

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 16/12/2023

Nayara Sousa de Alcântara Contessoto

Estudos biofísicos moleculares e celulares na
presença do composto anticâncer
(Piperlongumina) utilizando microscopia de
força atômica e técnicas espectroscópicas

Departamento de Física

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

São José do Rio Preto - SP

2021

Nayara Sousa de Alcântara Contessoto

**Estudos biofísicos moleculares e celulares na presença do
composto anticâncer (Piperlongumina) utilizando microscopia de
força atômica e técnicas espectroscópicas**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq - Proc. 141714/2017-4 e 163893/2018-7

Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

Coorientadora: Profa. Dra. Ching-Hwa Kiang

São José do Rio Preto - SP

2021

C761e Contessoto, Nayara Sousa de Alcântara
Estudos biofísicos moleculares e celulares na presença do composto anticâncer (Piperlongumina) utilizando microscopia de força atômica e técnicas espectroscópicas / Nayara Sousa de Alcântara Contessoto. -- São José do Rio Preto, 2021
125 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Marinônio Lopes Cornélio
Coorientadora: Ching-Hwa Kiang

1. Microscopia de Força Atômica. 2. Células HeLa. 3. Piperlongumina. 4. Espectroscopia de Força. 5. Espectroscopia de Fluorescência. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nayara Sousa de Alcântara Contessoto

**Estudos biofísicos moleculares e celulares na presença do
composto anticâncer (Piperlongumina) utilizando microscopia de
força atômica e técnicas espectroscópicas**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq - Proc. 141714/2017-4 e 163893/2018-7

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
UNESP – São José do Rio Preto - SP
Orientador

Profa. Dra. Natália Bueno Leite Slade
UFTM – Uberaba - MG

Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey
UNESP – São José do Rio Preto - SP

Prof. Dr. Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes
UFRJ – Rio de Janeiro - RJ

Prof. Dr. Luís Guilherme Mansor Basso
UENF – Rio de Janeiro - RJ

São José do Rio Preto - SP

16 de Dezembro de 2021

*Dedico esta tese à minha família,
em especial ao meu filho amado Enrico Alcântara Contessoto.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

Ao Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio pela orientação e ensinamentos.

To Prof. Dr. Ching-Hwa Kiang for having me in her group, being my co-advisor, and all knowledge.

Aos integrantes da banca Profa. Dra. Natália Bueno Leite Slade, e Profs. Drs. Bruno de Almeida Carlos de Carvalho Pontes, Luís Guilherme Mansor Basso e Marcelo Andrés Fossey pela presença e contribuições.

À todos pesquisadores colaboradores, em especial aos Drs. Daniel Pereira Bezerra e José Maria Barbosa Filho; e às Dras. Sonia Maria Oliani e Eloiza Helena Tajara pela coordenação da colaboração.

To research collaborator Dr. Ian Lian.

To Rice University friends, group members, and employees which helped me in so many different ways during my period in Houston.

Aos colegas do departamento e à Unesp pelo acolhimento e infra-estrutura fornecida; ao programa de pós-graduação em Biofísica Molecular.

Aos servidores e docentes do Departamento de Física pela atuação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) pela bolsa de doutorado.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais, Rosali e Amaurício, e irmãos, Felipe e Rafael, pelo incentivo, dedicação, educação e carinho.

Ao meu esposo Vinícius, meu amor, pelo carinho, amizade, compreensão, paciência, incentivo e apoio.

Ao meu filho Enrico, meu presente de Deus, pelo amor mais puro que eu conheci.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com a realização deste trabalho.

"Em todas as circunstâncias, dai graças..."

(1 Tessalonicenses 5:18)

Resumo

Compostos naturais apresentam grande potencial na pesquisa anticâncer, pela inibição do crescimento do tumor, pelas propriedades anti-metastáticas e anti-inflamatórias. A piperlongumina (PL) é um dos compostos naturais que tem se destacado. PL apresenta informações físico-químicas propícias que sugerem a possibilidade de ser carregada até seu alvo, através do plasma sanguíneo pela proteína HSA (albumina do soro humano) [1]. No presente estudo, investigamos as influências biofísicas deste composto em dois níveis: molecular e celular.

Nas análises de biofísica molecular, monitoramos a supressão do espectro de emissão de fluorescência do peptídeo Ac₂₋₂₆ da proteína Anexina A1, a qual atua como um mediador endógeno anti-inflamatório, durante titulações com PL. Entender como os componentes envolvidas em processos inflamatórios atuam e se interagem, a fim de potencializar seus efeitos, é importante dado que a inflamação crônica contribui para um microambiente suscetível à tumorigênese, favorecendo o desenvolvimento e progressão do câncer [2,3]. Nesta parte do trabalho foram obtidas informações energéticas, as quais indicaram a interação espontânea entre o peptídeo Ac₂₋₂₆ e PL, a qual é dirigida por forças não-específicas. Tal informação motivou a colaboração para investigar os efeitos na proliferação e migração celular (células HUVEC e HEP-2) e na expressão gênica de mediadores inflamatórios [2,3].

Nas análises de biofísica celular, utilizando espectroscopia de força de célula única baseada em Microscopia de Força Atômica (AFM), caracterizamos as propriedades de células HeLa em tratamento com PL. Estudos anteriores mostraram efeitos anticâncer nas células HeLa por PL [4-6]. No entanto não se sabe dos efeitos mecânicos deste sistema (PL-HeLa). Utilizamos AFM e obtivemos as curvas força-distância que mostraram padrões graduais. Analisamos a força do passo (SF) e observamos que as células tratadas com PL apresentam um valor maior de SF em comparação com as células controle. Este aumento de SF também foi observado em experimentos realizados em substratos com rigidez crescente. Portanto, os efeitos de PL nas propriedades mecânicas das células HeLa podem ser refletidos no parâmetro mensurável SF. Tais fatores mecânicos podem estar relacionados à tensão e flexibilidade da membrana [7-9]. A compreensão da influência de fármacos nas propriedades mecânicas das células pode ajudar no rastreamento de drogas

terapêuticas eficazes contra o câncer.

Palavras-chave: Microscopia de Força Atômica, Células HeLa, Piperlongumina, Espectroscopia de Força, Espectroscopia de Fluorescência, Força de Passo, AFM, Piplartina, Anexina A1 (Ac₂₋₂₆).

Abstract

Natural compounds have great potential in anticancer research by inhibiting tumor growth, anti-metastatic and anti-inflammatory properties. Piperlongumine (PL) is one of the natural compounds that has attracted attention. PL presents favorable physicochemical information that suggests the possibility of being carried to its target through the blood plasma by the HSA protein (human serum albumin) [1]. In the present study, we investigate the biophysical influences of this compound at molecular and cellular levels.

In molecular biophysical analyses, we monitored the suppression of the fluorescence emission spectrum of the Ac₂₋₂₆ peptide of the Annexin A1 protein, which acts as an endogenous anti-inflammatory mediator, during titrations with PL. Understanding how the components involved in inflammatory processes act and interact in order to potentiate their effects is important since chronic inflammation contributes to a microenvironment susceptible to tumorigenesis, favoring the development and progression of cancer [2,3]. In this part of the work, energetic information was obtained, indicating the spontaneous interaction between the peptide Ac2–26 and PL, driven by non-specific forces. This information motivated the collaboration to investigate the effects on cell proliferation, migration (HUVEC and HEp-2 cells), and gene expression of inflammatory mediators [2,3].

In cellular biophysics analyzes using single-cell force spectroscopy based on Atomic Force Microscopy (AFM), we characterized the properties of HeLa cells under PL treatment. The anti-cancer effects on HeLa cells by PL have been previously described [4–6]. Notwithstanding, there is no knowledge about the mechanical properties of this system (PL-HeLa). We used AFM and obtained the force-distance curves that showed gradual patterns. We analyzed the step force (SF) and observed that cells treated with PL had higher SF values compared to control cells. This increase in SF was also observed in experiments performed on substrates with increasing stiffness. Therefore, the effects of PL on the mechanical properties of HeLa cells can be reflected in the measurable parameter SF. Such mechanical factors may be related to the tension and flexibility of the membrane [7–9]. Understanding the influence of drugs on the mechanical properties of cells can help in screening effective cancer therapeutics drugs.

Keywords: Atomic Force Microscopy, HeLa Cells, Piperlongumine, Force Spectroscopy, Fluorescence Spectroscopy, Tether Force, Step Force, AFM, Piplartine, Annexin A1 (Ac₂₋₂₆).

Lista de Figuras

1	Câncer: Taxas mundiais de incidência e de mortalidade.	23
2	Câncer: Taxas estimadas de mortalidade mundial (mulheres x homens). . .	24
3	Estrutura química da Piperlongumina	24
4	Porcentagem da distribuição dos compostos isolados de diferentes espécies pertencentes ao gênero <i>Piper</i>	25
5	Estrutura representativa da proteína Anexina A1 (ANXA1) e ligação à membrana.	28
6	Estrutura de NMR do peptídeo Ac 2-26, derivado da proteína Anexina A1 (ANXA1).	29
7	Absorção da luz monocromática ao atravessar uma amostra.	32
8	Variação da transmitância com relação ao comprimento de caminho óptico.	33
9	Comparação dos mecanismos de supressão dinâmico e estático.	36
10	Espectro de emissão do peptídeo da ANXA1 na ausência e presença de piperlongumina.	44
11	Gráfico de Stern-Volmer.	45
12	Gráficos duplo-logarítmicos e análises de Van't Hoff da interação entre a PL e Ac ₂₋₂₆	46
13	Contribuição energética da interação entre Ac ₂₋₂₆ e piperlongumina.	48
14	Tecido epitelial com outras células e matrizes extracelulares.	51
15	Principais componentes da matriz extracelular de células animais.	52
16	Estrutura do citoesqueleto e suas principais subdivisões.	54
17	Organização estrutural dos microtúbulos.	55
18	Ciclo celular - organização estrutural dos microtúbulos (MTs).	56

19	Imagens de células Hela por microscopia óptica.	59
20	Ajuste Lorentziano para o cálculo da constante da mola.	65
21	Esboço da formação do nanotubo na membrana celular.	67
22	Representação dos passos de descongelamento à preparação da amostra de cultura celular.	71
23	Ciclo esquemático da subcultura celular.	72
24	Ciclo esquemático da subcultura celular e preparação da amostra no substrato de cultura com rigidez específica para análises no AFM.	74
25	Materiais utilizados na montagem dos substratos de cultura celular com rigidez específica.	75
26	Equipamento do AFM	77
27	Força de passo (SF, <i>step force</i>), da coleta à análise de dados.	78
28	Curva força-distância gerada pelo ciclo de aproximação e retração entre a superfície celular e o <i>cantilever</i>	79
29	Rigidezes dos tecidos.	82
30	Gráficos das distribuições da força de passo de células HeLa em função do tempo de tratamento (grupos controle e PL).	85
31	Força de passo média em função do tempo.	86
32	Gráficos das distribuições da força de passo de células HeLa em dependência da concentração de PL.	87
33	Gráficos das distribuições da força de passo de células HeLa em dependência do substrato para os grupos controle e PL.	89

Lista de Tabelas

1	Constante de supressão de Stern-Volmer e de afinidade da interação entre Ac_{2-26} e PL	47
2	Parâmetros termodinâmicos da interação PL- Ac_{2-26}	48
3	Parâmetros para análise das forças de passo no AFM.	77

Lista de Abreviaturas

Ac₂₋₂₆	Peptídeo da região N-terminal da proteína Anexina A1
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Microscopia de Força Atômica)
ANXA1	Proteína Anexina A1
ASR	<i>Age-Standardised Rate</i> (Taxa padronizada pela idade)
BM	Membrana basal, do inglês <i>basement membrane</i>
C	Controle
CAS number	Número do registro no banco de dados do <i>Chemical Abstracts Service</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>
DO	Densidade óptica
DS	<i>Deflection Sensitivity</i>
ECM	Matriz extracelular, do inglês <i>extracellular matrix</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HeLa	Henrietta Lacks – células cancerígenas
HSA	Albumina do soro humano (<i>Human Serum Albumin</i>)
MB	Membrana Basal
MM	Massa molecular
MT	Microtúbulo
Pen-Strep	<i>Penicillin – Streptomycin</i>
PL	Piperlongumina, do inglês <i>piperlongumine</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SF	<i>Step Force</i> Força de passo/degrau
SPM	Microscópio de varredura por sonda (<i>Scanning Probe Microscopy</i>)
STM	Microscópio de varredura por tunelamento (<i>Scan. Tunneling Micr.</i>)
TBA	<i>Tubulin-Binding Agent</i> (Agente de ligação à tubulina)
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
WHO	<i>World Health Organization</i> (organização mundial da saúde)

Lista de Símbolos

μM	Micromolar
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
m	Metro
pN	PicoNewton
nN	NanoNewton
kPa	KiloPascal
s	Segundo
min	Minutos
H	Horas
ml	Mililitro
μl	Micro litro
kDa	kilodalton
ΔF	<i>Step Force</i> (Força de Passo/Degrau)
ΔSF	Varição do <i>Step Force</i>
ΔG^0	Varição da energia livre de Gibbs
ΔH^0	Varição da entalpia
ΔS^0	Varição da entropia
T	Temperatura
K	Kelvin
ε	Coeficiente de extinção molar
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
K'	Constante de supressão de Stern-Volmer
K_S	Constante de supressão de Stern-Volmer (mecanismo estático)
K_{SV}	Constante de supressão de Stern-Volmer (mecanismo dinâmico)
K_q	Constante de supressão bimolecular
K_a	Constante de afinidade
k_B	Constante de Boltzmann
n	Número de sítios de interação (número estequiométrico)
R	Constante universal dos gases ideais

Q_F	Concentração do supressor livre
Q_T	Concentração do supressor total
P_T	Concentração total da proteína / peptídeo
P_F	Concentração da proteína / peptídeo livre
Q_nP	Concentração do supressor-peptídeo na interação
F	Intensidade de fluorescência da HSA na presença de piperlongumina
F_0	Intensidade de fluorescência da HSA na ausência de piperlongumina
I	Intensidade de luz transmitida
I_0	Intensidade de luz incidente
$d_{c.o.}$	Comprimento do caminho óptico
$[C]$	Concentração
$I_{transmitancia}$	Transmitância
β	Constante de Proporcionalidade
F_{corr}	Intensidade de fluorescência corrigida
F_{obs}	Intensidade de fluorescência observada
Abs	Absorbância
A_{ex}	Absorbância no comprimento de onda de excitação
A_{em}	Absorbância no comprimento de onda de emissão
I_F	Intensidade de fluorescência
n_{FE}	Número de fótons emitidos
n_{FA}	Número de fótons absorvidos
E_F	Energia do fóton
Φ_F	Rendimento quântico de fluorescência
τ	Tempo de vida de fluorescência
τ_o	Tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor
pH	Potencial hidrogeniônico
k	Constante de mola
m	Massa
ω_0	Frequência angular ressonante
F_{c-m}	Força de associação entre o citoesqueleto e a membrana
F_{g-m}	Força de associação entre o glicocálice e a membrana

F_m	Força para puxar um nanotubo composto puramente de membrana celular
f_t	Força estática
f_0	Força do nanotubo na situação de equilíbrio
δz	Deslocamento do <i>cantilever</i>
z_0	Amplitude de oscilação do <i>cantilever</i>
ρ	Pressão
γ_{c-m}	Adesão membrana-citoesqueleto
σ	Tensão superficial da membrana
σ_{AP}	Tensão aparente da membrana
κ	Constante de flexão
r	Raio do nanotubo
L	Comprimento do nanotubo
SF_∞	Força de passo extrapolada para infinito
SF_0	Força de passo extrapolada para zero
SF_m	Força de passo) média
$E_{Substrate}$	Rigidez do substrato
E_{Cell}	Rigidez da célula
E_f	Energia livre do nanotubo

Sumário

1	Organização da Tese	20
2	Introdução	22
2.1	Câncer	22
2.2	Piperlongumina	22
3	Biofísica Molecular	26
3.1	Introdução – Biofísica Molecular	26
3.1.1	Processos Inflamatórios	26
3.1.2	Anexina A1	27
3.1.3	Ac2-26 Anexina A1	29
3.2	Motivação e Objetivos – Biofísica Molecular	30
3.3	Princípios Espectroscópicos de Fluorescência	31
3.3.1	Características Gerais	31
3.3.2	Absorção de Luz e Lei de Beer-Lambert	31
3.3.3	Filtragem Interna	34
3.3.4	Supressão de Fluorescência	35
3.3.5	Termodinâmica da Interação	39
3.4	Materiais e Métodos – Biofísica Molecular	41
3.4.1	Compostos e Soluções	41
3.4.2	Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Visível	41
3.4.3	Espectroscopia de Fluorescência	41

3.5	Resultados e Discussões – Biofísica Molecular	43
3.5.1	Supressão de Fluorescência	43
3.5.2	Constantes de Afinidade	44
3.5.3	Análises Termodinâmicas	45
3.6	Conclusões – Biofísica Molecular	49
4	Biofísica Celular	50
4.1	Introdução – Propriedades Mecânicas Celulares	50
4.1.1	Células Cancerígenas	50
4.1.2	Organização Celular: Matriz extracelular	51
4.1.3	Organização Celular: Citoesqueleto	52
4.1.4	Mecânica Celular	56
4.1.5	Agentes de Ligação à Tubulina (TBA)	57
4.1.6	Células HeLa	58
4.2	Motivação e Objetivos – Biofísica Celular	60
4.3	Princípios de Microscopia de Força Atômica – Biofísica Celular	62
4.3.1	Forças nos Sistemas Biológicos	62
4.3.2	Microscópio de Força Atômica (AFM)	62
4.3.3	Teoria - AFM	63
4.3.4	Calibração da Constante da Mola	64
4.3.5	<i>Pulling</i> : afastamento após contato na superfície celular	66
4.4	Materiais e Metodologia – Biofísica Celular	70
4.4.1	Materiais e Soluções	70

4.4.2	Cultura Celular	70
4.4.3	Aparato - AFM	75
4.4.4	Medidas de Força utilizando AFM - <i>Pulling</i>	77
4.4.5	Análise da Força obtida pelo AFM	80
4.4.6	Design do Experimento HeLa-PL utilizando AFM	81
4.5	Resultados e Discussões – Biofísica Celular	83
4.5.1	Método de Validação do Protocolo	83
4.5.2	Influências da Concentração	84
4.5.3	Influências do Ambiente Extracelular	86
4.6	Conclusões – Biofísica Celular	90
5	Conclusões Gerais	91
	Referências	92
6	Anexos	106

ANEXO I - Artigo submetido referente ao trabalho da seção 4 (Biofísica Celular)

ANEXO II - Material suplementar do artigo submetido referente ao trabalho da seção 4 (Biofísica Celular)

ANEXO III - Artigo publicado referente à vertente de Biofísica Molecular: PL x HSA

ANEXO IV - Artigo publicado referente ao trabalho da seção 3 (Biofísica Molecular): PL x Ac2-26 (Anexina A1)

1 Organização da Tese

Esta tese apresenta a investigação da influência de um composto natural, Piperlongumina (PL), nos níveis moleculares e celulares, na temática de biofísica. No nível de biofísica molecular, mapeou-se as interações de PL com macromoléculas (peptídeo e proteína) utilizando espectroscopia de fluorescência. Já no nível de biofísica celular foram analisadas células cancerígenas, utilizando microscopia de força atômica.

No capítulo 2 encontra-se uma introdução da temática do câncer e do composto utilizado nos ensaios moleculares e celulares, a piperlongumina. PL vem se destacando diante suas atividades farmacológicas, dentre as quais exhibe propriedades anti-inflamatória e antitumoral [10,11].

O capítulo 3 é referente à vertente de biofísica molecular. Apresenta-se a pesquisa em colaboração com outros grupos, onde gerou-se o trabalho intitulado "*Biological and physical approaches on the role of piperlongumine (piperlongumine) in cancer*", o qual foi publicado na *Scientific Reports* (ANEXO IV - Artigo publicado referente ao trabalho da seção 3 (Biofísica Molecular): PL x Ac₂₋₂₆ (Anexina A1)) [2] e coordenado pela Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara. Neste capítulo procura-se entender e discutir a interação físico-química da piperlongumina com o peptídeo (Ac₂₋₂₆) da Anexina A1 (ANXA1) através de análises da supressão dos espectros de fluorescência. No manuscrito encontra-se: uma parte introdutória que aborda as características do sistema molecular da ANXA1; metodologia e princípios bem detalhados, dirigidos aos objetivos utilizando espectroscopia de fluorescência; os resultados e discussões das análises têm foco nos parâmetros termodinâmicos da interação Ac₂₋₂₆-PL.

Já o capítulo 4 é referente à vertente de biofísica celular, o qual encontra-se mais detalhada nesta tese. Apresenta-se, nesta seção, a pesquisa desenvolvida durante o estágio de doutoramento na *Rice University* (Houston-TX, EUA), sob supervisão da Profa. Dra. Ching-Hwa Kiang. Tal projeto gerou o trabalho intitulado "*Quantifying the Effect of Anti-cancer Compound Piperlongumine on Cancer Cells Using Single-Cell Force Spectroscopy*", o qual foi submetido para publicação na *Scientific Reports* (ANEXO I - Artigo submetido referente ao trabalho da seção 4 (Biofísica Celular) e ANEXO II

- Material suplementar do artigo submetido referente ao trabalho da seção 4 (Biofísica Celular)) [12]. Neste capítulo procura-se entender e discutir o efeito da piperlongumina nas células HeLa através de análises de curvas força-distância. Os dados obtidos são gerados diretamente pelo microscópio de força atômica (AFM), o qual possui uma sensibilidade de forças na ordem de picoNewtons. No manuscrito encontra-se: uma parte introdutória que aborda as características do sistema celular com foco na parte mecânica; metodologia e princípios bem detalhados, dirigidos aos objetivos utilizando AFM; resultados e conclusões das análises, com foco nas propriedades mecânicas da célula, mensuradas através da força de desprendimento ou ruptura do nanotubo formado entre a célula e a sonda do AFM, durante o processo de "puxar" a superfície celular.

Adicionalmente, foi finalizado o trabalho intitulado "*An investigation into the interaction between pipartine (piperlongumine) and human serum albumin*", o qual encontra-se publicado na *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (ANEXO III - Artigo publicado referente à vertente de Biofísica Molecular: PL x HSA) [1] coordenado pelo Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio. No trabalho, investigou-se a interação da PL com a proteína albumina do soro humano (HSA), a qual é presente no plasma sanguíneo e tem papel de carreadora de fármacos. Através da técnica de espectroscopia de fluorescência e análises da supressão, caracterizou-se os parâmetros da interação (termodinâmicos e região da interação através de análises de competição de sítios) [13].

2 Introdução

Apresenta-se nesta seção uma introdução geral do composto utilizado, piperlongumina, e uma breve motivação do estudo na temática do câncer, em contextos gerais.

2.1 Câncer

A área de pesquisa do câncer, é ainda uma temática desafiadora e de interesse mundial. O câncer é uma das principais causas de morte, em 2020 foi responsável por quase 10 milhões de mortes no mundo (Figura 1) [14,15], as incidências mais comuns foram câncer de pulmão, seguido de colorretal, fígado, estômago e mama (Figura 2).

As doenças cancerígenas têm duas preocupações principais: o crescimento celular e a migração celular [16]. A metástase, por ser a causa da maioria das mortalidades em pacientes com câncer, tem recebido cada vez mais atenção, tanto na pesquisa científica quanto na clínica [17].

O entendimento, nos níveis molecular e celular, do processo letal do câncer é de grande importância científica [17]. Neste trabalho apresenta-se abordagens biofísicas nos dois níveis:

- Estudo da interação da macromolécula presente no processo da inflamação (Anexina A1) com o composto anticâncer (Piperlongumina), seção 3.

- Estudo das propriedades mecânicas de células cancerígenas (HeLa) na presença do composto anticâncer (Piperlongumina), seção 4.

Algumas características gerais da Piperlongumina estão apresentadas nesta seção. Já nas seções 3 e 4 há introduções específicas para os referidos sistemas.

2.2 Piperlongumina

Compostos naturais tem se destacado perante o tratamento e prevenção de várias doenças [18]. Neste trabalho, um composto anticancerígeno foi escolhido, a piperlongu-

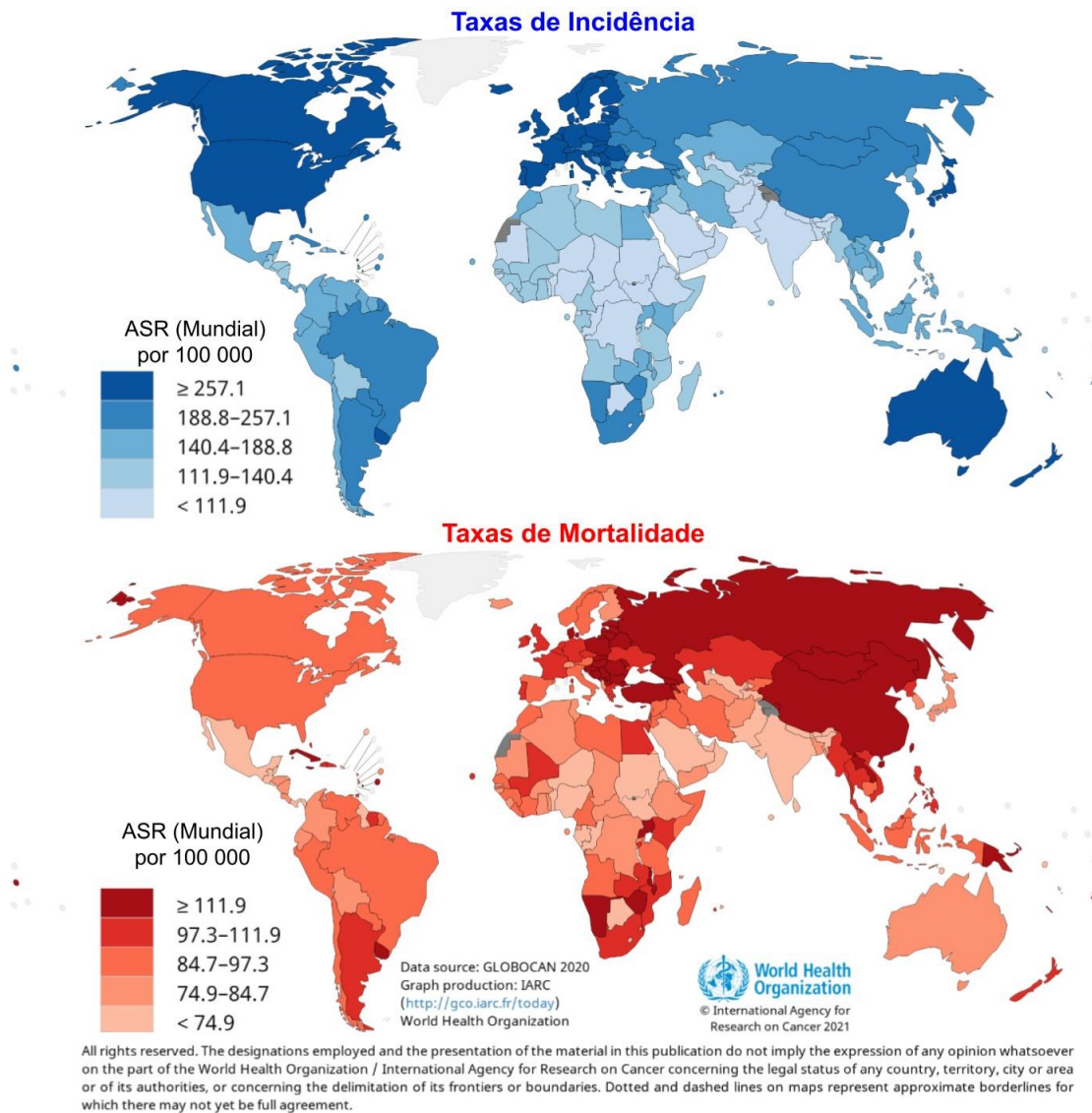


Figura 1: Câncer: taxas mundiais de incidência (acima) e de mortalidade (abaixo), padronizadas pela idade (ASR, *age-standardised rate*), estimadas pela WHO (organização mundial da saúde) em 2020. Figura adaptada de [15].

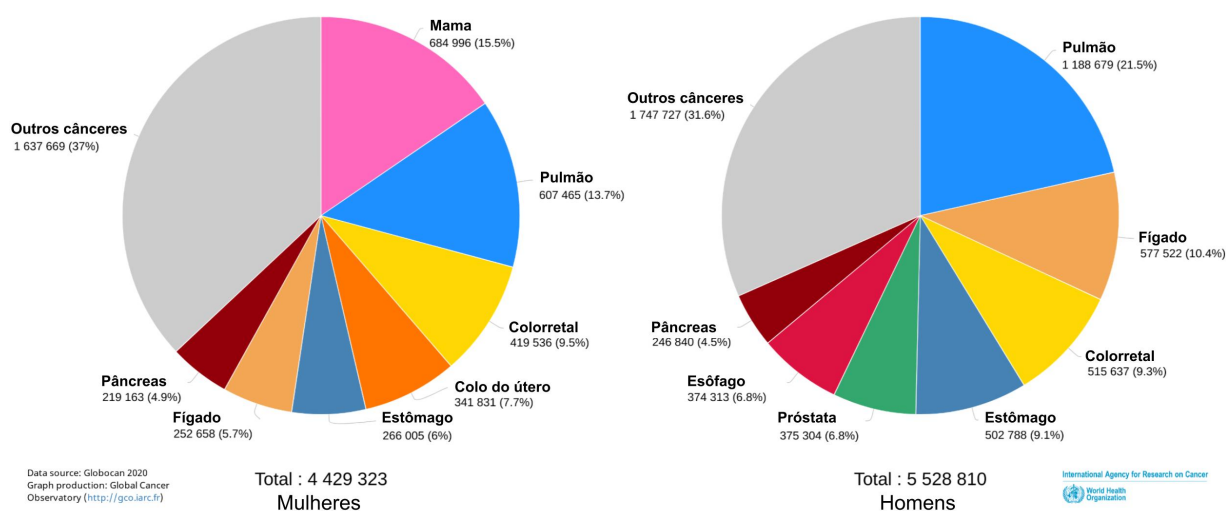


Figura 2: Câncer: taxas estimadas de mortalidade mundial de mulheres (à esquerda) e de homens (à direita) em 2020, pela WHO (organização mundial da saúde). Figura adaptada de [15].

mina (PL, Figura 3), do inglês *piperlongumine*, ou como também conhecida, pipartina, cuja nomenclatura oficial é 5,6-dihidro-1-[(2E)-1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propen-1-il]-2(1H)-piridinona. A piperlongumina possui massa molecular igual a 317.3g/mol, e é isolada a partir de cascas do caule e raízes de diferentes espécies de pimenta, como *Piper tuberculatum* L. (pimenta-d’arda), *Piper longum* L. (pimenta longa), entre outras [19–24].

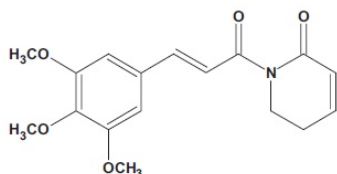


Figura 3: Estrutura química da Piperlongumina ($C_{17}H_{19}O_5N$) [20, 25].

Das 112 espécies do gênero *Piper*, foram isolados 667 diferentes compostos, os quais são classificados nas seguintes categorias (Figura 4): alcalóides/amidas, kavapironas, chalconas/di-hidrochalconas, terpenos, flavonas, neolignananas, esteróides, lignanas, flavanonas, propenilfenóis, piperolídeos, entre outros (alcanos, álcoois, ácidos, ésteres, etc.) [22, 26].

A piperlongumina, pertence ao grupo dos alcalóides/amidas.

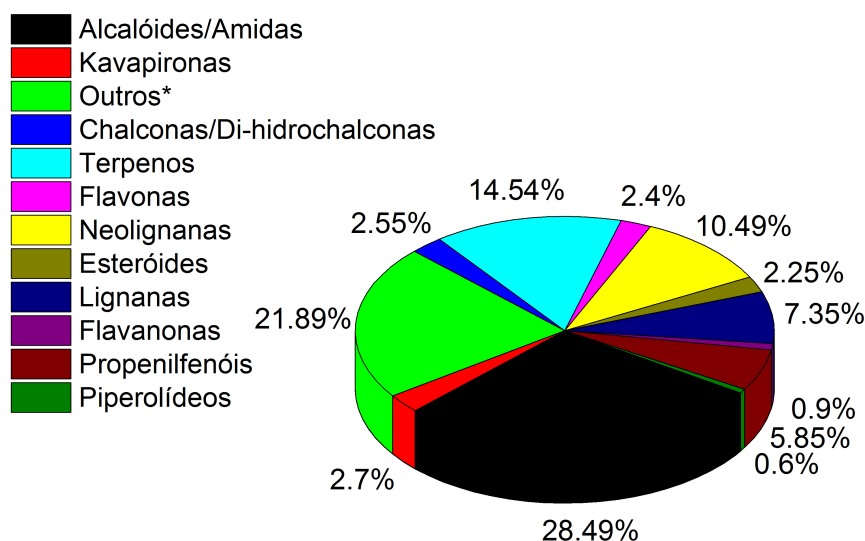


Figura 4: Porcentagem da distribuição dos compostos isolados de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Piper*, organizados por famílias [22, 25, 26]. (*) Demais compostos que não se enquadram nos grandes grupos comuns de metabólitos secundários [13].

O uso de piperlongumina é relatado há milhares de anos pela prática Ayurveda, uma medicina alternativa desenvolvida na Índia [22, 23, 27]. Estudos *in vivo* e *in vitro* apresentam várias propriedades farmacológicas promissoras da piperlongumina, como, por exemplo, genotóxica, citotóxica, antimetastática, antitumoral e anti-inflamatória [10, 11, 20, 25, 28].

O alvo da PL pode ser alcançado através do plasma sanguíneo, conforme observado nos estudos *in vitro* e *in vivo* [1, 10, 20, 28]. Recentemente, o trabalho de Meegan et al. apresentou PL como um agente desestabilizador de microtúbulos com efeitos antiproliferativos em células de câncer de mama [29]. Além disso, o estudo de Henrique et al. mostrou o efeito inibitório da PL na expressão de α -tubulina em células endoteliais [2]. Agentes que alvejam o microtúbulo, também conhecidos como agentes de ligação à tubulina (TBA), são potentes venenos mitóticos que inibem a proliferação de células eucarióticas, promovem a morte celular pela supressão da instabilidade dinâmica dos microtúbulos e interferem com o transporte intracelular [30–32]. PL apresenta diferentes mecanismos de ação e tem sido proposta como um potencial fármaco anticâncer e um composto interessante a ser investigado [4, 10, 33].

4.6 Conclusões – Biofísica Celular

Compreender as propriedades biomecânicas nas células após o efeito do fármaco pode ajudar a elucidar o mecanismo das atividades dos compostos anticâncer. Nesse contexto, a Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma técnica que pode ser utilizada para quantificar a resposta do fármaco na célula. Aqui, nós empregamos experimentos de AFM para investigar as propriedades biomecânicas das células cancerígenas sob influência de um composto anticâncer. As células HeLa foram exploradas em diferentes condições de tratamento utilizando o composto e alterando o substrato de cultura (rigidez). Os resultados indicaram que a força de passo (SF) é sensível ao tempo de ação do fármaco; a piperlongumina (PL) atua nas células HeLa nas primeiras 6 horas de tratamento. Além disso, SF é sensível à concentração do composto; os experimentos com células HeLa apresentam um aumento de SF entre 5 e 10 μM de tratamento com PL, uma variação em torno de 10 pN. Além do tempo de ação e da concentração do composto, o SF também é sensível às alterações do citoesqueleto. As células HeLa na presença de 10 μM de PL aumentaram a força de passo ($\Delta\text{SF}_{10\mu\text{M}-C} \approx 10\text{pN}$) em comparação com o controle, independentemente da rigidez do substrato. Recentemente, PL foi descrita na literatura como um agente desestabilizador de microtúbulos [29]. Neste estudo, observamos um aumento nos valores da força de passo de experimentos com células HeLa na presença da piperlongumina em diferentes ensaios (tempos de ação, concentrações do fármaco e substratos de cultura). Esse incremento do SF sugere que a PL atua de forma direcionada ao microtúbulo das células HeLa. O fluxograma de experimentos de AFM apresentados aqui mostram um procedimento eficaz para caracterizar as interações gerais entre fármacos anticâncer e linhagens de células cancerígenas.

5 Conclusões Gerais

A interdisciplinaridade tem sido bastante benéfica em muitas áreas de pesquisa. Nesta tese busca-se compreender, a partir de conceitos e leis físicas de sistemas macro/microscópicos, os fenômenos biológicos. Efeitos biofísicos do composto anticâncer (PL) foram observados em proteínas e células. Na seção de biofísica molecular, a interação de PL com macromoléculas foi caracterizada utilizando espectroscopia de fluorescência. Já na seção de biofísica celular, a qual, nesta tese, é dada mais enfoque, aplicamos microscopia de força atômica (AFM) para quantificar as influências da PL nas propriedades mecânicas das células HeLa. Observamos experimentalmente a orquestração do citoesqueleto em escala de força (SF) induzida pelo microambiente e pela ação do fármaco (PL).

Referências

- [1] Nayara Sousa Alcântara-Contessoto, Ícaro Putinhon Caruso, Daniel Pereira Bezerra, José Maria Barbosa Filho, and Marinônio Lopes Cornélio. An investigation into the interaction between piplartine (piperlongumine) and human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, May 2019.
- [2] Tiago Henrique, Caroline de F. Zanon, Ana P. Girol, Ana Carolina Buzzo Stefanini, Nayara S. de A. Contessoto, Nelson J. F. da Silveira, Daniel P. Bezerra, Edilberto R. Silveira, José M. Barbosa-Filho, Marinonio L. Cornélio, Sonia M. Oliani, and Eloiza H. Tajara. Biological and physical approaches on the role of piplartine (piperlongumine) in cancer. *Scientific Reports*, 10(1):22283, December 2020.
- [3] Caroline de Freitas Zanon de Carvalho. *Estudo dos mecanismos de ação do peptídeo Ac2-26 e da Piplartina nas células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC) ativadas pelo lipopolissacarídeo*. PhD thesis, São Paulo State University, 2018.
- [4] Drew J. Adams, Mingji Dai, Giovanni Pellegrino, Bridget K. Wagner, Andrew M. Stern, Alykhan F. Shamji, and Stuart L. Schreiber. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(38):15115–15120, September 2012.
- [5] Elodie Bosc, Jhennifer Nastro, Valérie Lefort, Marilia Valli, Fernando Contiguiba, Renan Pioli, Maysa Furlan, Vanderlan da Silva Bolzani, Chahrazade El Amri, and Michèle Reboud-Ravaux. Piperlongumine and some of its analogs inhibit selectively the human immunoproteasome over the constitutive proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(3):961–966, February 2018.
- [6] Lukman O. Afolabi, Jiacheng Bi, Liang Chen, and Xiaochun Wan. A natural product, Piperlongumine (PL), increases tumor cells sensitivity to NK cell killing. *International Immunopharmacology*, 96:107658, July 2021.
- [7] Imre Derényi, Frank Jülicher, and Jacques Prost. Formation and Interaction of Membrane Tubes. *Physical Review Letters*, 88(23):238101, May 2002.

- [8] Gerbrand Koster, Angelo Cacciuto, Imre Derényi, Daan Frenkel, and Marileen Dogterom. Force Barriers for Membrane Tube Formation. *Physical Review Letters*, 94(6):068101, February 2005.
- [9] B. Pontes, N.B. Viana, L.T. Salgado, M. Farina, V. Moura Neto, and H.M. Nussenzveig. Cell Cytoskeleton and Tether Extraction. *Biophysical Journal*, 101(1):43–52, July 2011.
- [10] Daniel P. Bezerra, Claudia Pessoa, Manoel O. de Moraes, Nicolau Saker-Neto, Edilberto R. Silveira, and Leticia V. Costa-Lotufo. Overview of the therapeutic potential of piperlongumine (piperlongumine). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3):453–463, February 2013.
- [11] D. Rodrigues Silva, S. Baroni, A.E. Svidzinski, C.A. Bersani-Amado, and D.A.G. Cortez. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3):569–573, March 2008.
- [12] Nayara Sousa de Alcântara-Contessoto, Marinônio Lopes Cornélio, and Ching-Hwa Kiang. Quantifying the effect of anti-cancer compound (piperlongumine) on cancer cells using single-cell force spectroscopy. *bioRxiv*, 2021.
- [13] Nayara S. Alcântara-Contessoto. Estudo da interação da pipartina com albumina do soro humano por técnicas espectroscópicas. <http://hdl.handle.net/11449/150180>, Dissertation, 2017.
- [14] Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, and Freddie Bray. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021.
- [15] J Ferlay, M Ervik, F Lam, M Colombet, L Mery, M Piñeros, A Znaor, I Soerjomataram, and F Bray. Global cancer observatory: Cancer today. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*, 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [April 2021].

- [16] Andrew G Clark and Danijela Matic Vignjevic. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*, 36:13–22, October 2015.
- [17] Tracey A. Martin, Lin Ye, Andrew J. Sanders, Jane Lane, and Wen G. Jiang. *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective*. Landes Bioscience, 2013.
- [18] the International Natural Product Sciences Taskforce, Atanas G. Atanasov, Sergey B. Zotchev, Verena M. Dirsch, and Claudiu T. Supuran. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3):200–216, March 2021.
- [19] Per M. Boll, Jesper Hansen, Ole Simonsen, and Niels Thorup. Synthesis and molecular structure of pipartine (=piperlongumine). *Tetrahedron*, 40(1):171–175, 1984.
- [20] Daniel P. Bezerra, Marne C. Vasconcellos, Miriana S. Machado, Izabel V. Villela, Renato M. Rosa, Dinara J. Moura, Cláudia Pessoa, Manoel O. Moraes, Edilberto R. Silveira, Mary Anne S. Lima, Nayara C. Aquino, João Antonio P. Henriques, Jenifer Saffi, and Letícia V. Costa-Lotufo. Pipartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 677(1–2):8–13, June 2009.
- [21] F. Cícero Bezerra Felipe, Jucélio Trajano Sousa Filho, Louise Emanuele de Oliveira Souza, Jefferson Alexandre Silveira, Daniel Esdras de Andrade Uchoa, Edilberto Rocha Silveira, Otília Deusdênia Loiola Pessoa, and Glauce S. de Barros Viana. Pipartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. *Phytomedicine*, 14(9):605–612, 2007.
- [22] Virinder S. Parmar, Subhash C. Jain, Kirpal S. Bisht, Rajni Jain, Poonam Taneja, Amitabh Jha, Om D. Tyagi, Ashok K. Prasad, Jesper Wengel, C. E. Olsen, and Per M. Boll. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46(4):597–673, October 1997.
- [23] C. K. Atal and J. N. Ojha. Studies on the genus *Piper*. Part IV. Long peppers of Indian commerce. *Economic Botany*, 19(2):157–164, April 1965.

- [24] Atal C.K., Banga S.S. Structure of piplartine - a new alkaloid from *Piper longum*. *Current Science*, 32(8):354–355, August 1963.
- [25] Surya Kant Tripathi and Bijesh Kumar Biswal. Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent. *Pharmacological Research*, 156:104772, June 2020.
- [26] Lee A. Dyer, Joe Richards, and Craig D. Dodson. Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of piper amides. In *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*. Springer US, 2004.
- [27] Wikipédia. Aiurveda — wikipédia, a enciclopédia livre, 2021. [Online; accessed 8-outubro-2021].
- [28] Daniel P. Bezerra, Claudia Pessoa, Manoel O. Moraes, Leticia V. Costa-Lotufo, Dayana Rubio Gouvea, Valquiria A. Polisel Jabor, Norberto Peporine Lopes, Keyler Bastos Borges, Mary Anne S. Lima, and Edilberto R. Silveira. Sensitive method for determination of piplartine, an alkaloid amide from piper species, in rat plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Química Nova*, 35:460–465, 00 2012.
- [29] Mary J. Meegan, Seema Nathwani, Brendan Twamley, Daniela M. Zisterer, and Niamh M. O’Boyle. Piperlongumine (piplartine) and analogues: Antiproliferative microtubule-destabilising agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125:453–463, January 2017.
- [30] Eddy Pasquier and Maria Kavallaris. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB life*, 60(3):165–170, March 2008.
- [31] Michel O. Steinmetz and Andrea E. Prota. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 28(10):776–792, October 2018.
- [32] M. A. Jordan. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents*, 2(1):1–17, January 2002.

- [33] Y Wang, J-W Wang, X Xiao, Y Shan, B Xue, G Jiang, Q He, J Chen, H-G Xu, R-X Zhao, K D Werle, R Cui, J Liang, Y-L Li, and Z-X Xu. Piperlongumine induces autophagy by targeting p38 signaling. *Cell Death & Disease*, 4(10):e824–e824, October 2013.
- [34] Ahmad M Kamal, Roderick J Flower, and Mauro Perretti. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(suppl 1):39–48, March 2005.
- [35] M Netea. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends in Immunology*, 24(5):254–258, May 2003.
- [36] Marco Antonio Cianciarullo, Maria Esther Jurfest Ceccon, Lidia Yamamoto, Gilda Maria Barbaro Del Negro, and Thelma Suely Okay. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. *Journal of Human Growth and Development*, 18(2):135, August 2008.
- [37] Wikipedia contributors. Cytokine — Wikipedia, the free encyclopedia. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytokine&oldid=1051797244>, 2021. [Online; 2021].
- [38] Sussan Nourshargh and Ronen Alon. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, 41(5):694–707, November 2014.
- [39] B Beutler. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12):845–859, February 2004.
- [40] Claudia Cobos Caceres, Paramjit S. Bansal, Severine Navarro, David Wilson, Laurianne Don, Paul Giacomini, Alex Loukas, and Norelle L. Daly. An engineered cyclic peptide alleviates symptoms of inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *Journal of Biological Chemistry*, 292(24):10288–10294, June 2017.
- [41] Andre Gustavo Bonavita. Ac2-26 mimetic peptide of annexin A1 to treat severe COVID-19: A hypothesis. *Medical Hypotheses*, 145:110352, December 2020.

- [42] Zied Boudhraa, Bernadette Bouchon, Claire Viallard, Michel D’Incan, and Françoise Degoul. Annexin A1 localization and its relevance to cancer. *Clinical Science*, 130(4):205–220, February 2016.
- [43] Patrick Raynal and Harvey B. Pollard. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1197(1):63–93, April 1994.
- [44] Rong Biaoxue, Cai Xiguang, and Yang Shuanying. Annexin A1 in Malignant Tumors: Current Opinions and Controversies. *The International Journal of Biological Markers*, 29(1):e8–e20, January 2014.
- [45] Chunmei Guo, Shuqing Liu, and Ming-Zhong Sun. Potential role of Anxa1 in cancer. *Future Oncology*, 9(11):1773–1793, November 2013.
- [46] Anja Rosengarth, Volker Gerke, and Hartmut Luecke. X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation¹¹Edited by D. Rees. *Journal of Molecular Biology*, 306(3):489–498, February 2001.
- [47] H.T. Haigler, J.A. Mangili, Y Gao, J Jones, and N.D. Horseman. Identification and characterization of columbid annexin Icp37. Insights into the evolution of annexin I phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27):19123–19129, September 1992.
- [48] S. C. Hall, D. M. Smith, F. R. Masiarz, V. W. Soo, H. M. Tran, L. B. Epstein, and A. L. Burlingame. Mass spectrometric and Edman sequencing of lipocortin I isolated by two-dimensional SDS/PAGE of human melanoma lysates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(5):1927–1931, March 1993.
- [49] Volker Gerke and Stephen E. Moss. Annexins: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, 82(2):331–371, April 2002.
- [50] Volker Gerke, Carl E. Creutz, and Stephen E. Moss. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6):449–461, June 2005.

- [51] Mauro Perretti and Fulvio D'Acquisto. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 9(1):62–70, January 2009.
- [52] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science+Business Media, third edition, 2006.
- [53] Jihad René Albani. *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Blackwell Publishing Ltd, 2007.
- [54] B. L. Mark, S. A. McKenna, and M. Khajepour. 1.11 - Protein Structural Analysis. In *Comprehensive Biotechnology*. Academic Press, second edition, 2011.
- [55] Kyle A Paterson, Jochen Arlt, and Anita C Jones. Dynamic and static quenching of 2-aminopurine fluorescence by the natural DNA nucleotides in solution. *Methods and Applications in Fluorescence*, 8(2):025002, February 2020.
- [56] Jiang Min, Xie Meng-Xia, Zheng Dong, Liu Yuan, Li Xiao-Yu, and Chen Xing. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 692(1–3):71–80, 2004.
- [57] Philip D. Ross and S. Subramanian. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20(11):3096–3102, 1981.
- [58] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science+Business Media, third edition, 2006.
- [59] I. P. Caruso, W. Vilegas, M. A. Fossey, and M. L. Cornélio. Exploring the binding mechanism of Guaijaverin to human serum albumin: fluorescence spectroscopy and computational approach. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 97:449–455, November 2012.
- [60] Y. Yue, S. Zhao, J. Liu, X. Yan, and Y. Sun. Probing the binding properties of dicyandiamide with pepsin by spectroscopy and docking methods. *Chemosphere*, 185:1056–1062, October 2017.

- [61] Ícaro Putinhon Caruso, Wagner Vilegas, Fátima Perreira de Souza, Marcelo Andrés Fossey, and Marinônio Lopes Cornélio. Binding of antioxidant flavone isovitexin to human serum albumin investigated by experimental and computational assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98:100–106, 2014.
- [62] Yi-Wen Chu, Pan-Chyr Yang, Shuenn-Chen Yang, Yu-Chiau Shyu, Mary J. C. Hendrix, Reen Wu, and Cheng-Wen Wu. Selection of Invasive and Metastatic Subpopulations from a Human Lung Adenocarcinoma Cell Line. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17(3):353–360, September 1997.
- [63] Wikipédia. Epitélio — wikipédia, a enciclopédia livre. <https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Epit%C3%A9lio&oldid=62359360>, 2021. [Online; accessed 2021].
- [64] Peter Friedl and Stephanie Alexander. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell*, 147(5):992–1009, November 2011.
- [65] Daniel A. Fletcher and R. Dyrche Mullins. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280):485–492, January 2010.
- [66] Wikipedia contributors. Paul alfred weiss — Wikipedia, the free encyclopedia. https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Paul_Alfred_Weiss&oldid=979244649, 2020. [Online; 2021].
- [67] Prasenjit Bose. *Extracellular Matrix Architecture and Biomechanics of 3D Engineered Microtissues*. PhD thesis, Johns Hopkins University, 07 2018.
- [68] Meilang Xue and Christopher J. Jackson. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, 4(3):119–136, March 2015.
- [69] OpenStax. Biology — connections between cells and cellular activities. Download for free at <https://openstax.org/books/biology/pages/4-6-connections-between-cells-and-cellular-activities>, 2021. [Online; accessed May-2021].

- [70] Jing Dai and Yuan Yao. Adaptive ordering and filament polymerization of cell cytoskeleton by tunable nanoarrays. *Nano Research*, 14(3):620–627, March 2021.
- [71] Karen E Kasza, Amy C Rowat, Jiayu Liu, Thomas E Angelini, Clifford P Brangwynne, Gijssje H Koenderink, and David A Weitz. The cell as a material. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(1):101–107, February 2007.
- [72] Adrian F. Pegoraro, Paul Janmey, and David A. Weitz. Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(11):a022038, November 2017.
- [73] Ovijit Chaudhuri, Sapun H. Parekh, Wilbur A. Lam, and Daniel A. Fletcher. Combined atomic force microscopy and side-view optical imaging for mechanical studies of cells. *Nature methods*, 6(5):383–387, May 2009.
- [74] Corina Keller. *Coupled Molecular Motors: Network Representation Dynamics of Kinesin Motor Pairs*. PhD thesis, 02 2013.
- [75] Wikipedia contributors. Cytoskeleton — Wikipedia, the free encyclopedia. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytoskeleton&oldid=1019323066>, 2021. [Online; accessed May-2021].
- [76] OpenStax. Anatomy and physiology – the cytoplasm and cellular organelles. Download for free at <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/3-2-the-cytoplasm-and-cellular-organelles>, 2021. [Online; accessed May-2021].
- [77] Hohmann and Dehghani. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4):362, April 2019.
- [78] Revathi Ananthakrishnan and Allen Ehrlicher. The Forces Behind Cell Movement. *International Journal of Biological Sciences*, pages 303–317, 2007.
- [79] Chin-Lin Guo, Nolan C. Harris, Sithara S. Wijeratne, Eric W. Frey, and Ching-Hwa Kiang. Multiscale mechanobiology: mechanics at the molecular, cellular, and tissue levels. *Cell & Bioscience*, 3(1):25, June 2013.

- [80] D Raucher and M P Sheetz. Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophysical Journal*, 77(4):1992–2002, October 1999.
- [81] Conly L. Rieder and Helder Maiato. Stuck in Division or Passing through: What Happens When Cells Cannot Satisfy the Spindle Assembly Checkpoint. *Developmental Cell*, 7(5):637–651, November 2004.
- [82] Nicolas André and Christophe Meille. Taxanes in paediatric oncology: And now? *Cancer Treatment Reviews*, 32(2):65–73, April 2006.
- [83] Gerhardt Attard, Alastair Greystoke, Stan Kaye, and Johann De Bono. Update on tubulin-binding agents. *Pathologie Biologie*, 54(2):72–84, March 2006.
- [84] Daniel J. Ncayiyana. The extraordinary story of the life after death of Henrietta Lacks. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, 101(3):141, March 2011.
- [85] Mingzhai Sun, John S. Graham, Balazs Hegedüs, Françoise Marga, Ying Zhang, Gabor Forgacs, and Michel Grandbois. Multiple Membrane Tethers Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 89(6):4320–4329, December 2005.
- [86] Jingqiang Li, Sithara S. Wijeratne, Tyler E. Nelson, Tsung-Cheng Lin, Xin He, Xuewen Feng, Nicolas Nikoloutsos, Raymond Fang, Kevin Jiang, Ian Lian, and Ching-Hwa Kiang. Dependence of Membrane Tether Strength on Substrate Rigidity Probed by Single-Cell Force Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 11(10):4173–4178, May 2020.
- [87] H. Moysés Nussenzveig. Cell membrane biophysics with optical tweezers. *European Biophysics Journal*, 47(5):499–514, July 2018.
- [88] Xiaoling Yun, Mingjie Tang, Zhongbo Yang, Jonathan J. Wilksch, Peng Xiu, Haiyang Gao, Feng Zhang, and Huabin Wang. Interrogation of drug effects on HeLa cells by exploiting new AFM mechanical biomarkers. *RSC Advances*, 7(69):43764–43771, September 2017.
- [89] Kyung Sook Kim, Chang Hoon Cho, Eun Kuk Park, Min-Hyung Jung, Kyung-Sik Yoon, and Hun-Kuk Park. AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and

- Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells. *PLOS ONE*, 7(1):e30066, January 2012.
- [90] Małgorzata Lekka, Dorota Gil, Katarzyna Pogoda, Joanna Dulińska-Litewka, Robert Jach, Justyna Gostek, Olesya Klymenko, Szymon Prauzner-Bechcicki, Zbigniew Stachura, Joanna Wiltowska-Zuber, Krzysztof Okoń, and Piotr Laidler. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 518(2):151–156, February 2012.
- [91] C Rotsch and M Radmacher. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, 78(1):520–535, January 2000.
- [92] Nuno C Santos and Filomena A Carvalho. *Atomic Force Microscopy: Methods and Protocols*. 2019. OCLC: 1204052975.
- [93] Igor Sokolov. *Atomic Force Microscopy in Cancer Cell Research*, volume 1, pages 43–59. 01 2007.
- [94] Jeffrey L. Hutter and John Bechhoefer. Calibration of atomic [U+2010]force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, 64(7):1868–1873, July 1993.
- [95] H J Butt and M Jaschke. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1):1–7, January 1995.
- [96] Nolan C. Harris, Yang Song, and Ching-Hwa Kiang. Experimental Free Energy Surface Reconstruction from Single-Molecule Force Spectroscopy using Jarzynski’s Equality. *Physical Review Letters*, 99(6):068101, August 2007.
- [97] András Kapus and Paul Janmey. *Plasma Membrane—Cortical Cytoskeleton Interactions: A Cell Biology Approach with Biophysical Considerations*, pages 1231–1281. John Wiley Sons, Ltd, 2013.
- [98] Jianwu Dai and Michael P. Sheetz. Membrane Tether Formation from Blebbing Cells. *Biophysical Journal*, 77(6):3363–3370, December 1999.
- [99] Ana-Sunčana Smith, Erich Sackmann, and Udo Seifert. Pulling Tethers from Adhered Vesicles. *Physical Review Letters*, 92(20):208101, May 2004.

- [100] Ilya Levental, Michal Grzybek, and Kai Simons. Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts. *Biochemistry*, 49(30):6305–6316, August 2010.
- [101] Reinhard Lipowsky. The conformation of membranes. *Nature*, 349(6309):475–481, February 1991.
- [102] E. Sackmann. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Letters*, 346(1):3–16, June 1994.
- [103] Yin Liu, Natalya V. Belkina, Chung Park, Raj Nambiar, Scott M. Loughhead, Genaro Patino-Lopez, Khadija Ben-Aissa, Jian-Jiang Hao, Michael J. Kruhlak, Hai Qi, Ulrich H. von Andrian, John H. Kehrl, Matthew J. Tyska, and Stephen Shaw. Constitutively active ezrin increases membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. *Blood*, 119(2):445–453, January 2012.
- [104] Michael P. Sheetz and Jianwu Dai. Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends in Cell Biology*, 6(3):85–89, March 1996.
- [105] E. L. Batchelder, G. Hollopeter, C. Campillo, X. Mezanges, E. M. Jorgensen, P. Nassoy, P. Sens, and J. Plastino. Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28):11429–11434, July 2011.
- [106] N. C. Gauthier, M. A. Fardin, P. Roca-Cusachs, and M. P. Sheetz. Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35):14467–14472, August 2011.
- [107] Kinneret Keren, Zachary Pincus, Greg M. Allen, Erin L. Barnhart, Gerard Marriott, Alex Mogilner, and Julie A. Theriot. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature*, 453(7194):475–480, May 2008.
- [108] Jingqiang Li. *Forces unveil physics in biological systems via atomic force microscopy: from single molecules to single cells*. PhD thesis, Rice University, 2018.

- [109] Michael P. Sheetz. Cell control by membrane–cytoskeleton adhesion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(5):392–396, May 2001.
- [110] Alka Ben Trivedi, Naofumi Kitabatake, and Etsushiro Doi. Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(11):2961–2966, 1990.
- [111] Mary C. Phelan. Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology*, 36(1), September 2007.
- [112] Simon Duerr. Bioicons – high quality science illustrations. Icons by Servier; DBCLS and Marcel Tisch are licensed under CC-BY 3.0; CC0 and CC-BY 4.0 Unported <https://creativecommons.org/>, <https://bioicons.com/>, 2021.
- [113] Jens Friedrichs, Jonne Helenius, and Daniel J Muller. Quantifying cellular adhesion to extracellular matrix components by single-cell force spectroscopy. *Nature Protocols*, 5(7):1353–1361, July 2010.
- [114] Jacob W. J. Kerssemakers, E. Laura Munteanu, Liedewij Laan, Tim L. Noetzel, Marcel E. Janson, and Marileen Dogterom. Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature*, 442(7103):709–712, August 2006.
- [115] Violin Plot. <https://www.itl.nist.gov/div898/software/dataplot/refman1/auxillar/violplot.htm>.
- [116] Front matter. In Sheldon M. Ross, editor, *Introduction to Probability and Statistics for Engineers and Scientists (Fifth Edition)*, pages i–iii. Academic Press, Boston, January 2014.
- [117] Emanuel Parzen. On Estimation of a Probability Density Function and Mode. *The Annals of Mathematical Statistics*, 33(3):1065–1076, September 1962.
- [118] Murray Rosenblatt. Remarks on Some Nonparametric Estimates of a Density Function. *The Annals of Mathematical Statistics*, 27(3):832–837, September 1956.
- [119] Violin Plot seaborn. <https://seaborn.pydata.org/>.

- [120] The Mathworks, Inc., Natick, Massachusetts. *MATLAB version 9.10.0.1613233 (R2021a)*, 2021.
- [121] Md. Sirajul Islam, Arif Md. Rashedul Kabir, Daisuke Inoue, Kazuki Sada, and Akira Kakugo. Enhanced dynamic instability of microtubules in a ROS free inert environment. *Biophysical Chemistry*, 211:1–8, April 2016.
- [122] Martine Coué, Stephen L. Brenner, Ilan Spector, and Edward D. Korn. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters*, 213(2):316–318, March 1987.
- [123] H. Kubitschke, J. Schnauss, K. D. Nnetu, E. Warmt, R. Stange, and J. Kaes. Actin and microtubule networks contribute differently to cell response for small and large strains. *New Journal of Physics*, 19(9):093003, 2017.