

## Estudo de DNA por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Elisa Garcia Pereira, Cilaine Verônica Teixeira  
Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### Objetivo

Caracterizar estruturas formadas por DNA linear com o lipídio brometo de dimetil dioctadecil amônio (DDAB), visando neutralizar a carga do DNA sem formar lipossomos.

### Introdução

A fim de realizar a transfecção de DNA em células eucarióticas necessitamos de um veículo de transfecção. Este veículo deve neutralizar a carga do DNA, uma vez que tanto ele quanto membranas fosfolipídicas de células são carregados negativamente.

Com base em estudos anteriores [1] escolhemos utilizar o lipídio brometo de dimetil dioctadecil amônio (DDAB) como veículo de transfecção.



Figura 1: Estrutura do DDAB. Fonte: [2]

Para estudar o comportamento da mistura do DNA com DDAB utilizamos fragmentos de DNA, com tamanhos que variam entre 400 e 700 pares de base.

Essas estruturas podem ser observadas por AFM (*Atomic force microscopy*), que nos permite ver diretamente a sua forma e medir seu tamanho aproximado.

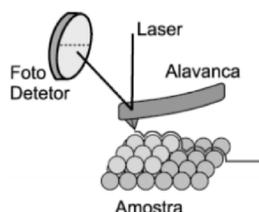


Figura 2: Princípio de funcionamento do AFM. Fonte:[3]

O AFM é um método que interpreta as forças e interações entre a amostra e a sonda. A atração ou repulsão entre elas é analisada através de um laser que é defletido pela sonda e monitorado por um detector (*Figura 2*).

O modo de contato intermitente (*tapping mode*), no qual a sonda oscila sobre a amostra, tendo assim uma resolução de aproximadamente  $1nm$  e sem danificar a superfície. Esse modo permite a utilização de Microscopia de Contraste de Fase (PCM) que parte do princípio de que diferentes materiais causam diferentes interações sonda-amostra e, portanto, alteram a fase de oscilação da sonda.

A imagem que reproduz a altura da amostra fornece informação sobre o tamanho e a conformação das estruturas, enquanto que a fase indica a presença de materiais diferentes. As duas imagens juntas permitem a caracterização da amostra depositada.

### Resultados Experimentais

As amostras observadas são apresentadas a seguir, junto com as imagens obtidas: Observamos primeiro o DNA puro:

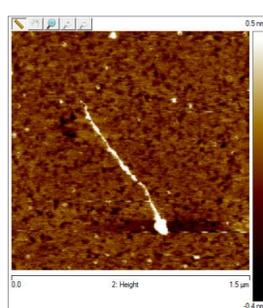


Figura 3: Topografia: 10 ng de DNA puro sobre a mica.

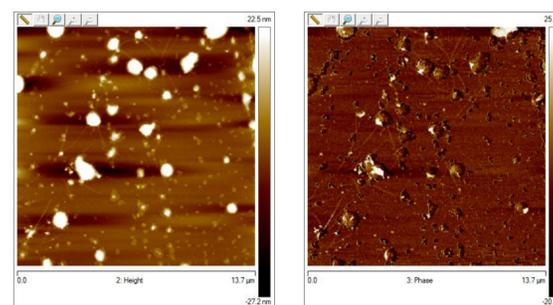


Figura 4: Amostra de DNA com DDAB. Razão DDAB:DNA = 1,325:1, em ng. Imagem da esquerda: Topografia. Imagem da direita: Fase. As esferas grandes podem indicar agregados formados por DDAB e DNA. As estrias podem corresponder a fragmentos de DNA linearizado. Os esferoides obtidos são formados provavelmente por excesso de DDAB na solução e podem ser tóxicos [1].

Figura 5: Imagem de topografia de amostra de DNA com DDAB, razão 0,6625:1 DDAB:DNA em ng. Aglomerados e um filamento que associamos a um DNA neutralizado pelo DDAB, já que este necessita estar associado com alguma molécula de carga positiva para que se ligue à mica. Como pode-se observar muito pouco DNA ligado à mica, e este se liga à mica apenas na presença de cargas positivas (no caso do DDAB), parece que a quantidade de DDAB adicionada não é suficiente para se ligar e neutralizar todo o DNA. (Escala 551,2 nm)

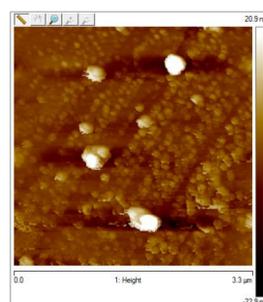
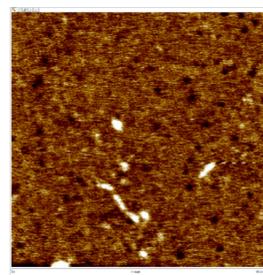


Figura 6: Imagem de topografia de amostra de DNA com DDAB. Razão DDAB: DNA de 1,06:1 em ng. Observamos vários aglomerados, notavelmente menores que no procedimento 1, e não observamos as "estrias".

Os resultados obtidos até o momento indicam que a maior concentração utilizada (2,65 ng de DDAB:2 ng de DNA) tem excesso de DDAB, e forma grandes agregados, o que não é desejável. A concentração menor usada (1,325 ng de DDAB: 2 ng DNA) parece não formar agregados, porém parece não ser suficiente para se ligar ao DNA presente. No entanto, a imagem não é conclusiva. Na concentração intermediária os agregados formados são menores, mas não observamos as "estrias", que seriam o DNA linear ligado ao DNA. É possível que haja fragmentos de DNA não ligados ao DDAB, mas como o DNA puro não se fixa à mica, esses fragmentos não podem ser observados.

Em continuação, faremos cálculos teóricos de otimização das concentrações utilizadas, e investiremos na utilização da técnica experimental para reprodução dos cálculos, onde o desafio maior será obter a aderência do DNA complexado ao substrato de mica.

Agradecemos a Bárbara Canto, pela operação do AFM e treinamento.

### Referências

- [1] A. von Groll, "Lipídios catiônicos anfífilos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfecção in vitro de células eucarióticas", Dissertação de Mestrado. UFRGS (2003)
- [2] G.A.T. Kaminski, "Desenvolvimento de lipossomos revestidos por bipolímeros a fim de controlar a cinética de liberação proteica", Dissertação de Mestrado. UFPR (2013)
- [3] Scanning probe microscopy: an introduction, [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0366-69131998000600002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-69131998000600002) ultimo acesso em 24/04/2018