

BERENIL COMO SONDA DE MARCAÇÃO PARA MODO DE LIGAÇÃO EM PROCESSOS DE INTERAÇÃO COM DNA (CALF THYMUS)

Carla A. Vital^{1*}, Alef Denys S. Lima², Karine R. Borges³, Isis M. Figueiredo⁴, Josué C. C. Santos⁵,

- 1*. Estudante de graduação Instituto de Ciências Farmacêuticas, curso de Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (ICF-UFAL)
2. Estudante de mestrado da Universidade Federal do Rio de Janeiro – PGQu
3. Estudante de graduação do Instituto de Ciências Farmacêuticas, curso Farmácia da Universidade Federal de Alagoas (ICF-UFAL)
4. Professora do IQB-UFAL - Departamento de Química Analítica
5. Professor do IQB-UFAL - Departamento de Química Analítica

Resumo

O DNA é um dos principais alvos biomoleculares para o desenvolvimento de fármacos. Uma forma de avaliar essas interações é por meio de estudos de competição entre o fármaco e sondas fluorescentes *off-on* (como Hoescht, DAPI e Brometo de Etídio), que ao serem conjugadas com o DNA apresentam fluorescência. Um grande problema associado à utilização de tais sondas, é quando o composto a ser avaliado também emite na mesma faixa espectral, o que ocasiona interferências que prejudicam a análise emissão, bem como as constantes a ela associadas, como K_{sv} e K_b . Dessa forma, o berenil, um fármaco utilizado para tripanossomíase bovina, se mostra um interessante candidato à sonda, pois não fluorescente na sua forma livre nem quando conjugado ao DNA, mitigando o problema recorrente de interferência espectral das ondas clássicas. Além disso, seu modo de ligação é estabelecido, do tipo *groove* com o DNA em baixas concentrações, e em concentrações maiores, também pode atuar como intercalante.

Palavras-chave: Sondas espectrofluorimétricas; Interferência espectral; Interações moleculares.

Apoio financeiro: FAPEAL - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFAL

Introdução

Muitos fármacos anticancerígenas, antibióticos e antivirais exercem seus efeitos biológicos primários na replicação, reparação e transcrição, interagindo com DNA de cadeia dupla (dsDNA). Assim, essa macromolécula configura num dos principais alvos biomoleculares para o desenvolvimento de fármacos. Uma forma de avaliar essas interações é por meio de estudos de competição entre composto de interesse e sondas fluorescentes *off-on*, que não apresentam fluorescência livres, contudo emitem na presença do DNA (SILVA, 2020).

No entanto, quando o composto a ser avaliado emite fluorescência numa faixa espectral entre $400 < \lambda_{m\acute{a}x} < 640$ nm, a utilização de sondas comerciais, tais como DAPI (λ_{em} 420-540 nm), Hoeschst 33258 (λ_{em} 410-500 nm) e Tioflavina T (λ_{em} 400-500 nm) para modo *groove* e Brometo de Etídio (λ_{em} 560-640 nm), Acridina Orange (λ_{em} 510- 550 nm), Berberina (λ_{em} 500-530 nm) e Tiazol Orange (λ_{em} 500-540 nm) para modo intercalante, se torna inadequada devido à presença de interferências espectrais. Assim, a utilização do berenil (BE) como sonda de marcação para processos de interação com DNA se torna atraente, uma vez que seu uso como tal ainda não foi explorado e este não apresenta fluorescência livre ou ligado ao DNA, o que evita possíveis interferências.

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar as interações entre berenil com DNA (Calf thymus), a fim de padronizar condições em que esta molécula possa ser usada como sonda de marcação para modo de ligação em processos de interação com DNA. Para que esta sonda possa ser usada como marcador de sulcos menores em DNA é necessário avaliar de forma quantitativa e sistemática os vários aspectos da interação berenil-DNA, determinando os valores das constantes de ligação (K_b), de Stern-volmer (K_{sv}), por meio de experimentos de fluorescência molecular e espectros de UV-vis. Além disso, serão avaliadas as melhores condições experimentais como (concentração, tampão, força iônica), bem como experimentos para avaliar a interação berenil-DNA na presença de outras sondas conhecidas para *groove* e intercalação.

Metodologia

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico de pureza, descartando futuras etapas de purificação. Para preparo de soluções estoque foi utilizada água ultrapura (condutividade elétrica $< 0,1 \mu S cm^{-1}$) obtida a partir do purificador OS10LXE(Gehaka).

Para o preparo da solução tampão, foram solubilizados aproximadamente 0,6 g de Tris Base (10 mM) em 500 mL de água ultrapura, e posteriormente ajustado pH para 7,4 com pequenas alíquotas de ácido clorídrico.

O DNA sadio (Calf thymus, ctDNA) tipo I, obtido na forma de fibras do timo do bezerro (Sigma-Aldrich) sendo empregado nos estudos de interação. Posteriormente, foi pesado 1 mg de DNA *Calf thymus* (ctDNA) tipo I, para cada 2 mL do tampão Tris-HCl, submetendo a solução à agitação magnética por aproximadamente 24h (SHAHABADI; MOGHADAM, 2012). Após 24h, a solução foi levada a um banho de ultrassom (Quimis modelo Q335D, Brasil), por 30 min, para garantir uma melhor solubilidade do DNA e conseqüentemente a homogeneidade da solução (SAVARIZ et al., 2014). Findado o processo, a solução foi armazenada sob refrigeração a 4°C. O DNA utilizado foi o Calf thymus devido à similaridade entre a proporção de pares de bases nitrogenadas do DNA do timo do bezerro e da placenta humana.

A concentração da solução estoque de ctDNA foi determinada com base no coeficiente de extinção de 6600 L mol^{-1} , após diluição na proporção de 1:100, que relaciona a razão das absorvâncias em 260 e 280 nm, a região em que o DNA absorve, obtendo valores entre 1,8-1,9 (SHAHABADI; HADIDI, 2012).

Nos estudos de interação para avaliar o efeito da concentração de DNA no meio, realizou-se ensaios de competição das sondas avaliadas frente ao berenil. Para isso, fixou-se a concentração de cada sonda em $1 \mu\text{M}$ e do ctDNA (5, 10, 20, 30 e $30 \mu\text{M}$ de excesso) e para cada sistema ctDNA-sonda adicionou-se quantidades crescentes de berenil (de 0,1 a $30 \mu\text{M}$), monitorando a variação da intensidade nos espectros de emissão de fluorescência.

Para avaliar a interferência da força iônica na interação entre o berenil e o complexo ctDNA-sonda, realizou-se titulações espectrofluorimétricas com berenil, adicionando NaCl (50, 100 e $150 \mu\text{M}$) aos sistemas fixando a proporção [1:10] [sonda-ctDNA].

Nos ensaios com a cloroquina, um composto preferencialmente intercalante, e que apresenta fluorescência intrínseca (BOLTON, 1981), foram realizados a partir de três titulações espectrofluorimétricas sob diferentes condições, mantendo-se fixa a concentrações do ligante (cloroquina $10 \mu\text{M}$ e berenil $20 \mu\text{M}$), e variando a do ctDNA (10, 20, 40, 60, 80, 100 e $120 \mu\text{M}$). Posteriormente, foram efetuados os ensaios de força iônica, mantendo o mesmo sistemas e variando as concentrações de NaCl de 0, 50, 100 e 150 mM , verificando se salinidade no meio alterava a interação dos compostos com o ctDNA.

As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Shimadzu RF (5301PC, Japão) equipado com uma lâmpada de xenônio, utilizando uma cubeta de quartoz com capacidade para 2,0 mL, transparência na faixa de 220 a 900 nm e com 10 mm de caminho óptico.

As medidas espectrofotométricas foram feitas no espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (AJX-6100PC, Brasil) com dois compartimentos para referência e amostra, utilizando-se cubetas de quartz de 10 mm de caminho óptico e capacidade para 4,0 mL de solução.

As medidas de pH foram executadas em um eletrodo combinado de vidro associado ao pH-metro Gehaka (PG 1800, Brasil). Para a pesagem das massas dos reagentes foram utilizadas as balanças analíticas Mettler Toledo (AG245, Switzerland) com precisão de $\pm 0,01 \text{ mg}$ e Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de $\pm 0,1 \text{ mg}$. O tratamento dos dados obtidos dos experimentos foi realizado no software Origin Lab Graphing & Data Analysis 9.0.

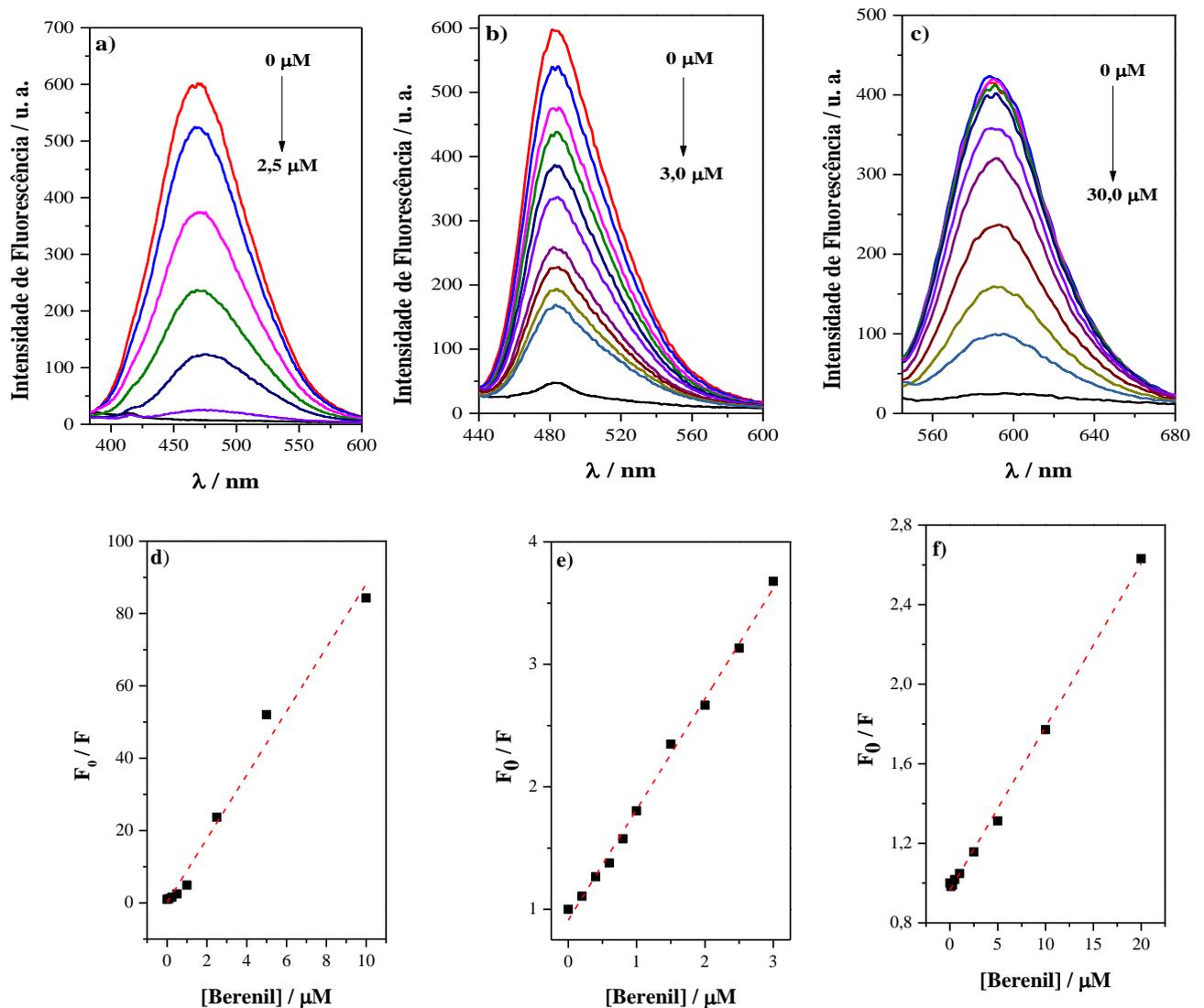
Após a aquisição dos dados, todos os resultados foram tratados empregando o programa Origin Lab versão 9.0 (Northampton, USA) e o Excel 2016 (Microsoft Office), onde foi possível obter informações para o cálculo dos parâmetros de ligação dos compostos ao ctDNA (K_{sv} e K_b).

Resultados e Discussão

Após a otimização dos parâmetros reacionais — concentração dos ligantes, proporções do complexo ctDNA-sonda e instrumentais (comprimento de onda de excitação) — foram realizadas titulações espectrofluorimétricas com ctDNA, excitando cada sonda no comprimento de onda de máxima absorção reportado na literatura, fixando a concentração de cada molécula em $1 \mu\text{M}$ e variando a concentração de ctDNA no meio de 0 a $40 \mu\text{M}$.

Para cada sonda escolhida, fez-se o estudo do efeito da concentração de ctDNA no complexo ctDNA-sonda através de ensaios de competição com o berenil. Uma vez que cada sonda interage de forma diferente com a macromolécula, é possível mensurar a afinidade do berenil ao ctDNA em função da competição pelos sítios de ligação e observar como a concentração de DNA influencia nestas interações. Além disso, houve similaridade dos resultados entre hoechst 33258 (HO) e DAPI e entre brometo de etídio (EB) e as demais sondas, de forma que HO, TT e EB serão utilizados como modelos para apresentação dos resultados (figura 1a, 1b, 1c).

Figura 1. a), b) e c) Espectros de fluorescência obtidos a partir de adições crescentes de berenil (0 a 30 μM) para HO, TT e EB respectivamente; **d), e) e f)** curvas de linearização.



Fonte: elaborado pelo autora, 2020.

Os resultados quantitativos foram avaliados através das constantes de Stern-Volmer, obtidas pelas curvas de linearização (figura 1d,1e,1f). observou-se que ao se adicionar quantidades crescentes de berenil aos sistemas, houve uma diminuição gradativa na intensidade de emissão de fluorescência, visto que a concentração do complexo berenil-ctDNA passou a estar em maior proporção em solução comparado ao complexo sonda-ctDNA, fornecendo indícios de que o berenil estaria interagindo de maneira análoga às sondas clássicas. Esse fenômeno indica que houve a interação entre o berenil e o DNA, formando um complexo não fluorescente e uma vez que o berenil não apresenta fluorescência, este é o agente *quencher*.

A partir dos dados de K_{sv} , é possível afirmar que o berenil interagiu com o ctDNA e deslocou todas as sondas avaliadas, uma vez que os valores variam na ordem de 10^6 . Tal resultado está em concordância com os estudos de Pilch e colaboradores (1995), que identificaram a possibilidade do berenil interagir com o DNA via *groove* ou por intercalação. Além disso, como é mostrado nos estudos de Williams e colaboradores (2012), a intercalação corresponde a apenas 24% do mecanismo geral de ligação do berenil, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, já que para as sondas *groove* a concentração de berenil necessária para deslocar os ligantes foi em média 3 μM e para as sondas intercalantes foi necessária a adição de 30 μM de berenil para que houvesse uma diminuição considerável do sinal de fluorescência.

Já nos testes de força iônica, o berenil apresentou uma redução do K_{sv} e medida que foi adicionado NaCl

ao sistema, apesar disso, a constante ainda foi bastante expressiva da ordem de 10^5 , sugerindo que não houve alteração ou impedimento do modo de ligação nos ensaios, essa redução estaria associado ao fato do berenil ser um composto dicatiônico de forma que a presença de sais em solução, como NaCl, podem interferir no processo de interação com o DNA.

Conclusões

O berenil apresentou resultados satisfatórios frente às sondas comumente utilizadas em estudos de interação DNA-ligante, uma vez que a magnitude dos valores de K_{sv} referentes aos ensaios de competição com tais ligantes foi da ordem de 10^6 L mol⁻¹.

Além disso, foi verificada a dualidade no comportamento do berenil quanto ao seu modo de ligação ao DNA, de forma que seu mecanismo de interação está relacionado com sua concentração no meio. Assim, observou-se que para ligantes preferencialmente *groove*, quanto maior a proporção de DNA no sistema, maior é a supressão de fluorescência decorrente da adição de até 3,0 μ M de berenil, em contraste com o observado para as sondas intercalantes que na presença de maiores excessos de DNA houve a redução dos valores de K_{sv} , sendo 10 vezes maior a concentração necessária para a diminuição efetiva do sinal de emissão. Esses resultados são sustentados por trabalhos anteriores, que descrevem a maior porcentagem do mecanismo de interação supramolecular do berenil como sendo via *groove* menor e apenas uma pequena contribuição do modo via intercalação (24%). Esse modo de interação preferencial estaria relacionado a uma maior afinidade a regiões ricas em adenina-timina, correspondentes aos sulcos menores do DNA.

A partir da avaliação do efeito da força iônica, através da adição de NaCl ao meio, observou-se que a salinidade no meio interfere na magnitude da supressão de fluorescência, contudo não altera o modo de ligação do berenil frente às sondas.

Dessa forma, o uso do berenil como sonda de marcação para modo de ligação de pequenas moléculas ao DNA é uma alternativa promissora que ainda não foi reportada na literatura, evidenciando assim a importância de trabalhos como esse.

Além dos ensaios com as sondas clássicas *off-on*, o berenil também se mostrou capaz de deslocar a cloroquina — um antimalárico, também utilizado em doenças autoimunes — do seu sítio intercalante. Esse fármaco, ao contrário das sondas clássicas, fluoresce na sua forma livre, no entanto, ao ser conjugado com o DNA tem sua fluorescência suprimida. Nestes ensaios o berenil apresentou K_{sv} da ordem de 10^4 , de forma que foi observado um aumento da fluorescência da cloroquina na presença do Berenil, corroborando a competição pelo mesmo sítio de interação e, portanto, aumentando a fração livre do antimalárico, responsável pelo aumento da fluorescência do sistema.

Referências bibliográficas

BOLTON, P. H. et al. Interaction of the Antimalarial Drug Fluoroquine with DNA, tRNA, and Poly(a): 19F-NMR Chemical Shift and Relaxation, optical absorption, and fluorescence studies. **Biopolymers**, Califórnia, v.20, p. 435-449, 1981.

PILCH, d. s. et al. Berenil binding to dna duplexes and rna duplex: evidence for both intercalative and minor groove binding properties. **Biochemistry**, v. 34, p. 9962-9976, 1995.

SAVARIZ, F.C. et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carbolines and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p.6867–6875, Out., 2014.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Iran, v. 96, p. 278–283, Mai., 2012.

SHAHABADI, N.; MOGHADAM, N. H. Determining the mode of interaction of calf thymus DNA with the drug sumatriptan using voltammetric and spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Irã, v. 99, p. 18- 22, Dez., 2012.

SILVA, Marina Magalhães. Estudos geofísicos aplicados no mapeamento da interação entre compostos biologicamente ativos e macromoléculas. **Tese de doutorado – Química analítica- Universidade Federal de Alagoas**, Maceió. p. 23, 2020.

WILLIAMS, A. K. et al. Determination of the drug-DNA binding modes using fluorescence-based assays. **Analytical biochemistry**, v. 422, p. 66-73. Mar., 2012.