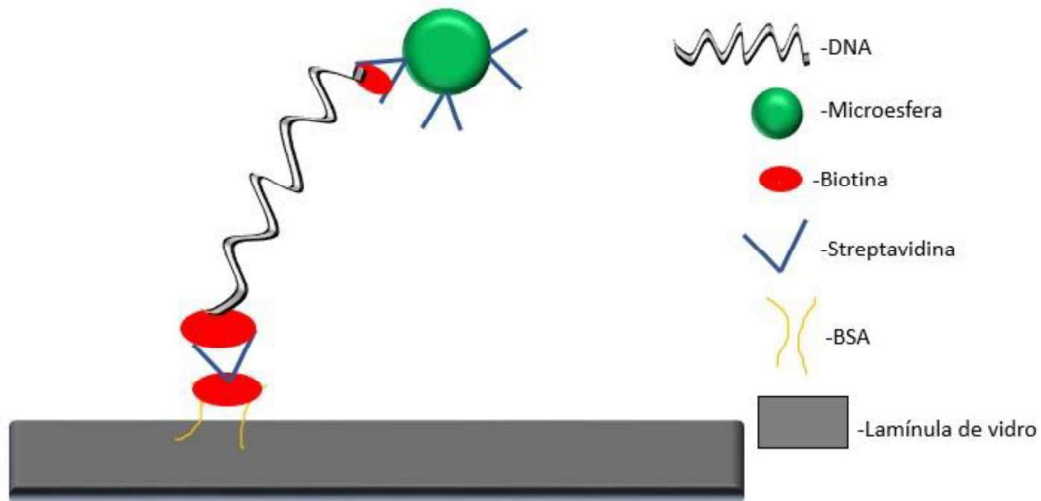


Figura 4-7: Configuração da ligação da molécula de DNA na laminula.

4.2.3 Preparação da Soluções de cafeína

A cafeína (1,3,7- Trimethylxanthine) utilizada em nossos experimentos foi adquirida da Sigma-Aldrich.

Preparamos duas soluções estoque de cafeína, uma diluída em PBS 150 e outra diluída em PBS 1. A maneira de preparação das duas soluções estoques foram as mesmas.

A solução estoque é preparada diluindo 11,6 mg de cafeína em 1 ml de PBS. Deste modo, nossa solução estoque tem uma concentração final de cafeína de 60 mM. As diluições da solução estoque para concentrações menores de cafeína foram feitas pegando uma quantidade da solução estoque e diluindo elas na quantidade correspondente de PBS até se obter a concentração desejada, fixando o volume final em 1ml. Ressaltamos que cada solução estoque foi diluída no PBS ao qual ela foi originalmente preparada. Deste modo, nós construímos soluções de cafeína cuja concentração variou de 1,5 mM até 21 mM, em intervalos de 1,5 mM.

4.3 Procedimento experimental

Nesta seção, iremos detalhar o procedimento experimental utilizado para obter as propriedades mecânicas do DNA através da técnica de pinça óptica.

4.3.1 Escolha da molécula de DNA

Depois de colocarmos o porta-amostras no microscópio e a solução de DNA-microesferas no porta-amostras, esperamos cerca de 1 hora para que a ponta (livre) da molécula de DNA possa ser adsorvida na lamínula. Como relatamos na seção sobre a construção do porta-amostras, a lamínula fica com uma região recoberta com streptavidina. Como o DNA é marcado com biotina nas duas pontas, esperamos que em uma parte da solução, uma dessas pontas seja adsorvida na microesfera e a outra esteja livre para ser adsorvida na lamínula do porta-amostras. Na figura 4.8, ilustramos as configurações possíveis de ser encontrada no porta-amostras após a solução DNA-microesferas ser adicionado.

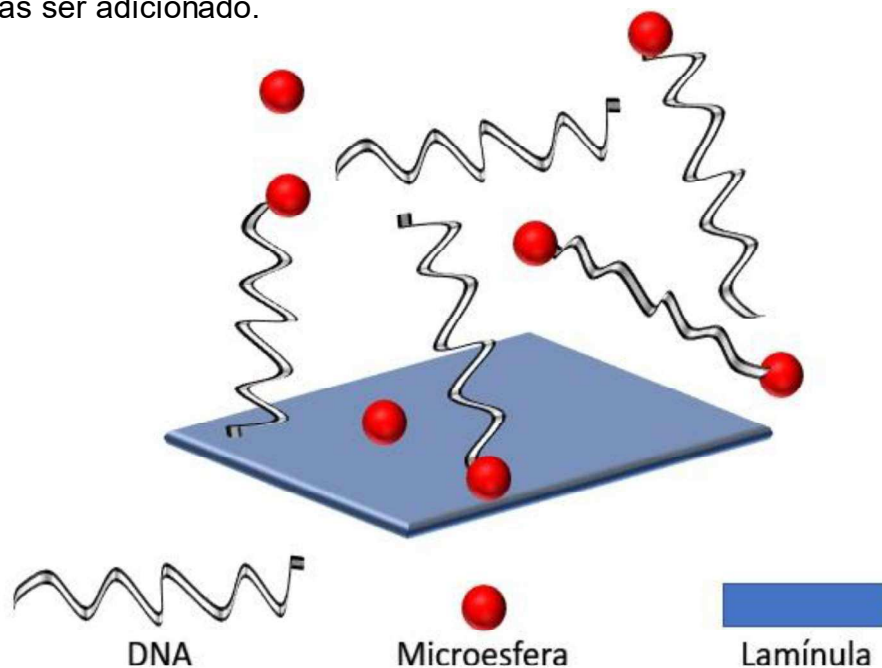


Figura 4-8: As configurações possíveis de serem encontradas no porta-amostras.

O próximo passo é encontrar a configuração de interesse, lamínula-DNA-microesfera. Note que existe várias configurações possíveis, como: DNA solto, DNA colado na microesfera, Microesfera solta, microesfera colado na lamínula, DNA-

microesfera solto, microesfera-DNA colado na lamínula, DNA com microesferas adsorvidas nas duas pontas e finalmente, nossa configuração de interesse.

O processo de escolha começa com uma análise visual do vídeo (imagem da objetiva em tempo real), onde procuramos por microesferas que executem o movimento browniano, o que caracterizariam que elas não estão coladas na lamínula. Usando os deslocadores acoplados ao estágio do microscópio óptico, deslocamos a microesfera com a pinça óptica e obtemos em uma das duas situações a seguir:

- (i) A microesfera permanece durante todo o deslocamento dentro do poço de potencial da pinça e conseqüentemente a microesfera não está na configuração desejada.
- (ii) Após ser deslocada durante um tempo, a microesfera escapa do poço e retorna ao ponto inicial. Essa situação é um forte indicio que temos a configuração desejada. A figura 4.9 ilustra essa situação.

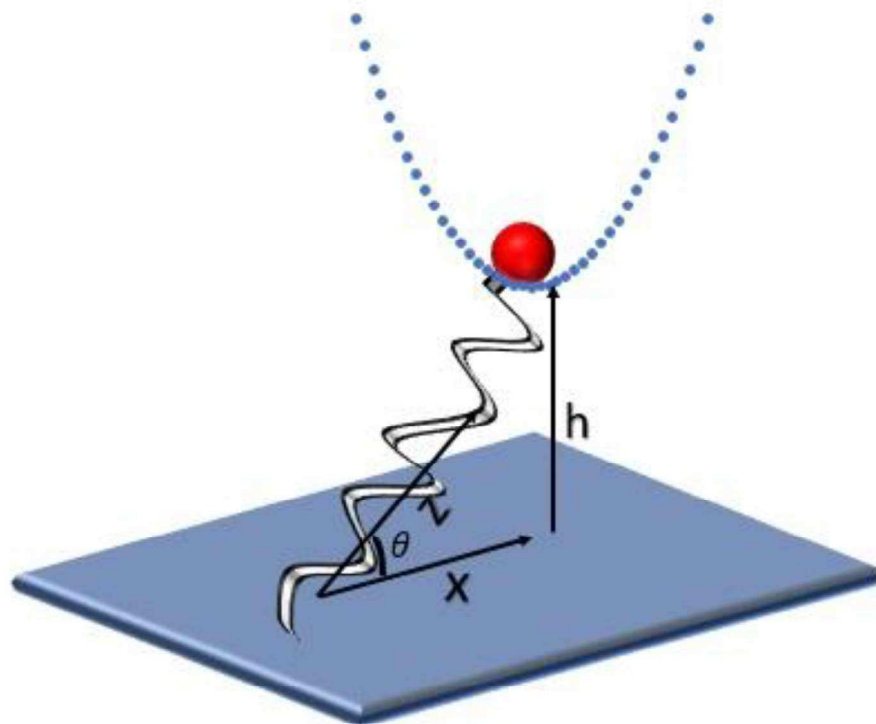


Figura 4-9: A configuração ideal do sistema microesfera-DNA-porta-amostras. h é a altura da pinça e θ é o ângulo entre o eixo de extratamento do DNA (eixo-z) e o eixo de movimento do porta-amostras (eixo-x).

Além da configuração ideal, precisamos ter certeza que a molécula de DNA não sofreu nenhum dano durante as etapas anteriores (desnaturação, por exemplo), que

não temos duas moléculas de DNA ligadas na microesfera e na lamínula e que o DNA não tenha outras partes (que não a ponta) grudada na lamínula ou grudada em outros elementos (como impurezas na amostra, bactérias, etc.). Essa análise pode ser feita observando se as características mecânicas encontradas no DNA (que será detalhada na próxima seção) estão de acordo com os apresentados na literatura e informado pelo fabricante. Para o λ -DNA, queremos encontrar $L \approx 16,5 \mu m$ e $A \approx 50,0 nm$.

4.3.2 Estiramento do DNA e análise dos dados

Depois de encontrarmos um DNA com os parâmetros padrão, estamos aptos a realizar os estiramentos. O estiramento é feito com o auxílio de um piezoelétrico que move o estágio do microscópio onde colocamos o porta-amostras. A filmagem é iniciada simultaneamente ao movimento do piezo cuja velocidade é de $v = 0,1 \mu m/s$. Nessa velocidade, a força de Stokes sobre a microesfera é desprezível e podemos considerar que o estiramento é realizado em um regime quase-estático, de forma que a força que a pinça exerce sobre a microesfera é igual em módulo a força que o DNA faz sobre a microesfera. No regime de baixas forças (regime entrópico), o DNA atua como uma mola entrópica, ou seja, ela retorna para a posição de equilíbrio devido a interação com o meio (maximizando a entropia). Assim, a medida que o DNA é estirado uma força restauradora atua sobre a microesfera (tipo força de Hooke), o estiramento do DNA ocorre até que a microesfera escape do poço de potencial da pinça óptica (isso ocorre quando a microesfera chega na região anarmônica do poço de potencial, que deixa de ser uma parábola e apresenta um platô local que não aprisiona a esfera). Quando a microesfera sai do poço, a filmagem é interrompida, o DNA retorna para a sua posição de equilíbrio e todo o procedimento é repetido. Neste trabalho, realizamos 5 estiramentos para cada alíquota utilizada, isso é feito para que no final do processo possamos tomar a média dos valores dos parâmetros de interesse melhorando a precisão do experimento.

A figura 4.10 ilustra o esquema dos estiramentos de DNA. A medida que o estágio é movido, a microesfera é deslocada no poço de potencial (a esfera vermelha mostra o instante inicial antes do movimento do piezo e a esfera azul mostra a posição da microesfera no poço em um instante qualquer durante o movimento), o movimento

da microesfera no poço ocorre devido a força exercida pelo DNA, que no regime quase-estático, é igual, em módulo, a força que a pinça exerce sobre a microesfera tem o mesmo módulo do DNA (isso significa que quanto mais deslocado do centro do poço, maior é a força que a pinça exerce sobre a microesfera). Quando a microesfera chega na região anarmônica do potencial, sai do poço de potencial e o DNA retorna a sua posição de equilíbrio.

Para encontrar a força que o DNA exerce sobre a microesfera, filmamos todo o

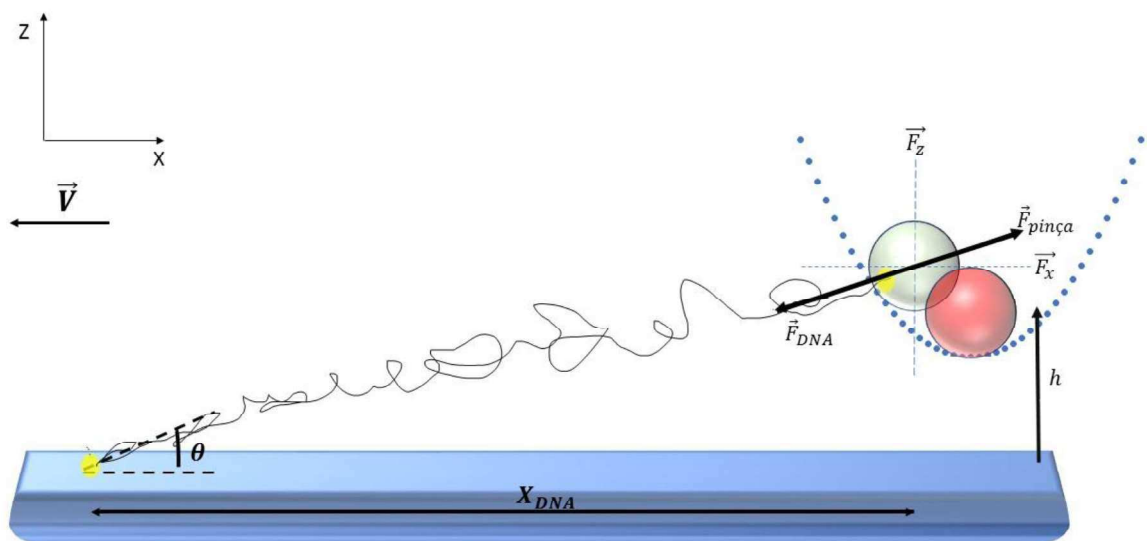


Figura 4-10: Esquema da realização dos estiramentos da molécula de DNA. A esfera vermelha representa a posição de equilíbrio original e a esfera verde representa a nova posição em equilíbrio com a força feita pelo DNA. Como a velocidade do experimento é baixa, a força de Stokes é aproximadamente zero.

experimento utilizando uma câmera CCD e o software stream pix. Utilizando o programa ImageJ no filme gerado no estiramento, podemos determinar a posição do centro de massa da microesfera por frame. Com o programa Kaleida graph, podemos tratar esses dados e obter primeiramente a posição do centro de massa da microesfera em função do tempo $x(t)$. Portanto, se conhecermos a posição inicial da microesfera, $x(0)$, ou seja, quando ela está no fundo do poço de potencial da pinça óptica, podemos então, calcular a mudança da posição da microesfera em função do tempo como sendo:

$$\Delta x(t) = x(t) - x(0). \quad (4.9)$$

Como já discutimos nos parágrafos acima, a força da pinça é igual em modulo a força que o DNA exerce sobre a microesfera, então, vamos utilizar a expressão da força que a pinça exerce sobre a microesfera em função do tempo para calcular a força que o DNA exerce sobre a microesfera em função do tempo, ou seja:

$$F_{DNA} = F_{pinça} = \kappa \Delta x(t), \quad (4.10)$$

onde κ é a constante de força da pinça óptica.

Nas figuras abaixo, podemos ver a curva típica obtida com esses procedimentos. Na figura a, obtemos a curva de força por extensão obtida pela pinça óptica e na figura b, o ajuste feito na curva da figura a com o modelo WLC [19]. Ajustando com o modelo WLC, obtemos os parâmetros mecânicos de interesse do DNA, que são: o comprimento de contorno L e o comprimento de persistência A

Vale apenas fazer uma ressalva aqui, na seção 3.3.4, desenvolvemos o modelo para um estiramento numa direção z .

Na prática, o estiramento é realizado na direção x , assim, é mais conveniente utilizar a componente- x na eq. 3.47. Note que segundo a figura 3.9, que a extensão z do DNA é dado por:

$$z = \sqrt{(x_{DNA}^2 + h^2)} \quad (4.11)$$

e

$$F_x = F \cos \theta = F (x_{DNA}/z). \quad (4.12)$$

Como já mencionamos no capítulo 2, a altura h é fixa e seu valor é de $4,4 \mu m$. Realizando essas modificações na eq. 3.47, obtemos a expressão da componente- x da força dado por:

$$F_x = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{(x_{DNA}^2 + h^2)}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{(x_{DNA}^2 + h^2)}}{L} \right)} - \frac{1}{4} \frac{x_{DNA}}{\sqrt{(x_{DNA}^2 + h^2)}} \right] \quad (4.13)$$

Com esse ajuste, obtemos para o λ -DNA valores do comprimento de contorno e de persistência próximos dos encontrados na literatura, qualificando assim, o método para estudar a variação das propriedades mecânicas do DNA ao interagir com a cafeína.

4.3.3 Adição e troca da cafeína

O objetivo desse trabalho é estudar o efeito da cafeína sobre o DNA no complexo cafeína-DNA. Para podermos avaliar os efeitos da interação usando pinça óptica, utilizamos diluições de cafeína que foram preparadas utilizando, como solvente, duas soluções de PBS com concentração de sal diferente, porém no mesmo pH fisiológico (7.4). Em estudos recentes [46]-[47], nosso grupo observou que, para ligantes carregados, a variação da força iônica¹⁵ do meio altera a forma de ligação do ligante ao DNA. Assim, como a cafeína adquire carga no pH em que estamos trabalhando (detalharemos esse fato no capítulo 5), optamos por trabalhar com as duas soluções de PBS.

Para o PBS 150 (concentração de NaCl de 140mM), a adição da cafeína ocorreu retirando-se a solução de DNA-microesferas que estava dentro do porta-amostras e colocando em seguida a alíquota de concentração mais baixa de cafeína. Todo o procedimento é realizado delicadamente utilizando a micropipeta, conforme a figura 4.10. Para garantirmos que a concentração final de cafeína no porta-amostras seja a mesma que pretendemos, o processo de retirar a alíquota que foi colocada e recolocar uma alíquota, de mesma concentração, é feito várias vezes. O volume final da alíquota de cafeína no porta-amostras é sempre de 100 μ l. Após a conclusão da troca, esperamos 20 minutos, para a que ocorra a interação da cafeína e do DNA e após esse intervalo, realizamos o procedimento de estiramento da molécula de DNA conforme já mencionamos antes. A variação da concentração das alíquotas de cafeína ocorre sempre em ordem crescente de concentração.

Para o PBS 1, o procedimento é levemente diferente. Antes de realizamos a adição da alíquota de concentração mais baixa de cafeína, realizamos a troca do PBS

¹⁵ A força iônica de uma solução é uma medida de sua concentração de íons.

no qual o DNA se encontra. Como relatamos na seção que discutimos a preparação de solução DNA-microesferas, o DNA é preparado no PBS 150 e como veremos no próximo capítulo, a força iônica desempenha um papel importante na conformação do complexo DNA-ligante. Por isso, realizamos a troca do PBS, retirando a solução de PBS 150 e adicionando PBS1 na solução (de um ponto vista prático, podemos considerar a solução de PBS 1 como sendo uma alíquota de cafeína zero e proceder da mesma forma que fizemos à adição da primeira alíquota de cafeína no parágrafo anterior). Após a troca para o PBS 1, esperamos 20 minutos, realizamos o estiramento do DNA e as análises como já mencionamos. Depois desse ponto, a adição e troca das alíquotas de cafeína ocorre de maneira semelhante ao que fizemos para o PBS 150.

É importante ressaltar, que esse procedimento de adição e troca de fármaco (e PBS) é importantíssimo, pois nos permite avaliar o efeito da interação do ligante à mesma molécula de DNA, comparando a modificação dos parâmetros mecânicos da mesma molécula em concentrações diferentes do ligante e excluindo efeitos coletivos que poderiam ocorrer caso a técnica envolvesse uma certa quantidade de moléculas de DNA.

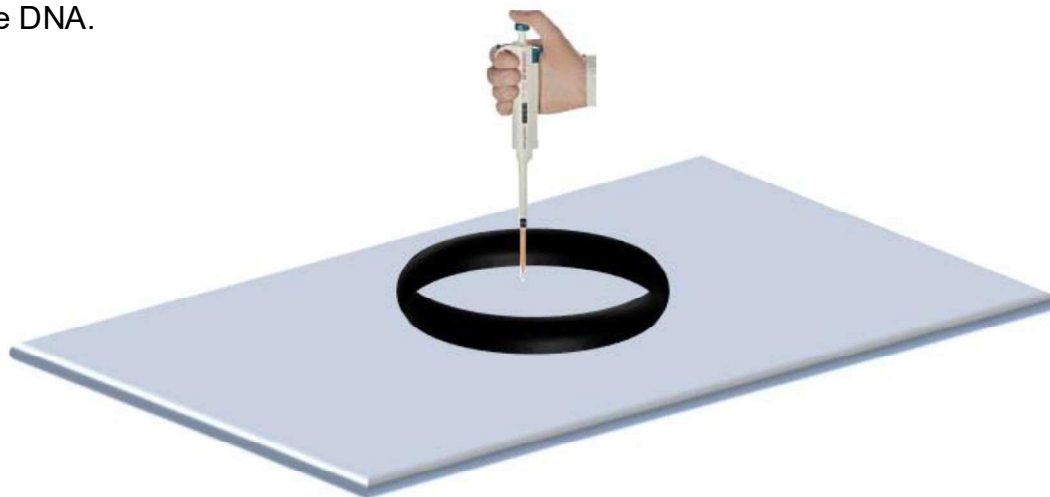


Figura 4-11: Ilustração do processo de troca das alíquotas contendo cafeína.

Capítulo 5

5. Resultados e discussão

Nesse capítulo, apresentaremos os resultados obtidos com a técnica de pinça óptica para a interação DNA-cafeína nos regimes de alta e baixa força iônica. Além disso, vamos discutir o modelo proposto para explicar a variação dos parâmetros mecânicos do DNA em função da concentração de cafeína.

5.1 Análise dos resultados do comprimento do contorno

Depois do ajuste das curvas de força por extensão (obtidas conforme as seções 4.3.2 e 4.3.3) pelo modelo WLC, foram obtidas as propriedades mecânicas do DNA. As figuras 5.1 e 5.2 mostram a variação do comprimento de contorno (L) da molécula de DNA em função da concentração total de cafeína (C_T) na presença de duas soluções salinas diferentes, PBS 150 (concentração total de sódio de 150 mM) e PBS 1 (concentração total de sódio de 1mM).

Cada ponto obtido nas figuras 5.1 e 5.2 foram obtidos de uma mesma molécula de DNA (um DNA para cada figura), as barras de erro foram calculadas pelo erro padrão da média sobre uma série de medidas (aproximadamente 6 para cada ponto). Optamos por não utilizar uma média sobre vários experimentos uma vez que, o valor do comprimento de contorno inicial (isto é, sem interagir com nenhum ligante) do λ -DNA varia, levemente, devido aos procedimentos experimentais (biotinilação, adsorção na lamínula e microesfera, etc.), de maneira que teríamos uma grande propagação de erro se a média fosse feita sobre vários experimentos. Para garantir a confiabilidade dos resultados, o padrão da variação do comprimento de contorno foi comparado com uma série de outros experimentos (aproximadamente 7, para cada concentração de sal).

A figura 5.1 mostra a variação do comprimento de contorno do DNA em função da concentração de cafeína na presença de PBS 150. Observe que o contorno aumenta de aproximadamente 16,5 μm para 20,2 μm , quando a concentração de cafeína em solução varia de 0mM para 6mM. Após isso, o contorno sofre uma queda até a concentração de 10,5 mM de cafeína, onde o comprimento de contorno mede aproximadamente 15 μm . Para concentrações acima de 10,5 mM de cafeína o contorno sobe novamente até a última concentração usada de cafeína 18 mM¹⁶, quando o contorno mede aproximadamente 19,4 μm .

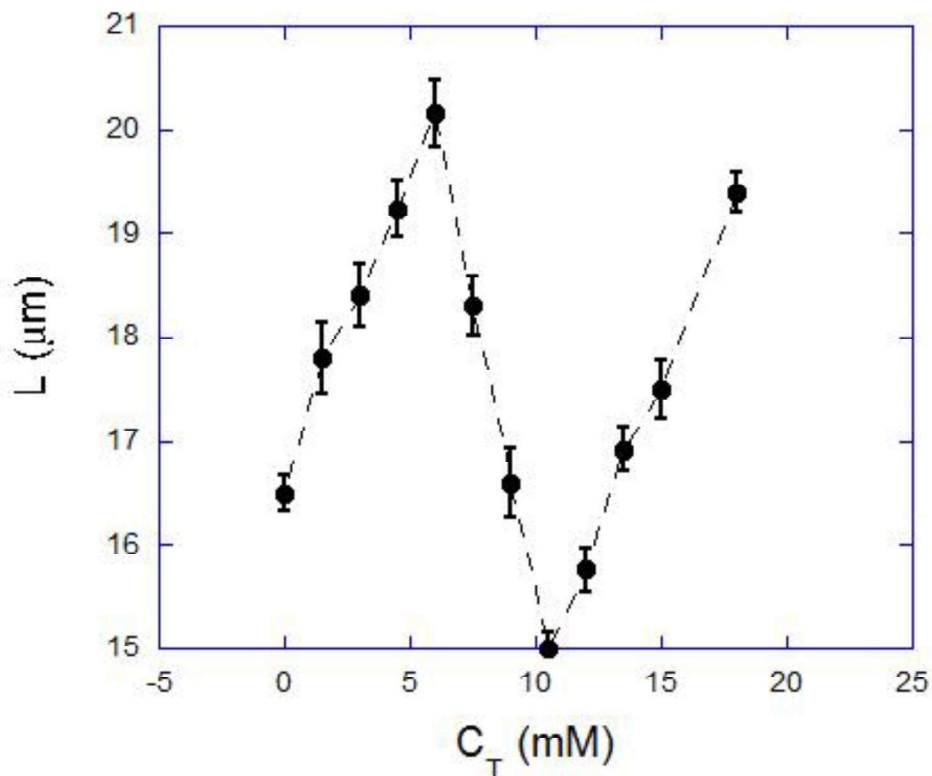


Figura 5-1: Comportamento do comprimento de contorno, L , em função da concentração de cafeína na amostra C_T , dissolvida em PBS 150. A linha pontilhada é apenas um guia para os olhos.

¹⁶ A concentração máxima de cafeína solúvel em água é de 76mM, porém, acima de 20mM, ela começa a formar grandes agregados que dificultam o experimento.

A figura 5.2 mostra a variação do comprimento de contorno do DNA em função da concentração de cafeína na presença de PBS 1. Observe que o contorno aumenta de aproximadamente 16,2 μm para 18,2 μm , quando a concentração de cafeína em solução varia de 0 mM para 4,5 mM. Após isso, o contorno sofre uma queda até a concentração de 9,0 mM de cafeína, onde o comprimento de contorno mede aproximadamente 15,6 μm . Para concentrações acima de 9,0 mM de cafeína o contorno sobe novamente até a última concentração usada de cafeína, 12,0 mM, quando o contorno mede aproximadamente 18,9 μm .

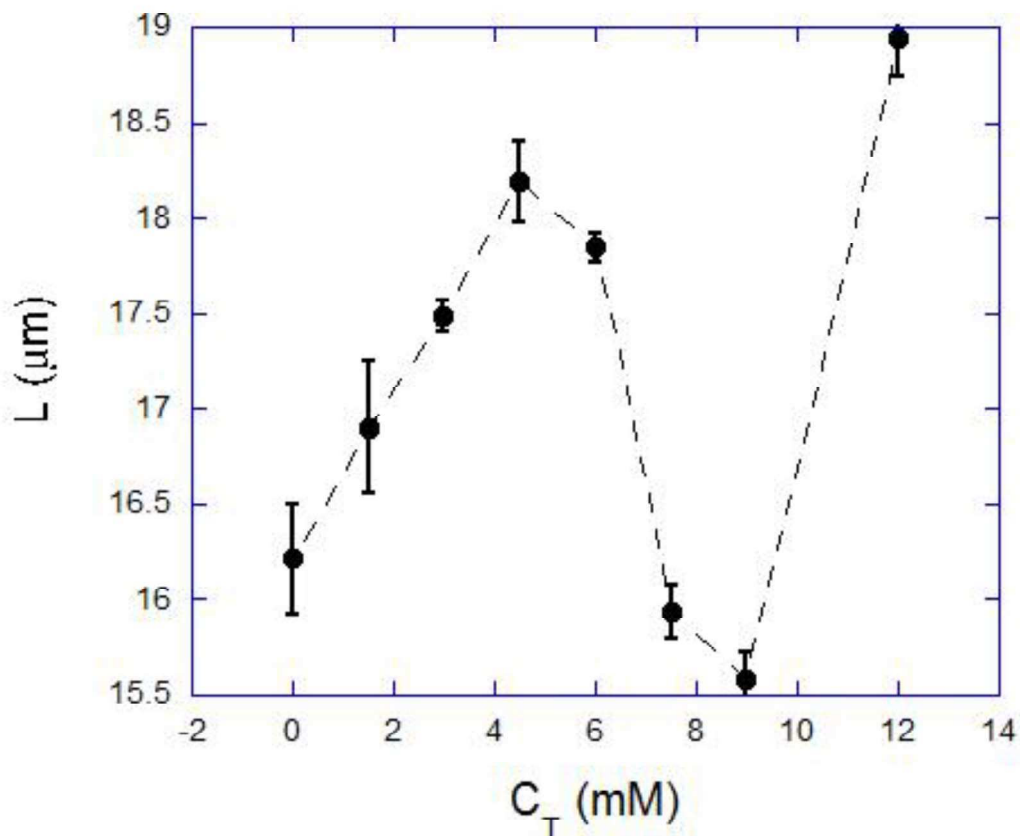


Figura 5-2: Comportamento do comprimento de contorno, L , em função da concentração de cafeína na amostra C_T , dissolvida em PBS 1. A linha pontilhada é apenas um guia para os olhos.

Esse comportamento apresentado pelo comprimento de contorno é bem anômalo para as interações entre DNA-ligantes e sugere que existe mais de uma forma de ligação entre a cafeína e o DNA. Para tentar obter a físico-química da

interação DNA-cafeína e os possíveis modos de ligação, iremos fazer nossa análise dividindo o comprimento de contorno em três partes:

- 1) A região do primeiro crescimento do comprimento de contorno. Isto é, a região que compreende o intervalo da concentração de cafeína entre 0,0 mM e 6,0 mM, para o PBS 150 e o intervalo entre 0,0 mM e 4,5 mM, para o PBS 1.
- 2) A região de decaimento do comprimento de contorno. Isto é, a região que compreende o intervalo da concentração de cafeína entre 6,0 mM e 10,5 mM, para o PBS 150 e o intervalo entre 4,5 mM e 9,0 mM, para o PBS 1.
- 3) A região do segundo crescimento do comprimento de contorno. Isto é, a região que compreende o intervalo da concentração de cafeína entre 10,5 mM e 18,0 mM, para o PBS 150 e o intervalo entre 9,0 mM e 12,0 mM, para o PBS 1.

5.1.1 Primeiro crescimento do comprimento de contorno

É amplamente conhecido na literatura que moléculas que possuem anéis aromáticos têm tendência a apresentar comportamento de intercalação. A intercalação é caracterizada pelo “empilhamento” não-covalente das moléculas do ligante entre os pares de base adjacentes da molécula de DNA, via interação com os orbitais- π desses pares de base, às vezes combinada com ligações de hidrogênio. Entre os principais efeitos sobre a molécula de DNA causado pela intercalação está o aumento do comprimento de contorno (a fim de acomodar as moléculas empilhadas) que, frequentemente, está acompanhada por um giro na dupla hélice no sentido de desfaze-la. A figura 5.3 ilustra o fenômeno da intercalação para um intercalante.

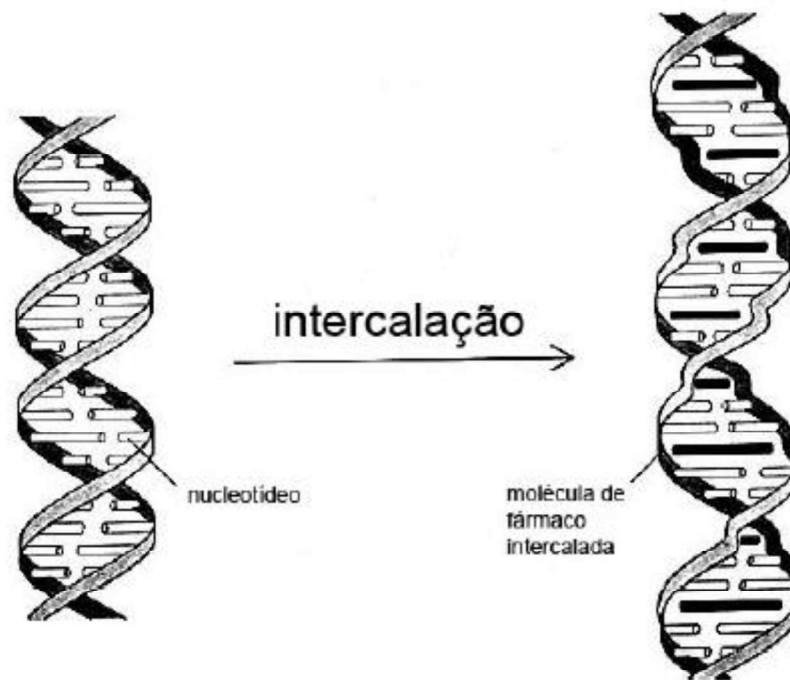


Figura 5-3: Esquema mostrando a intercalação de moléculas de um ligante entre as bases do DNA.

Poderíamos então supor, que o aumento inicial do comprimento de contorno, seria resultante da intercalação das moléculas de cafeína entre os pares de base do DNA¹⁷.

Um modelo simples que descreveria quantitativamente nosso dado experimental como resultante de uma intercalação foi formulado baseado na figura-5.4. Nesta figura, Δ é o espaçamento natural entre os pares de bases adjacentes ($\sim 0,34 \text{ nm}$), δ é o aumento induzido em um par de base particular pela intercalação da cafeína, N_{pb} é o número de pares de base do DNA e N_b é o número de moléculas de cafeína intercaladas em uma dada concentração arbitraria. Seja L_0 o comprimento de contorno do DNA puro (isto é, sem cafeína) e L o comprimento de contorno quando N_b moléculas de cafeína estão intercaladas.

¹⁷ Como a cafeína possui um anel aromático e estamos detectando experimentalmente um aumento do comprimento de contorno essa suposição é bastante razoável.

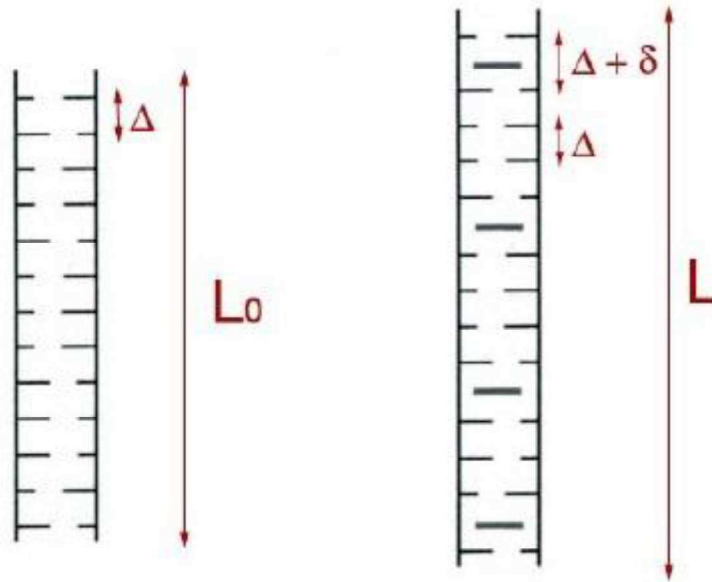


Figura 5-4: Esquema mostrando o aumento de contorno do DNA como sendo devido a intercalação.

Podemos escrever as seguintes reações envolvendo essas grandezas:

$$L_0 = N_{pb} \Delta, \quad (5.1)$$

e

$$L = L_0 + N_{pb} \delta. \quad (5.2)$$

O aumento relativo do comprimento de contorno em relação ao inicial, Θ , será então:

$$\Theta = \frac{L-L_0}{L_0} = \frac{N_b \delta}{N_{pb} \Delta} = r\gamma, \quad (5.3)$$

onde $\gamma = \delta/\Delta$ e utilizamos a fração de sítios ligados $r = C_b/C_{pb} = N_b/N_{pb}$, uma vez que o volume do nosso sistema é fixo.

A eq. 5.3, mostra como podemos conectar o comprimento de contorno com a fração de cafeína ligada r . Podemos então utilizar uma das isotermas de ligação adequada para expressar r como função da concentração de ligante livre em solução

C_f . O melhor modelo, atualmente, para expressar a isoterma de ligação para intercalantes é o modelo de McGhee e von Hippel (exclusão de vizinhos). Pois, ao se empilhar entre os pares de base, o intercalante bloqueia (exclui) os pares de bases vizinhos como possíveis sítios de ligação. Como vimos na seção 3.3.3 a isoterma de ligação para esse modelo é:

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1 - Nr) \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N-1)r} \right]^{N-1}. \quad (5.4)$$

Como o dado experimental expressa o comprimento de persistência em função da concentração total de cafeína C_T , iremos reescrever a eq. 5.4 em função de C_T ao invés de C_f . Para isso, vamos utilizar a relação:

$$C_f = C_T - C_b = C_T - rC_{pb}. \quad (5.5)$$

Substituindo a Eq. 5.5 na eq. 5.4 e isolando C_T , temos:

$$C_T = rC_{pb} + \frac{r}{K_i(1 - Nr)} \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N-1)r} \right]^{1-N}. \quad (5.6)$$

Finalmente substituindo $r = \Theta/\gamma$ na eq. 5.6, temos:

$$C_T = \frac{\Theta C_{pb}}{\gamma} + \frac{\Theta}{\gamma K_i \left(1 - N \frac{\Theta}{\gamma}\right)} \left[\frac{1 - N \frac{\Theta}{\gamma}}{1 - (N-1) \frac{\Theta}{\gamma}} \right]^{1-N}. \quad (5.7)$$

A eq. 5.7 expressa a isoterma de ligação em termos de duas variáveis de fácil acesso experimental: C_T , a quantidade total de cafeína introduzida na solução e $\Theta = (L - L_0)/L_0$, que pode ser calculado conhecendo a variação do comprimento de contorno em função da concentração total de cafeína no sistema.

Assim, utilizamos os pontos da figura 5.1 e da figura 5.2 para determinar Θ de maneira a construir um novo gráfico experimental de $C_T \times \Theta$, que pode ser ajustado com a eq. 5.7. As figuras 5.5 e 5.6 mostram esse procedimento para as soluções de cafeína diluídas em PBS 150 e PBS 1 respectivamente.

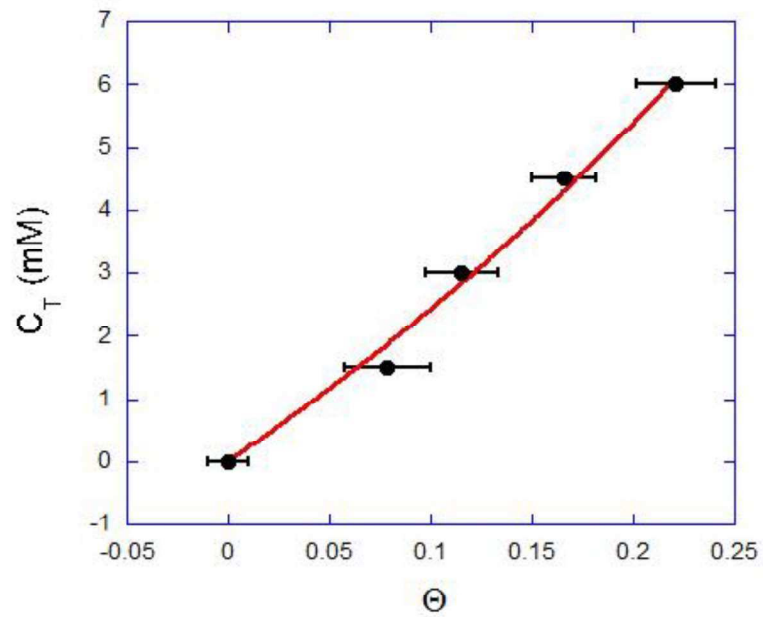


Figura 5-5: PBS150-Pontos: dado experimental da figura 5.1 para a interação DNA-caféina. Linha vermelha: ajuste com a eq. 5.7. Deste ajuste extraímos o número de exclusão de vizinhos $N = 1,0 \pm 0,1$.

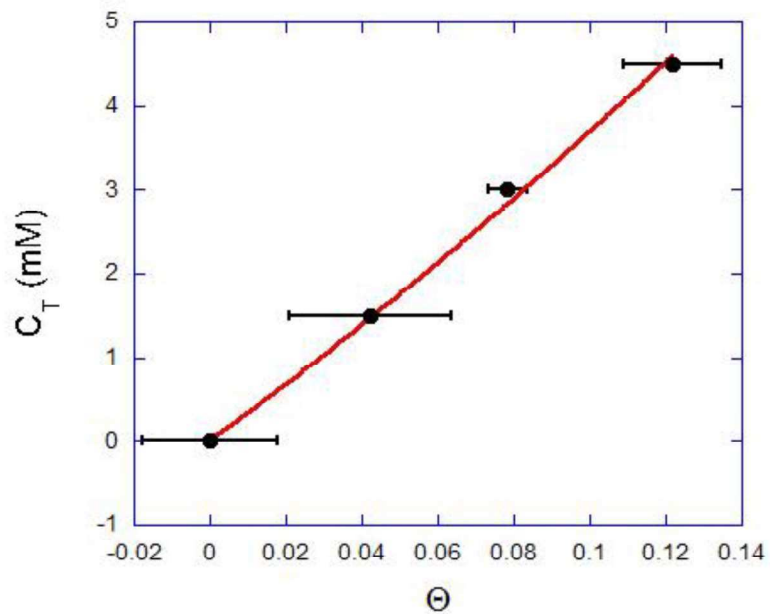


Figura 5-6 : PBS1-Pontos: dado experimental da figura 5.2 para a interação DNA-caféina. Linha vermelha: ajuste com a eq. 5.7. Deste ajuste extraímos o número de exclusão de vizinhos $N = 1,0 \pm 0,1$.

Note que a eq. 5.7 concorda bem com os dados experimentais obtidos nos dois casos. Desse ajuste podemos extrair duas propriedades físico-químicas de fundamental importância: a constante intrínseca K_i e o número de exclusão N . nesse ajuste, usamos valores fixos para $C_{pb} = 2.43 \mu M$ (concentração de par de base de DNA usada na preparação da amostra) e $\gamma = 1^{18}$.

Em particular nos chama a atenção dois aspectos dessas análises. O número de exclusão (N) obtido nos dois casos não é condizente com o valor esperado para intercalantes. De fato, o número de exclusão típico para intercalantes está entre 2,0 e 3,5 e reflete o efeito de exclusão de vizinhos. Ao aplicarmos o modelo de exclusão de vizinhos e obtermos $N = 1$, isso significaria que, ao intercalar, a cafeína ocuparia todos os sítios da rede, o que se tratando de um intercalante seria um absurdo. Além disso, o aumento relativo do comprimento de contorno (θ) encontrado nos dois casos (0,25 para o PBS 150 e 0,14 para o PBS 1) não são compatíveis para o caso de intercalantes, que possuem θ na tipicamente entre 0,25 e 0,4.

Na figura 5.7 apresentamos a curva de uma isoterma de um intercalante típico (EtBr). Ao compararmos com a curva das figuras 5.5 e 5.6 fica evidente que elas não correspondem a uma isoterma de um intercalante.

Assim, podemos concluir que a intercalação não é o efeito dominante na ligação da cafeína ao DNA. Acreditamos que o aumento observado no comprimento de contorno seja produzido por uma mudança estrutural na molécula de DNA, provavelmente, causada pela ligação da cafeína nas fendas (ou nos pares de base) que tendem a desenrolar a dupla hélice e conseqüentemente, aumentar o comprimento de contorno.

Dados obtidos por H. Fritzsche e colaboradores, através da técnica de RMN^{1H} corroboram nossa análise. Eles reportam em [35] que para baixas concentrações de cafeína ($< 10 \text{ mM}$) ocorre a inserção de cafeína nos pares de base do DNA, porém,

¹⁸ Valor típico para intercalantes, uma vez que o intercalante sempre dobra o espaçamento entre os pares de base devido a sua ligação.

os dados obtidos foram incompatíveis com o valor esperado caso essa inserção ocorresse como uma intercalação.

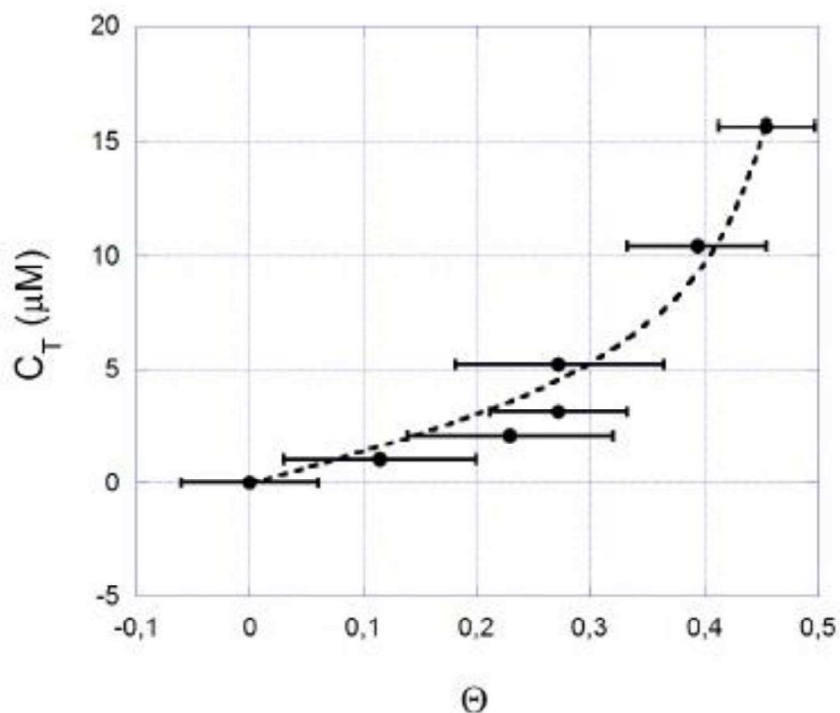


Figura 5-7: Pontos: dado experimental obtido de [25] para a interação DNA-EtBr. Linha vermelha: ajuste com a eq. 5.7. Deste ajuste extraímos duas propriedades físico-químicas importantes do sistema, $K_i = (4,5 \pm 2,0) \times 10^5 \text{M}^{-1}$ e $N = 1,7 \pm 0,1$. Isto indica que cada molécula de EtBr intercalada ocupa efetivamente cerca de dois pares de base na molécula de DNA.

5.1.2 Queda do comprimento de contorno

A água desempenha um papel fundamental na estrutura e conformação da molécula de DNA. Diversos trabalhos na literatura relacionam a hidratação do DNA a sua forma conformacional (A, B e Z). Michael Falk e colaboradores estudaram, usando espectroscopia de infravermelho, os possíveis sítios de ligação das moléculas de água no DNA, a figura 5.8 ilustra esses possíveis sítios de ligação [48].

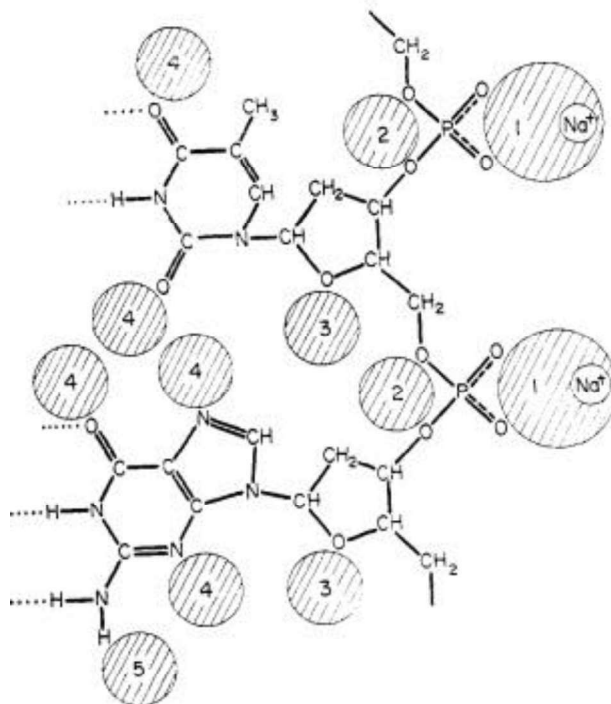


Figura 5-8: Possíveis sítios para a adsorção da molécula de água para uma fita do DNA contendo as bases timina e guanina. Os sítios 1 e 2 são ao redor do grupo fosfato, o sítio 3 é ao redor dos açúcares e o sítio 4 é ao redor das bases. Foto obtida de [48]

Em seu artigo complementar, Michael Falk e colaboradores, estudaram o efeito da hidratação sobre a estrutura do DNA [49]. Usando difração de Raio-X em filmes de DNA eles verificaram as mudanças estruturais na molécula de DNA em função da umidade relativa (h.r.) ao longo do ciclo de desidratação e reidratação dos filmes de DNA. Nesse experimento eles verificaram que durante o ciclo de desidratação, para uma baixa taxa de h.r. (entre 50-40%), o DNA sofre uma mudança estrutural (reversível¹⁹) para a forma A.

Fritzsche e colaboradores estudaram o efeito da hidratação da molécula de DNA com e sem a interação com a cafeína em [11], usando a técnica de dicróismo linear UV nos filmes orientados de DNA e em filmes de DNA-cafeína como função de h.r. durante o ciclo de desidratação e reidratação. A variação da h.r. dos filmes produz uma mudança conformacional tanto no DNA puro quanto no DNA complexado com cafeína, conforme discutimos no parágrafo anterior. Foi observado que na presença de cafeína, a faixa de existência do DNA do tipo A foi estendida para regiões maiores de h.r. (durante o ciclo de reidratação) do que foi observado para o DNA puro. Além

¹⁹ Durante o ciclo de reidratação, uma percentagem de DNA retorna para a forma B, conforme a h.r. aumenta.

disso, foi observado uma maior percentagem de DNA do tipo A nos filmes de DNA-cafeína (cerca de 51%) do que nos filmes de DNA puro (cerca de 22%) em uma taxa de h.r. de cerca de 90%, evidenciando a cafeína como um possível agente de desidratação do DNA.

Conforme discutimos na seção 4.1.2, ao ser dissolvida em solução aquosa, a cafeína sofre protonação e adquire carga elétrica positiva. Essa carga positiva facilita a ligação de cafeína na cadeia de fosfato (eletricamente negativa) do DNA. Essa ligação, conforme discutimos em 4.1.1, ocorre por meio de agregados de cafeína no lado exterior do esqueleto de fosfato posicionando-se perpendicular ao mesmo nas duas formas conformacionais do DNA (A e B) [11].

Ao adicionarmos a cafeína na solução aquosa contendo o DNA, ocorre um aumento da força iônica do sistema devido a protonação da cafeína, que passa a interagir com o grupo fosfato do DNA, diminuindo a interação entre eles. Conseqüentemente temos um aumento na solubilidade do DNA em meio aquoso (efeito "salting-in"). Esse efeito, porém, não se estende indefinidamente. Ao aumentarmos a concentração de cafeína (e conseqüentemente de íons de cafeína) temos o efeito contrário, *salting-out*. A água, que apresenta um grande poder de solvatação, passa a interagir com as duas espécies: o DNA e os íons de cafeína ligados no DNA. Porém, as moléculas de água apresentam uma maior tendência de solvatação de partículas menores (nesse caso, os íons de cafeína). As moléculas de água, ocupadas em sua interação com os íons de cafeína, "abandonam" a estrutura do DNA. Como conseqüência, temos uma desidratação da molécula de DNA em favor de uma hidratação²⁰ do complexo DNA-cafeína.

Dados obtidos via RMN por H. Lang [11] sustentam essa hipótese. Medindo o tempo de relaxamento dos prótons da água da molécula de DNA com e sem interagir com a cafeína, ele concluiu que a interação da cafeína com o DNA produz uma perturbação na camada de hidratação do DNA, deslocando as moléculas de água de entre as bases para os agregados de cafeína ligados no esqueleto do DNA. Assim a

²⁰ A ligação da cafeína ao DNA cria uma nova esfera de hidratação em volta do complexo que blinda a molécula de DNA. Essa blindagem faz com que o DNA "enxergue" uma menor concentração de água dentro do complexo.

caféina poderia produzir um efeito parecido com o observado nos experimentos de Fritzsche, ou seja, uma mudança conformacional no DNA devido a sua desidratação.

Acreditamos que seja isso o que temos observado com a queda do comprimento de contorno nas figuras 5.1 e 5.2. A ligação da caféina causaria uma desidratação da molécula de DNA o que ocasionaria uma mudança conformacional da forma B indo em direção a forma A. Tal mudança estrutural, ocasionaria um encurtamento da molécula de DNA (logo do comprimento de contorno), uma vez que a forma A é mais compacta que a forma B, conforme mencionamos na seção 3.2. Analisando as figuras 5.1 e 5.2, temos que essa compactação é cerca de $0,34 \text{ \AA}$ ($\sim 10,3\%$) por par de base para o PBS 150 e cerca de $0,12 \text{ \AA}$ ($\sim 3,5 \%$) por par de base para o PBS 1.

5.1.3 Segundo crescimento do comprimento de contorno

Como discutimos na seção anterior, acreditamos que o DNA sofra uma mudança conformacional devido a interação com a caféina. Sem um estudo da cristalografia da molécula após essa mudança estrutural, não podemos encontrar um modelo que descreva o aumento do contorno observado no experimento nem extrair nenhum parâmetro físico-químico da interação nesse intervalo com o auxílio de uma isoterma de ligação.

5.2 Análise dos resultados do comprimento de persistência

Outro parâmetro mecânico obtido das curvas de força por extensão (modeladas com o modelo WLC) é o comprimento de persistência (A). As figuras 5.9 e 5.10 mostram o comprimento de persistência da molécula de DNA em função da concentração total de caféina em solução na presença de PBS 150 e PBS 1 respectivamente.

A figura 5.9 descreve o comportamento da interação DNA-caféina no regime de alta força iônica (PBS 150), o comprimento de persistência aumenta de

aproximadamente 41,6 nm para aproximadamente 50 nm, quando a concentração de cafeína em solução varia de 0mM para 3mM. Após isso, a persistência sofre uma queda até a concentração de 7,5 mM de cafeína onde a ela mede aproximadamente 26,0 nm. A partir da concentração de 7,5 mM de cafeína, o comprimento de persistência se manteve constante até a última concentração utilizada nesse trabalho (18 mM).

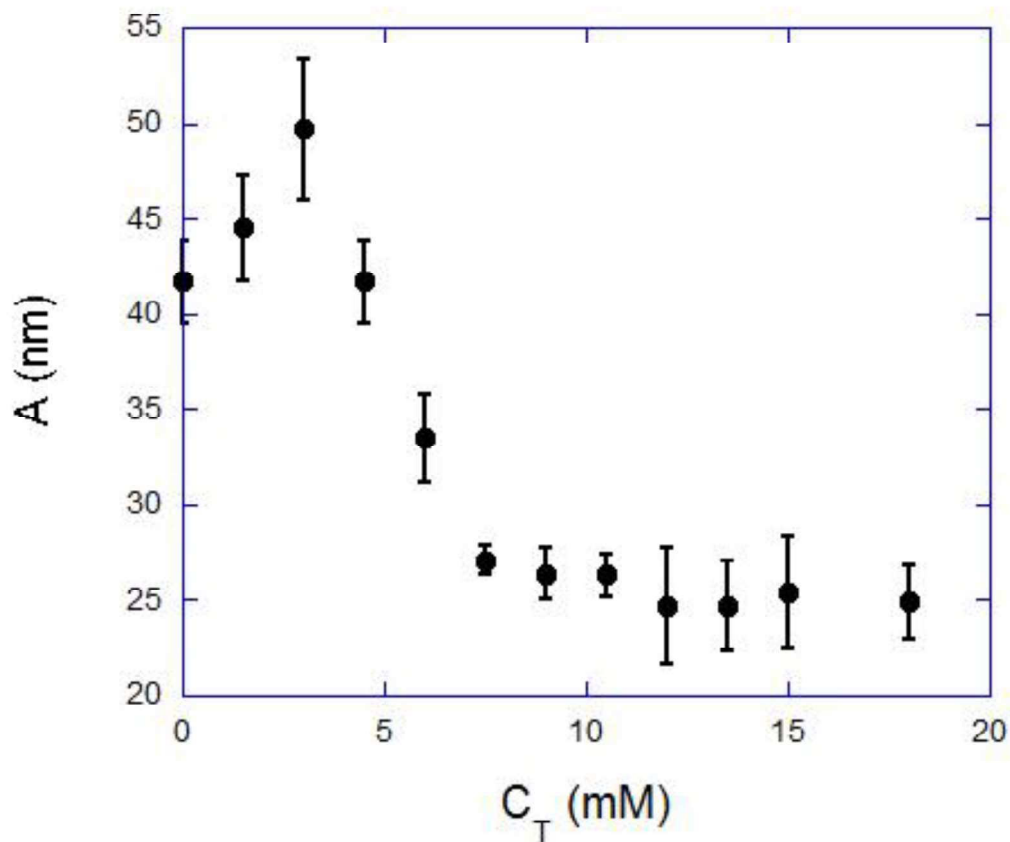


Figura 5-9:PBS 150- Comprimento de persistência (A) em função da concentração total de cafeína (C_T) para alta força iônica [150 mM]. Observe o comportamento não monotônico da persistência.

A figura 5.10 descreve o comportamento da interação DNA-cafeína no regime de baixa força iônica (PBS 1), o comprimento de persistência apresenta um comportamento monotônico de queda do valor inicial (aproximadamente de 62,5 nm) até aproximadamente 34,2 nm quando a concentração de cafeína varia de 0 mM até 3 mM. A partir da concentração de 3 mM, o comprimento de persistência fica

aproximadamente constante, pelo menos, última concentração utilizada nesse trabalho (12 mM).

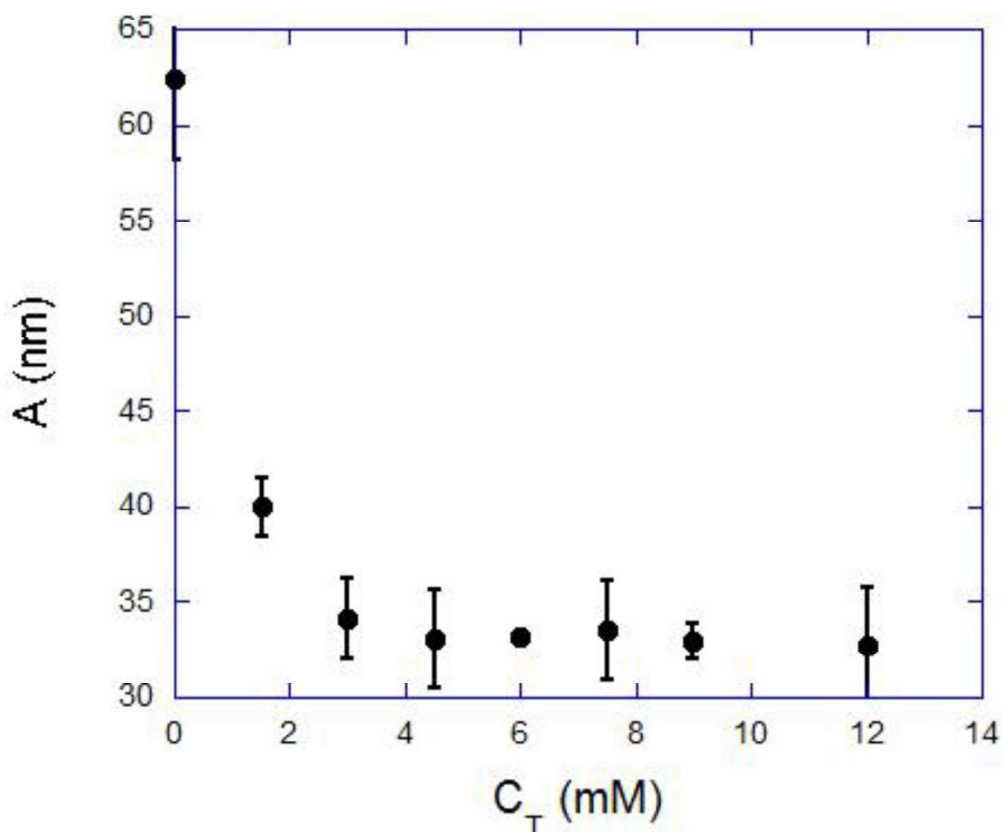


Figura 5-10:PBS 1- Comprimento de persistência (A) em função da concentração total de cafeína (C_T) para baixa força iônica [1 mM]. Observe o comportamento monotônico da persistência.

Antes de apresentarmos as análises físico-químicas, vamos fazer algumas considerações sobre os dados experimentais apresentado nas figuras 5.9 e 5.10.

Ao contrário do comprimento de contorno, os dados do comprimento de persistência foram obtidos através da média sobre várias moléculas de DNA. Como discutido no capítulo 3, o comprimento de persistência é uma propriedade intrínseca da molécula de DNA, que depende somente do meio onde o DNA se encontra. Assim, as variações medidas entre as diferentes moléculas estão dentro do erro experimental.

As medidas do comprimento de persistência para baixa força iônica (PBS 1), apresentam um valor inicial da persistência elevado (cerca de 63 nm) em relação aos valores medidos para a alta força iônica (cerca de 44 nm) devido a influência da força iônica sobre a flexibilidade do DNA. Note que a força iônica, apesar do nome, é uma medida da concentração dos íons presente na solução. Como o DNA é eletricamente negativo, ao reduzir a concentração de íons na solução, reduzimos também a blindagem ao grupo fosfato do DNA e conseqüentemente aumentamos a repulsão entre eles o que ocasiona o aumento da rigidez da molécula.

5.2.1 Determinação dos parâmetros físico-químicos da interação

Na seção 5.1.2, nós interpretamos a queda do comprimento de contorno como uma mudança conformacional na molécula de DNA, na qual, ela muda para uma conformação intermediária entre as formas canônicas A e B. Assim, para garantir que estamos extraindo a físico-química da interação do B-DNA com a cafeína, iremos limitar essa análise para o intervalo das concentrações de cafeína que precedem essa mudança conformacional.

Quando discutimos a energia de flexibilidade da cadeia polimérica (seção 3.3.3), consideramos como constante a rigidez flexural da cadeia (g) na eq. 3.14. Isso é válido para DNAs puros. Na presença de ligantes, entretanto, esta rigidez muda localmente nas regiões ligadas ao longo da molécula de DNA. Essa modificação da rigidez local altera o comprimento de persistência localmente também, de maneira que os comprimentos de persistência medidos experimentalmente se referem, na verdade, ao comprimento de persistência efetivo (A_E) da molécula. De um ponto de vista conceitual, podemos interpretar a molécula de DNA como uma associação de molas entrópicas em série, onde cada mola representa um valor da rigidez local.

Podemos utilizar o modelo estatístico de molas entrópicas para construirmos o modelo estatístico da desordem de sítios. Consideremos inicialmente que a molécula de DNA seja dividida em N sítios de ligação. Se um sítio está ligado a um ligante, sua

rigidez flexural muda e podemos associar um comprimento de persistência local (A_i) a essa nova flexibilidade. Seja:

- A_0 é o comprimento de persistência local quando o N-esimo sitio não está ligado a um ligante.
- A_1 é o comprimento de persistência local quando o N-esimo sitio está ligado ao ligante mas seus primeiros vizinhos não estão ligados.
- A_2 é o comprimento de persistência local quando 2 sítios vizinhos estão ligados a um ligante mas os primeiros vizinhos a eles não.
- A_n é o comprimento de persistência local quando n sítios vizinhos estão ligados a um ligante mas os primeiros vizinhos a eles não.

A figura 5.11 exemplifica esse processo. Note que A_0 mede o comprimento do DNA puro.

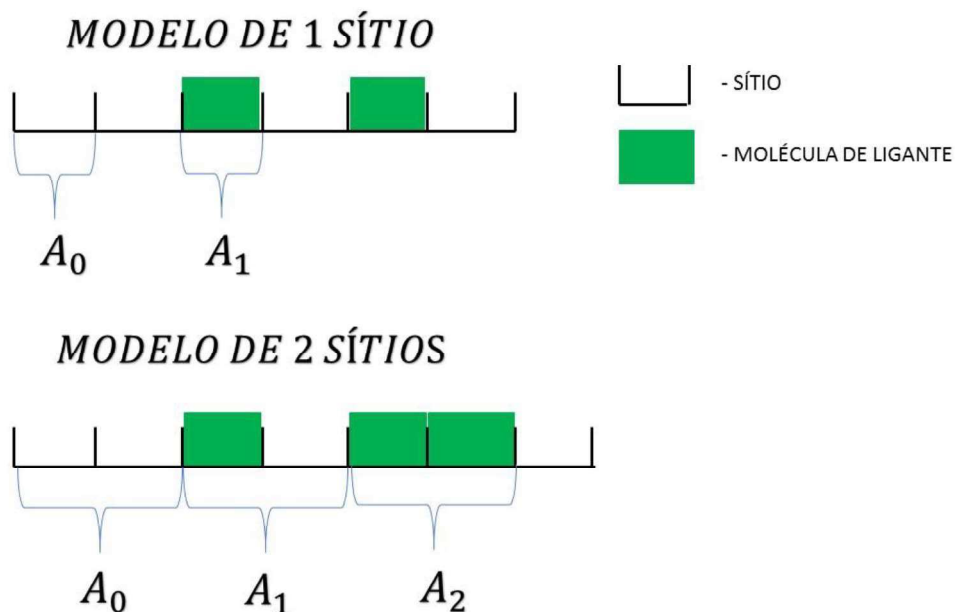


Figura 5-11: Esquema demonstrando o comprimento de persistência local do modelo de desordem de sítios.

Probabilisticamente, o comprimento de persistência efetivo pode ser associado com uma configuração de molas em série da seguinte maneira:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f(r)}{A_0} + \frac{g(r)}{A_1} + \frac{h(r)}{A_2} \dots \frac{t(r)}{A_n}, \quad (5.8)$$

onde $f(r)$, $g(r)$, $h(r)$ e $t(r)$ são funções que estão correlacionadas com a fração de sítios ligados r .

O modelo mais simples é o modelo de desordem de um sítio. Para esse caso:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f(r)}{A_0} + \frac{g(r)}{A_1}, \quad (5.9)$$

onde:

- $f(r)$ é a probabilidade de encontrar um sítio não ligado, ou seja $f(r) = 1 - x$.
- $g(r)$ é a probabilidade de encontrar um sítio ligado, ou seja $g(r) = x$.

Assim:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{1-x}{A_0} + \frac{x}{A_1}, \quad (5.10)$$

O modelo consiste em resolver numericamente uma isoterma de ligação adequada. No caso da isoterma de Hill, a fração de sítios ligados r em função da concentração total de ligante, pode ser escrita como:

$$x = \frac{x}{r_{max}} = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} = \frac{[K_i (C_T - r_{max} C_{pb} x)]^n}{1 + [K_i (C_T - r_{max} C_{pb} x)]^n}, \quad (5.11)$$

onde C_{pb} é a concentração de pares de base do DNA na amostra e r_{max} é a fração máxima de ligante ligado no DNA. Sabendo K_i , r_{max} e n , a equação de Hill pode ser resolvida numericamente para x , para tanto, foi adaptada a seguinte metodologia:

1. Um valor provisório é atribuído a cada um dos parâmetros físico-químicos K_i , r_{max} e n .
2. Usando o programa MATLAB foi resolvida numericamente a equação de Hill, obtendo-se o valor de x em termos da concentração total de ligante. Estes últimos dados são usados para ajustar o comprimento de persistência efetivo na eq.10 pelo método dos mínimos quadrados.

3. Os procedimentos anteriores são repetidos várias vezes até ser atendido o ajustamento de convergência dos mínimos quadrados. Assim, os parâmetros físico-químicos e o comprimento de persistência local são obtidos.

No caso do modelo de exclusão de vizinhos, os parâmetros ajustáveis são: K_i , r_{max} e N

$$x = \frac{x}{(C_T - r_{max}C_{pb}x)r_{max}} = K_i(1 - Nx) \left[\frac{1 - Nx}{1 - (N - 1)x} \right]^{N-1} \cdot \quad (5.12)$$

O segundo modelo mais simples é o modelo de desordem de dois sítios. Neste caso:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f(r)}{A_0} + \frac{g(r)}{A_1} + \frac{h(r)}{A_2}, \quad (5.13)$$

onde:

- $f(r)$ é a probabilidade de termos dois sítios consecutivos desocupados, $f(r) = \left(1 - \frac{x}{r_{max}}\right)^2$.
- $g(r)$ é a probabilidade de termos dois sítios consecutivos, um ocupado e outro desocupado, $g(r) = 2 \left(\frac{x}{r_{max}}\right) \left(1 - \frac{x}{r_{max}}\right)$.
- $h(r)$ é a probabilidade de termos dois sítios consecutivos ocupados, $h(r) = \left(\frac{x}{r_{max}}\right)^2$.

Assim, o comprimento de persistência efetivo pode ser escrito da seguinte forma:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{\left(1 - \frac{x}{r_{max}}\right)^2}{A_0} + 2 \frac{\left(\frac{x}{r_{max}}\right) \left(1 - \frac{x}{r_{max}}\right)}{A_1} + \frac{\left(\frac{x}{r_{max}}\right)^2}{A_2}. \quad (5.14)$$

Com base na eq.14, procedemos da mesma forma que no modelo de desordem de um sítio para escrever numericamente a isoterma de ligação (eq. 5.11 ou eq. 5.12)

usando o algoritmo citado anteriormente, entretanto, agora obtemos os dois comprimentos de persistência local A_1 e A_2 e os parâmetros físico-químicos da ligação.

5.2.2 Força iônica alta (PBS 150)

A figura 5.12 exibe o ajuste para o comprimento de persistência pelas isotermas de Hill e exclusão de vizinhos (NEM), procedido conforme a seção anterior (modelo de desordem de 2 sítios). Como já mencionamos, a análise foi feita para pontos antes da mudança conformacional do DNA.

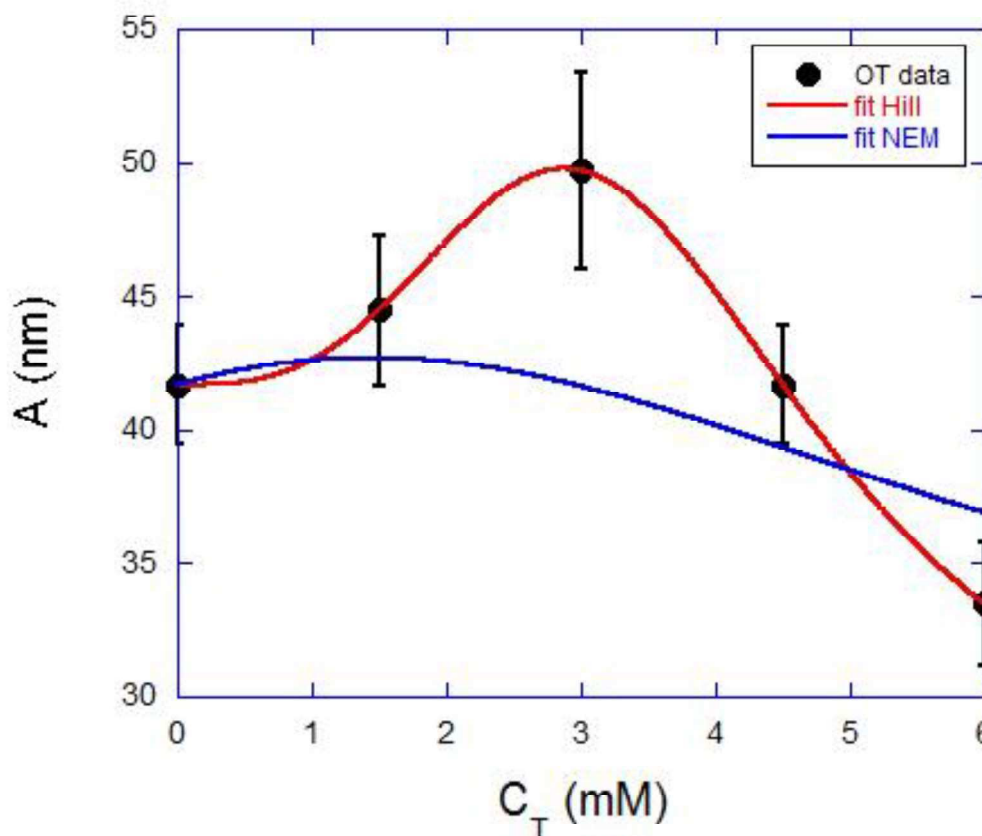


Figura 5-12:PBS 150- Ajuste do comprimento de persistência para forças iônicas altas. Ajuste de A feito pelas isotermas de Hill e exclusão de vizinhos (NEM). Note que ao contrário do modelo de Hill, o modelo de exclusão de vizinhos não consegue descrever os pontos experimentais.

Note que a persistência apresenta um comportamento não monotônico, assim o modelo mais simples capaz de descrever esse sistema é o modelo de desordem de dois sítios. Claramente, o modelo de exclusão de vizinhos não foi capaz de descrever os dados experimentais obtidos com o uso da técnica de pinça óptica e isso corrobora com a interpretação de que o sistema não apresenta intercalação conforme havíamos intuído na análise do comprimento de contorno.

O modelo de Hill se ajusta muito bem aos dados e a partir dele podemos obter os parâmetros físico-químicos da interação DNA-cafeína antes da mudança conformacional da molécula de DNA. Os parâmetros obtidos foram:

- $K_i = (0,3 \pm 0,02)10^3 M^{-1}$
- $n = 3,1 \pm 0,3$
- $A_1 = (87 \pm 5) nm$
- $A_2 = (26 \pm 2) nm$

Note que o sistema apresenta um coeficiente de Hill ($n \sim 3$) positivo, isso implica que o sistema apresenta cooperatividade positiva. Ou seja, as moléculas de cafeína se ligam ao DNA formando pequenos agregados (aproximadamente 3 moléculas em cada agregado), devido a cooperatividade positiva da interação. As moléculas de cafeína devem ligar-se quase que simultaneamente formando o agregado, justificando, portanto, o uso da equação de Hill (e não por exemplo o modelo de ligação sequencial). Por outro lado, a posição desses agregados ao longo da rede é aleatória, isto é, a cooperatividade está restrita ao “tamanho do agregado”. Temos assim, portanto, que o coeficiente de Hill nos permite estimar um limite inferior para o número de moléculas de cafeína que efetivamente cooperam na interação.

A constante de ligação (K_i) obtida por nós, está relativamente próxima à obtida por Nafisi e colaboradores usando técnicas de espectroscopia, $K_i = 9,7 \times 10^3 M^{-1}$ [50]. Essa diferença entre os valores obtidos para K_i , podem estar correlacionadas ao intervalo de concentração de cafeína [(0.15-12.5)mM] utilizada por Nafisi em seu experimento, o que segundo nossa interpretação, incluiria a contribuição da transição estrutural causada para cafeína.

5.2.3 Baixa força iônica (PBS 1)

A figura 5.13 mostra o ajuste realizado no comprimento de contorno no regime de baixa força iônica. Observe que o comprimento de persistência cai monotonicamente, da maneira que pode ser descrito com o modelo de desordem de um sítio. Igualmente ao que fizemos na seção 5.2.1, nossa análise se restringiu ao intervalo de concentrações de cafeína antes que a mudança conformacional do DNA ocorresse, neste caso, o intervalo foi de (0-4,5) mM.

Utilizamos dois modelos para descrever a variação do comprimento de persistência, o modelo de Hill e o modelo de exclusão de vizinhos (NEM). Note que para o regime de baixa força iônica, os dois modelos conseguem descrever bem ao comportamento do comprimento de persistência da molécula de DNA. Os parâmetros físico-químicos extraído da análise desses modelos foram:

Modelo de Hill	Modelo de exclusão de vizinhos (NEM)
<ul style="list-style-type: none">• $K_i = (1 \pm 0,3) \times 10^3 M^{-1}$• $n = 1 \pm 0,2$• $A_1 = (29 \pm 4) nm$	<ul style="list-style-type: none">• $K_i = (7,3 \pm 4,0) \times 10^3 M^{-1}$• $N = 1,5 \pm 0,3$• $A_1 = (31,5 \pm 4,0) nm$

A análise a partir do modelo de Hill nos indica que para esse regime da força iônica não existe cooperatividade ($n = 1$), ou seja, a ligação das moléculas de cafeína no DNA ocorre através dos monômeros de cafeína. A cooperatividade da cafeína está intimamente ligada a carga elétrica positiva que ela adquire ao sofrer protonação em solução aquosa. Em solução com alta força iônica, os sais presentes na solução, “blindam” a carga da cafeína e permite que ela forme agregados. Ao diminuirmos a força iônica essa blindagem também é reduzida e impede a formação dos agregados. Esse comportamento não é exclusivo da cafeína, de fato, nosso grupo de pesquisa vem observando esse comportamento em outros ligantes que apresentam carga elétrica em solução aquosa como, o berenil [46], a cisplatina [47] e a putrescina.

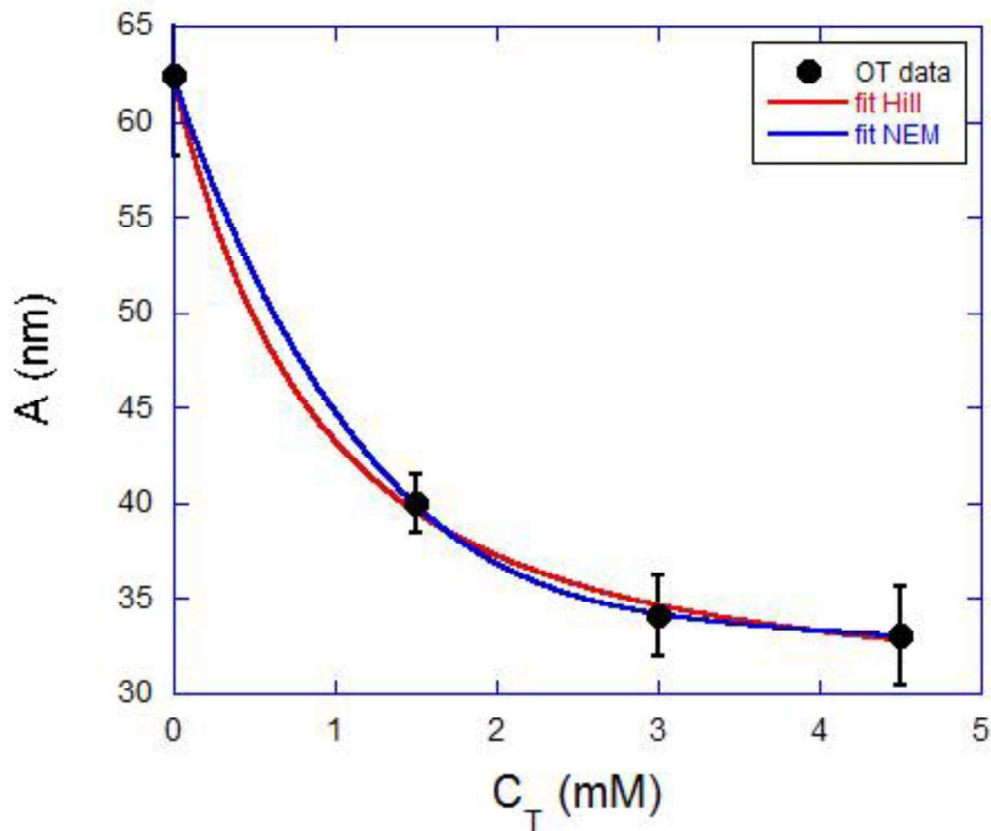


Figura 5-13:PBS1- Ajuste do comprimento de persistência para força iônica baixa. Ajuste de A feito pelas isortemas de Hill e exclusão de vizinhos (NEM). Note que ao contrário do regime de alta força iônica, para esse caso, os dois modelos conseguem descrever bem os dados experimentais.

A análise do modelo de exclusão de vizinhos (NEM), nos reporta $N = 1,5$, ou seja, a cafeína ocupa 1,5 sítios na rede. Esse valor é próximo ao que encontramos quando analisamos o comprimento de contorno na seção 5.1.1 e evidencia, mais uma vez, que a intercalação não é um dos modos de ligação da cafeína.

Os valores encontrados para K_i nos dois modelos são relativamente próximos ao obtido no regime de alta força iônica e ao relatado na literatura [50]. Vale destacar que esses valores obtidos para a cafeína são muito baixos se comparados com outros ligantes que em média tem $K_i \sim 10^5$. Isso evidencia que a cafeína não é um bom ligante à molécula de DNA.

Capítulo 6

6. Conclusões

A partir do experimento de pinçamento óptico foram realizados estiramentos na molécula de DNA no regime entrópico afim de se obter a variação dos parâmetros mecânicos como função da variação da concentração de cafeína em solução. Uma vez que a cafeína apresenta carga em solução aquosa, utilizamos duas concentrações de sais distintas para observar o efeito da força iônica sobre a interação DNA-cafeína.

Da análise do comprimento de contorno, com o auxílio do modelo de exclusão de vizinhos, podemos concluir que a intercalação não é um mecanismo de interação do complexo DNA-cafeína. De fato, da análise obtivemos $N = 1$, o que é incompatível para intercalantes, uma vez que ao intercalar, o ligante achata os pares de base vizinhos ao que ele intercalou. Intercalantes típicos apresentam um coeficiente de exclusão entre 2,0 e 3,5. Assim, o aumento do contorno causado pela cafeína deve ser causado por uma mudança estrutural ocasionado pela inserção da cafeína nos pares de base conforme relatado por H. Lang em [40].

A cafeína induz uma mudança de conformação na molécula de DNA (B-DNA para A-DNA) a partir da concentração de 6 mM para o regime de força iônica alta e a partir da concentração de 4,5 mM para o regime de força iônica baixa. Essa mudança ocorre devido a desidratação da molécula de DNA causada pela ligação da cafeína protonada ao esqueleto do DNA. Como consequência dessa mudança conformacional, podemos detectar uma redução do comprimento de contorno da molécula de DNA no complexo DNA-cafeína. Em média, tivemos uma redução de 0,34 Å da distância entre os pares de base (aproximadamente 10,3%) no regime de força iônica alta e uma redução de 0,12 Å da distância entre os pares de base (aproximadamente 3,5%) no regime de força iônica baixa. Essa mudança conformacional (sobretudo essa redução na distância entre os pares de base), pode

desempenhar um papel fundamental na de-intercalação observada para intercalantes na presença de cafeína [10]. Como continuação desse trabalho, iremos analisar via pinça óptica a influência da cafeína sobre a ligação de intercalantes ao DNA, onde esperamos compreender se de fato a mudança conformacional é responsável pela de-intercalação (ou qual o seu papel no processo de de-intercalação).

Através da análise do comprimento de persistência, pudemos obter a constante de interação da cafeína ao DNA (K_i) e o coeficiente de Hill para os dois regimes de força iônica e o número de exclusão para o regime de força iônica baixa. Através da comparação do coeficiente de Hill, obtido nos dois regimes de força iônica, pudemos concluir que a cafeína só apresenta cooperatividade (sendo mais preciso cooperatividade positiva) no regime de força iônica alta, onde em média três moléculas de cafeína se ligam simultaneamente ao DNA, no regime de força iônica baixa a cooperatividade desaparece. O efeito da força iônica influenciar a cooperatividade de ligantes carregados tem sido observado em nosso grupo regularmente e nos parece ser um efeito geral. As constantes obtidas para a ligação DNA-Cafeína foram: $K_i = (0,3 \pm 0,02)10^3 M^{-1}$ no regime de força iônica alta e $K_i = (1,0 \pm 0,3)10^3 M^{-1}$ para o regime de força iônica baixa, esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados na literatura [50].

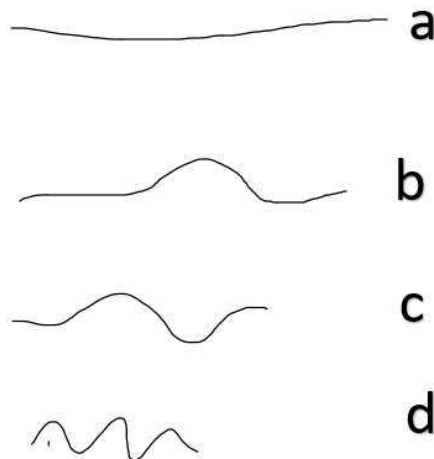
Como sequência desse trabalho, além do estudo da influência da cafeína na ligação de intercalantes à molécula de DNA, também faremos a análise da interação da cafeína ao DNA no regime de altas forças (regime entálpico).

Apêndice A: Regime entrópico

Nessa seção iremos apresentar a origem da elasticidade entrópica da molécula de DNA como sendo um efeito da flexibilidade da molécula e da maximização da entropia.

Efeito da flexibilidade e maximização da entropia

Ao ser posto em contato termodinâmico com um meio aquoso, um polímero flexível irá dobrar sobre si mesmo até atingir um estado de equilíbrio termodinâmico com o meio em que esteja imerso. Isso acontece devido aos choques das moléculas, que constituem o meio aquoso, ao longo da cadeia do polímero. Devido a flexibilidade do polímero, a intensidade dos choques sofridos em uma dada porção do polímero, faz com que essa parte se mova, saindo da conformação retilínea original se expandindo nas outras dimensões possíveis. Uma vez que o comprimento de contorno do polímero é fixo, esses choques fazem com que as extremidades da cadeia se aproximem uma da outra até que o polímero atinja uma conformação tal que os choques não sejam mais capazes de alterar a posição média das suas extremidades, caracterizando assim o equilíbrio termodinâmico. Na figura A1 mostramos esse efeito.



A 1-Elasticidade Entrópica de um polímero: (a) -Polímero inicialmente esticado. (b) -(c)- Polímeros sofrendo choques com o meio em que está inserido. (d) -Polímero em conformação de equilíbrio.

Para que o polímero volte a ter uma conformação retilínea, será necessário aplicar uma força \vec{f} capaz de compensar o efeito dos choques com as partículas do meio, separando assim suas extremidades. Na figura A 2 mostramos a aplicação dessa força.



A 2: Elasticidade entrópica: para manter o polímero estirado, é necessário aplicar uma força \vec{f} às suas extremidades.

Ao cessar a força \vec{f} o polímero retorna a sua posição de equilíbrio termodinâmico (figura A1-d). Podemos então atribuir uma força \vec{f}_e como sendo responsável por levar o polímero novamente a posição de equilíbrio toda vez que a distância entre as suas extremidades forem maior do que a distância do conjunto de conformações em equilíbrio. De um ponto de vista simplório, podemos imaginar o polímero como uma mola que após ser esticada retorna a sua posição de equilíbrio, porém, a força restauradora (\vec{f}_e) nesse caso não é oriunda da energia potencial armazenada nas ligações entre os átomos de um material estático (como no caso de uma mola simples), mas é fruto da interação do polímero com as moléculas do meio no qual ele está inserido, atribuindo ao polímero uma certa elasticidade entrópica, cujo papel é o de manter o polímero em uma de suas conformações de equilíbrio.

A origem desse comportamento elástico do polímero pode ser entendida ao olharmos para sua entropia S .

$$S = K_b \ln \Omega,$$

onde Ω representa o número de conformações acessíveis ao polímero.

Note que quando a distância entre as extremidades do polímero for igual ao seu comprimento de contorno, ou seja, o polímero se encontra em uma conformação retilínea, existirá somente uma conformação possível, de modo que $\Omega = 1$ e $S = 0$.

Quando a distância entre as extremidades do polímero for menor que seu comprimento de contorno, existirá um conjunto de conformações (Ω) possíveis que geram essa distância. Esse conjunto será tão maior quanto menor for a distância entre as extremidades do polímero. Neste caso $\Omega \gg 1$ e $S > 0$.

Pelo princípio da maximização da entropia, um sistema termodinâmico atinge seu estado de equilíbrio somente quando S é máximo. Assim, após ser estirado, para retornar ao estado de equilíbrio, o polímero irá maximizar o número de conformações possíveis para seus segmentos internos aproximando suas extremidades uma da outra.

A força restauradora \vec{f}_e , responsável por aproximar as extremidades do polímero, é frequentemente denominada como força entrópica de recuo, na figura 4.10

da seção 4.3.2 a denominamos como \vec{F}_{DNA} . Podemos²¹ estimar \vec{f}_e através da energia livre do sistema F:

$$F = K_b T \ln Z$$

onde Z representa a função de partição da energia do polímero.

²¹ Para estimar \vec{f}_e a partir de F é necessário utilizar um modelo (por exemplo o modelo WLC, seção 3.3.4).

Referências bibliográficas

- [1] J. W. Daly, "Caffeine analogs: Biomedical impact," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 64, no. 16, pp. 2153–2169, 2007.
- [2] J. Sawynok, A. R. Reid, and B. B. Fredholm, "Caffeine reverses antinociception by amitriptyline in wild type mice but not in those lacking adenosine A1 receptors," *Neurosci. Lett.*, vol. 440, no. 2, pp. 181–184, 2008.
- [3] B. Schmidt, R. S. Roberts, P. Davis, L. W. Doyle, K. J. Barrington, A. Ohlsson, A. Solimano, and W. Tin, "Caffeine Therapy for Apnea of Prematurity," *N. Engl. J. Med.*, vol. 354, no. 20, pp. 2112–2121, 2006.
- [4] R. B. Lipton, W. F. Stewart, R. E. Ryan, J. Saper, S. Silberstein, and F. Sheftell, "Efficacy and Safety of Acetaminophen, Aspirin, and Caffeine in Alleviating Migraine Headache Pain," *Arch. Neurol.*, vol. 55, no. 2, p. 210, 1998.
- [5] H. Yang, J. Rouse, L. Lukes, M. Lancaster, T. Veenstra, M. Zhou, Y. Shi, Y. G. Park, and K. Hunter, "Caffeine suppresses metastasis in a transgenic mouse model: A prototype molecule for prophylaxis of metastasis," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 21, no. 8, pp. 719–735, 2005.
- [6] O. Cauli and M. Morelli, "Caffeine and the dopaminergic system.," *Behav. Pharmacol.*, vol. 16, no. 2, pp. 63–77, 2005.
- [7] L. Maia and a De Mendonc, "Does caffeine intake protect from Alzheimer ' s disease ?," *Eur. J. Neurol.*, vol. 9, no. 4, pp. 377–382, 2002.
- [8] K. Xu, E. Bastia, and M. Schwarzschild, "Therapeutic potential of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease," *Pharmacol. Ther.*, vol. 105, no. 3, pp. 267–310, 2005.
- [9] M. Zdunek, J. Piosik, and J. Kapuscinski, "Thermodynamical model of mixed aggregation of ligands with caffeine in aqueous solution. Part II," *Biophys. Chem.*, vol. 84, no. 1, pp. 77–85, 2000.
- [10] J. Piosik, K. Wasielewski, A. Woziwodzka, W. Śledź, and A. Gwizdek-Wiśniewska, "De-intercalation of ethidium bromide and propidium iodine from DNA in the presence of caffeine," *Cent. Eur. J. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 59–66, 2009.
- [11] H. FRITZSCHE, H. Lang, and H. Spiunz, "ON THE INTERACTION OF CAFFEINE WITH NUCLEIC ACIDS. I-Y. STUDIES OF THE CAFFEINE-DNA INTERACTION BY INFRARED AND ULTRAVIOLET LINEAR DICHROISM, PROTON AND DEUTERON NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE," *Biophys. Chem.*, vol. 11, pp. 121–131, 1980.
- [12] V. I. Poltev, T. I. Grokhlina, A. Deriabina, and E. González, "Caffeine interactions with nucleic acids. Molecular mechanics calculations of model systems for explanation of mechanisms of biological actions," in *Theoretical Chemistry Accounts*, 2003, vol. 110, no. 6, pp. 466–472.

- [13] A. Ashkin, "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 24, no. 4, pp. 156–159, 1970.
- [14] A. Ashkin and J. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria," *Science (80-.)*, vol. 235, no. 4795, pp. 1517–1520, 1987.
- [15] A. Mazolli, P. A. Maia Neto, and H. M. Nussenzveig, "Theory of trapping forces in optical tweezers," *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 459, no. 2040, pp. 3021–3041, 2003.
- [16] P. A. Maia Neto and H. M. Nussenzveig, "Theory of optical tweezers," *Eur. Lett.*, vol. 50, pp. 702–708, 2000.
- [17] P. S. Alves and M. S. Rocha, "Videomicroscopy calibration of optical tweezers by position autocorrelation function analysis," *Appl. Phys. B Lasers Opt.*, vol. 107, no. 2, pp. 375–378, 2012.
- [18] H. Faxen, "The resistance against the movement of a rigour sphere in viscous fluids, which is embedded between two parallel layered barriers," *Ann. Phys.*, vol. 68, pp. 89–119, 1922.
- [19] J. F. Marko and E. D. Siggia, "Stretching DNA," *Macromolecules*, vol. 28, no. 26, pp. 8759–8770, 1995.
- [20] J. D. Watson and F. H. C. Crick, "Molecular structure of nucleic acids," *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, 1953.
- [21] M. Tager, "Nucleic Acid," *Yale J. Biol. Med.*, vol. 20, no. 1, p. 133, 1947.
- [22] J. Bath and A. J. Turberfield, "DNA nanomachines," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 5, pp. 275–284, 2007.
- [23] D. W. Ussery, "DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families," in *Encyclopedia of Life Sciences*, 2002.
- [24] T. A. Kunkel, "DNA Replication Fidelity," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 17, pp. 16895–16898, 2004.
- [25] M. S. Rocha, *Interações DNA-ligantes: propriedades mecânicas e físico-químicas*. 2012.
- [26] J. Sawynok, "Caffeine and pain," *Pain*, vol. 152, no. 4, pp. 726–729, 2011.
- [27] B. B. Fredholm, "Adenosine, Adenosine Receptors and the Actions of Caffeine," *Pharmacol. Toxicol.*, vol. 76, no. 2, pp. 93–101, 1995.
- [28] A. Nehlig, "Effects of coffee/caffeine on brain health and disease: What should I tell my patients?," *Pract. Neurol.*, vol. 16, no. 2, pp. 89–95, 2016.
- [29] D. Shi, W. L. Padgett, and J. W. Daly, "Caffeine analogs: Effects on ryanodine-sensitive calcium-release channels and GABAA receptors," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 23, no. 3, pp. 331–347, 2003.
- [30] E. G. de Mejia and M. V. Ramirez-Mares, "Impact of caffeine and coffee on our health," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 25, no. 10, pp. 489–492, 2014.

- [31] H. Kimura and T. Aoyama, "Decrease in sensitivity to ethidium bromide by caffeine, dimethylsulfoxide or 3-aminobenzamide due to reduced permeability," *J. Pharmacobiodyn.*, vol. 12, no. 10, pp. 589–95, 1989.
- [32] P. A. Bolotin, S. F. Baranovsky, and M. P. Evstigneev, "Spectrophotometric investigation of the hetero-association of Caffeine and thiazine dye in aqueous solution," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 64, no. 3, pp. 693–697, 2006.
- [33] J. Piosik, A. Gwizdek-Wisniewska, K. Ulanowska, J. Ochocinski, A. Czyz, and G. Wegrzyn, "Methylxanthines (caffeine, pentoxifylline and theophylline) decrease the mutagenic effect of daunomycin, doxorubicin and mitoxantrone," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 52, no. 4, pp. 923–926, 2005.
- [34] M. P. Evstigneev, V. P. Evstigneev, and D. B. Davies, "NMR investigation of the effect of caffeine on the hetero-association of an anticancer drug with a vitamin," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 432, no. 1–3, pp. 248–251, 2006.
- [35] L. H. Fritzsche H., Petri I., Schutz H., Weller K., Sedmera P., "On the interaction of caffeine with nucleic acids. III. ¹H NMR studies of caffeine- 5'-adenosine monophosphate and caffeine-poly(riboadenylate) interactions," *Biophys. Chem.*, vol. 11, pp. 109–119, 1980.
- [36] M. Lyles, "CAFFEINE AND OTHER XANTHINES AS CYTOCHEMICAL BLOCKERS AND REMOVERS OF HETEROCYCLIC DNA INTERCALATORS FROM CHROMATIN," *Cell Biol. Int.*, vol. 26, no. 2, pp. 145–154, 2002.
- [37] R. J.J., "in: Caffeine," *Springer-Verlag*, vol. 12, pp. 239–242, 1984.
- [38] T. H. Tomita K, "Caffeine enhancement of the effect of anticancer agents on human sarcoma cells," *Jpn J Cancer Res*, vol. 80, pp. 83–88, 1989.
- [39] T. L. Beetham KL, Busse PM, "Synergistic killing of HeLa cells by hydroxyurea and caffeine," *J Cell Physiol.*, vol. 115, no. 3, pp. 283–290, 1983.
- [40] H. Lang, "Der einfluss von coffein auf das schmelzverhalten," *FEBS LE'ITERS*, vol. 18, no. 1, pp. 5–8, 1971.
- [41] M. S. Rocha, "Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate DNA interactions with drugs and proteins in single molecule experiments," *Integr. Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 967–986, 2015.
- [42] C. P. S. and A. Sancar, "Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no. 9, pp. 3522–3525, 1990.
- [43] V. M. Borodina, E. E. Kirianova, O. V. Fedorova, and A. V. Zelenin, "Cytochemical properties of interphase chromatin condensed as a result of treatment with caffeine," *Exp. Cell Res.*, vol. 122, no. 2, pp. 391–394, 1979.
- [44] A. C. M. Et, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, 2nd ed. 1986.
- [45] S. B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamante, "Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double- stranded and single-stranded DNA molecules," *Science (80-)*, vol. 271, no. 5250, pp. 795–799, 1996.

- [46] E. F. S. and M. S. R. W. F. P. Bernal, "Unraveling the physical chemistry and the mixed binding modes of complex DNA ligands by single molecule stretching experiments," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 107, pp. 105631–105637, 2016.
- [47] and M. S. R. L. A. Reis, E. B. Ramos, "DNA Interaction with Diaminobenzidine Studied with Optical Tweezers and Dynamic Light Scattering," *J. Phys. Chem. B*, vol. 46, no. 117, pp. 14345–14350, 2013.
- [48] M. Falk, K. A. Hartman, and R. C. Lord, "Hydration of deoxyribonucleic acid. II. An infrared study," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 4, pp. 387–391, 1963.
- [49] A. R. C. L. MICHAEL FALK, KARL A. HARTMAN, JR., "Hydration of Deoxyribonucleic Acid. III. A Spectroscopic Study of the Effect of Hydration on the Structure of Deoxyribonucleic Acid," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 4, pp. 391–394, 1963.
- [50] S. Nafisi, F. Manouchehri, H. A. Tajmir-Riahi, and M. Varavipour, "Structural features of DNA interaction with caffeine and theophylline," *J. Mol. Struct.*, vol. 875, no. 1–3, pp. 392–399, 2008.
- [51] U. I. de Q. P. e Aplicada, "ester," *Compendium of Chemical Terminology*. [Online]. Available: <http://goldbook.iupac.org/html/E/E02219.html>. [Accessed: 26-Jun-2017].
- [52] BioSynthesis, "What is a phosphodiester bond?," *web site*. [Online]. Available: <http://www.biosyn.com/tew/What-is-a-Phosphodiester-bond.aspx>. [Accessed: 26-Jun-2017].
- [53] F. A. de P. Crisafuli, *Caracterização da interação DNA-Cisplatina usando pinça óptica e videomicroscopia*. 2012.
- [54] R. F. Bazoni., *Efeitos de Forças Externas nas Propriedades Mecânicas de Complexos DNA-ligantes*. 2016.
- [55] M. Daune, *Molecular Biophysics: Structures in Motion*, 1 ed. 1999.
- [56] M. Nutri, "Cafeína e seus efeitos sobre o desempenho dos atletas." [Online]. Available: <http://www.mundotri.com.br/2017/03/cafeina-e-seus-efeitos-sobre-o-desempenho-dos-atletas/>. [Accessed: 01-Jul-2017].