

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 Olini 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 Ac_{2–26} 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	Microlitro
kDa	kilodalton
ΔF	<i>Step Force</i> (Força de Passo/Degrau)
ΔSF	Variação do <i>Step Force</i>
ΔG^0	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH^0	Variação da entalpia
ΔS^0	Variação 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 exibe 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 pipartine (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-

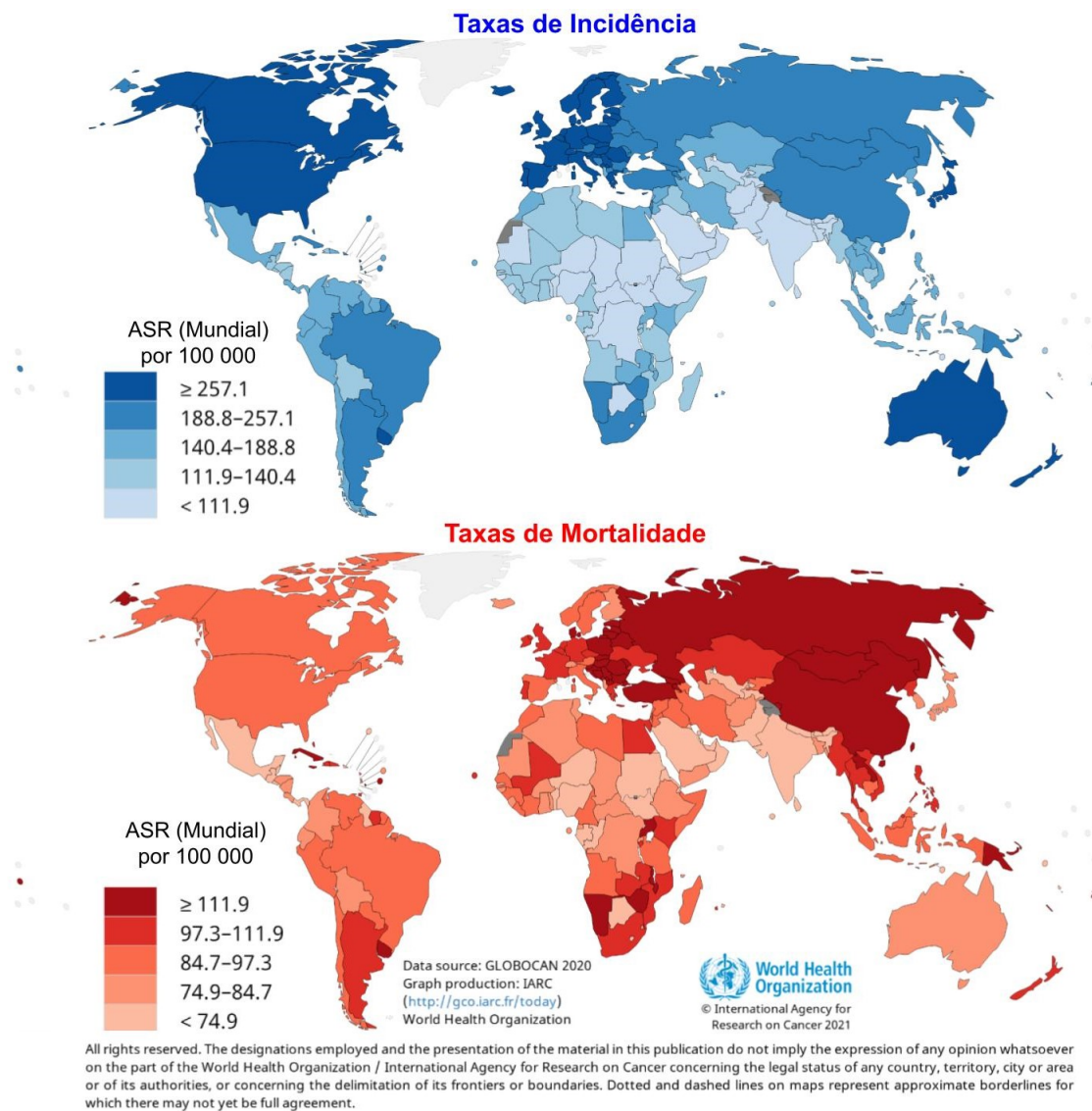


Figura 1: Câncer: taxas mundiais de incidência (acima) e de mortalidade (abaixo), padronizadas pela idade (ASR, *age-standardised rate*), estimadas pela WHO (organização mundial da saúde) em 2020. Figura adaptada de [15].

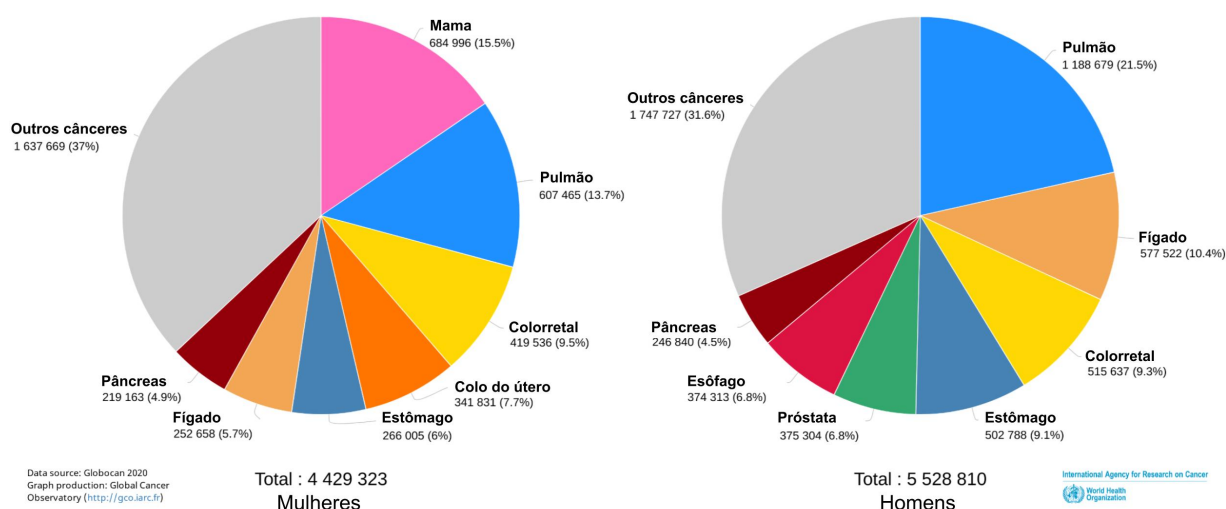


Figura 2: Câncer: taxas estimadas de mortalidade mundial de mulheres (à esquerda) e de homens (à direita) em 2020, pela WHO (organização mundial da saúde). Figura adaptada de [15].

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].

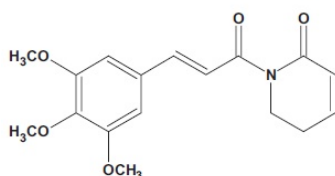


Figura 3: Estrutura química da Piperlongumina ($C_{17}H_{19}O_5N$) [20, 25].

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.

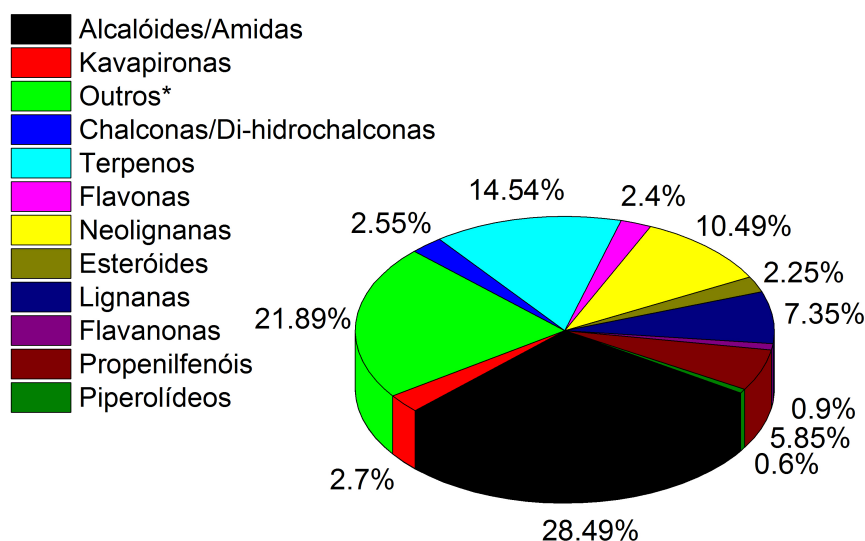


Figura 4: Porcentagem da distribuição dos compostos isolados de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Piper*, organizados por famílias [22, 25, 26]. (*) Demais compostos que não se enquadram nos grandes grupos comuns de metabólitos secundários [13].

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].

3 Biofísica Molecular

Apresenta-se, neste capítulo, a parte dos estudos em nível molecular desta tese, cujo foco é nas análises físico-químicas do peptídeo Ac_{2–26} da anexina A1, envolvido nos processos inflamatórios, na presença de Piperlongumina (PL). Os parâmetros termodinâmicos da interação são descritos utilizando espectroscopia de fluorescência [2].

3.1 Introdução – Biofísica Molecular

3.1.1 Processos Inflamatórios

A inflamação crônica fornece um microambiente favorável para a tumorigênese, o que pode direcionar o desenvolvimento e progressão do câncer [2, 3]. Os mecanismos anti-inflamatórios que operam no organismo para suprimir a reação inflamatória tem chamado a atenção de pesquisadores nos últimos anos [3, 34]. A concentração sérica de citocinas, uma família de mediadores celulares (interleucinas, citocinas e TNFs), é indetectável em indivíduos saudáveis [35–37]. No início de um processo inflamatório, o organismo constrói uma resposta em direção ao local, onde os leucócitos são ativados e transmigrados para o tecido circundante [3, 38, 39]. A produção de citocinas é então estimulada no processo de invasão do hospedeiro pelos microorganismos patogênicos [35, 36].

Algumas citocinas funcionam primariamente como indutoras da inflamação (citocinas pró-inflamatórias), por exemplo: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6); enquanto outras atuam na contra-regulação (citocinas anti-inflamatórias), por exemplo: interleucina-10 (IL-10) e inibidor do receptor da interleucina-1 (IL-1Ra) [36, 40]. Quando há desequilíbrio entre os processos, ou com predomínio da resposta inflamatória, ou dos fatores contra-reguladores, ocorre o desencadeamento de uma sequência de eventos que têm por objetivo fazer com que as concentrações dessas proteínas retornem aos seus valores normais, mantendo o processo inflamatório sob controle [3, 36].

3.1.2 Anexina A1

A proteína anexina A1 (ANXA1) apresenta vários efeitos anti-inflamatórios, incluindo a modulação dos níveis de citocinas [40,41]. Foi inicialmente estudada na resolução da inflamação e, posteriormente, observou-se seu envolvimento em vários processos celulares [42]. ANXA1 é expressa em vários tecidos e pode ser localizada em diferentes compartimentos de células (nuclear, citoplasmático e associado à membrana) [42,43]. Nesta última localização, na superfície celular, a ANXA1 pode ser clivada proteoliticamente e se tornar acessível aos receptores de formil-peptídeo, estimulando-os a desencadear as vias oncogênicas [42]. A desregulação da ANXA1 é frequentemente correlacionada com o câncer, sendo superexpressa em um grande número de cânceres (por exemplo próstata, retal e gástrico); apresenta vários papéis na progressão e atua em diferentes níveis, desde o início do câncer até a metástase [42,44,45].

A anexina A1 (ANXA1) é uma proteína de ligação à fosfolipídeos regulada por Ca^{2+} (Figura 5) [42]. ANXA1 é composta por 346 resíduos de aminoácidos e 37 kDa [42,46,47]. No seu N-terminal, Met¹ é removido e Ala² é N-acetilado [42,48]. ANXA1 consiste em duas regiões diferentes: a denominada cauda, a qual abrange uma pequena região do domínio N-terminal (de Ala² até Asp⁴³); e o domínio C-terminal (de Pro⁴⁴ até Gly³⁴⁴), também chamado de domínio central (ou *core domain*) [42,46] (Figura 5).

O domínio central (o qual é compartilhado pelos membros da família anexina) contém 4 sub-domínios semelhantes (com exceção da ANXA6, a qual contém 8), e cada um possui aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos. Cada sub-domínio é composto por cinco hélices [42,46] (Figura 5). Os 4 sub-domínios são organizados de forma cíclica, o sub-domínio I seguido do IV, do II e do III (Figura 5 - A) [42,46]. Esta estrutura se assemelha a um disco achatado com uma superfície ligeiramente convexa [46]. O lado convexo contém locais de ligação de Ca^{2+} e fica de frente para a membrana quando a anexina está associada perifericamente com fosfolipídeos carregados negativamente (Figura 5 - B). O lado côncavo da ANXA1 aponta para longe da membrana e fica acessível para interações com o domínio N-terminal ou com parceiros de ligação [42,43,49].

O domínio N-terminal, em contraste com o *core domain*, possui a sequência extrema-

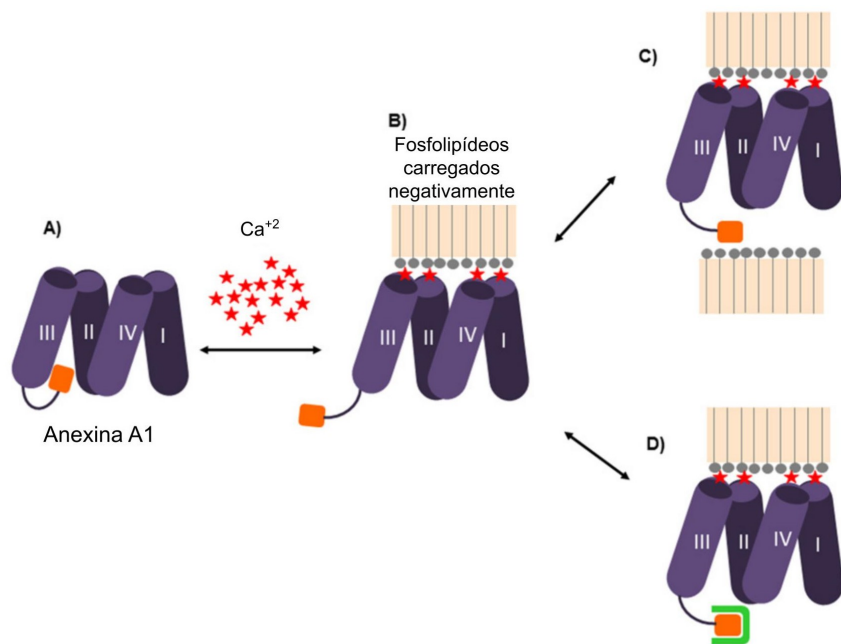


Figura 5: Estrutura representativa da proteína Anexina A1 (ANXA1) e ligação à membrana (A) Na ausência de Ca^{2+} , a ANXA1 é apresentada como um domínio central (com 4 subdomínios organizados de forma cíclica) e um domínio N-terminal (em laranja) enterrado próximo ao sub-domínio III (no lado côncavo da proteína, em locais opostos à ligação de Ca^{2+}). Já na presença de Ca^{2+} e na ligação à membrana, (B) o domínio N-terminal é exposto, permitindo que sua α -hélice anfipática (Ala2-Asn16) interaja com (C) um segundo sítio fosfolipídico causando agregação da membrana ou com (D) um parceiro proteico (em verde). Na presença de Ca^{2+} , ANXA1 sofre mudança conformacional permitindo a ligação à fosfolípidos através da região central e exposição do motivo N-terminal (Figura 5 - B) [42,46]. Figura adaptada de [42].

mente variável em comprimento e sequência dos resíduos de aminoácidos, em relação à família das anexinas [42]. Este domínio confere especificidade e atividade fisiológica a cada anexina [42, 50]. Um estudo cristalográfico de ANXA1 de comprimento total revelou que os primeiros 26 aminoácidos do domínio N-terminal formam duas α -hélices, Ala2-Asn16 e Glu18-Lys26, que são reciprocamente inclinadas (60°) em Glu17 (Figura 6) [42,46]. O peptídeo não estruturado Ser27-Asn43 desempenha o papel de um ligante entre os domínios N-terminal e central [42, 46].

3.1.3 Ac2-26 Anexina A1

A compreensão dos mecanismos da inflamação e a descoberta de mediadores endógenos anti-inflamatórios instiga as possibilidades terapêuticas para novos tratamentos de processos inflamatórios, devido aos possíveis efeitos colaterais dos tratamentos atuais [3, 34, 51]. Um mediador endógeno anti-inflamatório que tem atraído a atenção de pesquisadores é a proteína Anexina A1 (ANXA1) [3, 34, 51].

A região N-terminal da anexina A1 que compreende os resíduos 2 à 26 (Ac₂₋₂₆), figura 6, é bem descrita na literatura e apresenta os mesmos efeitos biológicos, como modulador de processos inflamatórios, que a proteína em comprimento total [40, 42, 46, 51]. A ANXA1 é frequentemente clivada em seu domínio N-terminal em várias células [42].

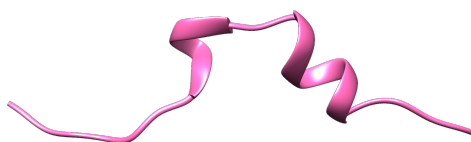


Figura 6: Estrutura de NMR do peptídeo Ac 2-26, derivado da proteína Anexina A1 (ANXA1). Apresenta-se aqui uma das 20 estruturas obtidas por NMR (código de entrada do PDB: 5VFW) [40]. Cujá sequência: AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVK [40, 43].

3.2 Motivação e Objetivos – Biofísica Molecular

Células são maquinarias complexas com vários componentes se rearranjando o tempo todo. A inflamação crônica fornece um microambiente favorável para a tumorigênese, o que pode direcionar o desenvolvimento e progressão do câncer [2,3]. Entender como as proteínas envolvidas em processos inflamatórios atuam e se interagem é um objeto de estudo, e interesse, de vários grupos de pesquisa.

Neste trabalho busca-se caracterizar a interação físico-química do peptídeo de anexina A1 (Ac₂₋₂₆), o qual é descrito como um modulador endógeno anti-inflamatório, com o composto Piperlongumina, o qual apresenta várias propriedades farmacológicas, destacando-se as atividades anticâncer e anti-inflamatória [10,11]. A interação do peptídeo Ac₂₋₂₆ com PL foi investigada utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência.

As análises deste capítulo é parte de uma colaboração com outros grupos de pesquisa onde gerou-se o trabalho intitulado "*Biological and physical approaches on the role of pipartine (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].

3.3 Princípios Espectroscópicos de Fluorescência

3.3.1 Características Gerais

A emissão de fluorescência é caracterizada como um processo espontâneo, e ocorre através da desexcitação de fluoróforos que estão em um estado quântico eletronicamente excitado devido à absorção de fótons. Nas proteínas, os fluoróforos intrínsecos são os resíduos de aminoácidos aromáticos (Tryptofano - Trp, Tirosina - Tyr e Fenilalanina - Phe) [52–54].

O fenômeno da fluorescência é caracterizado por parâmetros como: rendimento quântico, tempo de vida e intensidade [53]. Neste trabalho será analisado a intensidade de emissão de fluorescência (I_F) a um dado comprimento de onda de excitação, tem-se então:

$$I_F = n_{FE} \cdot E_F \quad (1)$$

Nesta equação, n_{FE} é o número de fótons emitidos por fluorescência e E_F é a energia do fóton.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) é a razão do número de fótons emitidos por fluorescência pelo número de fótons absorvidos ($\Phi_F = n_{FE}/n_{FA}$), portanto, I_F e Φ_F são proporcionais. Já o tempo de vida da fluorescência (τ) é o tempo médio do fluoróforo no estado excitado antes do decaimento para o estado fundamental [53].

3.3.2 Absorção de Luz e Lei de Beer-Lambert

A absorção de fótons por elétrons induz a excitação de uma molécula, neste fenômeno a energia absorvida pela molécula é igual a soma das energias absorvidas pelos níveis de energia eletrônica, vibracional e rotacional. Estes três níveis são responsáveis pela liberação de energia no fenômeno de fluorescência, portanto compreender a absorção da luz por uma amostra é necessário no estudo de espectroscopia de fluorescência [53].

O espectro de absorção é caracterizado por dois parâmetros: o comprimento de onda máximo (λ_{max}) e o coeficiente de extinção molar (ε) calculado geralmente no λ_{max} , onde as moléculas tem maior absorção [52, 53]. O coeficiente de extinção molar é assim denominado

devido ao fato de que quando a luz atravessa uma solução, ela é parcialmente absorvida e, conseqüentemente, sua intensidade é suprimida [53].

A concentração de uma amostra pode ser calculada através da análise de sua absorbância (ou densidade óptica). Um feixe de luz monocromática incide sobre uma solução em uma cubeta de quartzo, cujo comprimento do caminho óptico é determinado pela dimensão da cubeta, a luz ao atravessá-la será parcialmente absorvida e o espectrofotômetro registrará a intensidade da luz transmitida (Figura 7) [53].

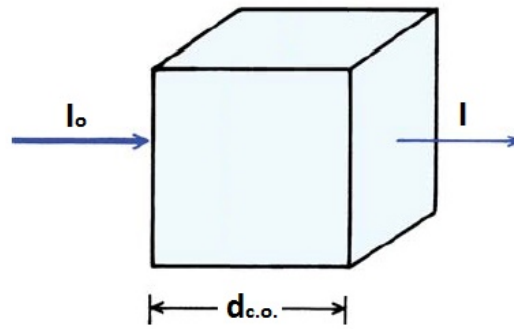


Figura 7: Absorção da luz monocromática ao atravessar uma amostra. I_o , I e $d_{c.o.}$ são as intensidade de luz incidente e transmitida e o comprimento do caminho óptico, respectivamente [52].

A transmitância ($I_{Transmitancia}$) é descrita pela razão entre a intensidade de luz transmitida (I) pela intensidade de luz incidente (I_o). O gráfico da transmitância versus o comprimento do caminho óptico ($d_{c.o.}$), para três amostras com concentrações diferentes ($[C]$), indica que a transmitância é proporcional ao exponencial de $[C]d_{c.o.}$ (Figura 8) [53].

Ou seja,

$$I_{Transmitancia} = \frac{I}{I_o} \quad (2)$$

$$I_{Transmitancia} \propto e^{-[C]d_{c.o.}} \quad (3)$$

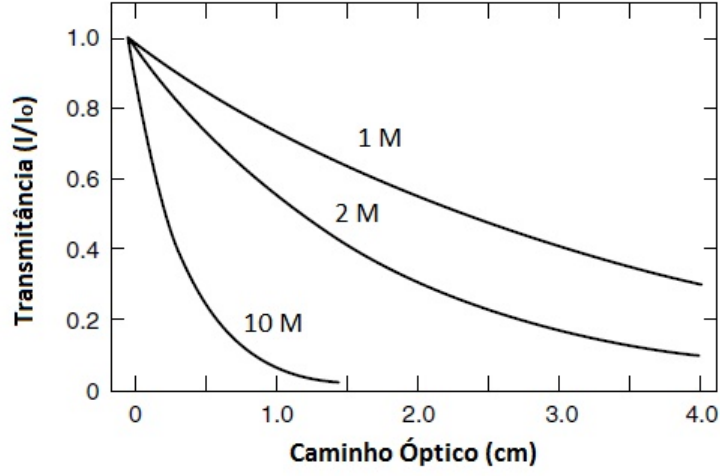


Figura 8: Variação da transmitância ($I_{Transmitancia}$) com relação ao comprimento de caminho óptico ($d_{c.o.}$) para três concentrações de amostras (1, 2 e 10 M) [53].

Substituindo a equação 2 na equação 3, tem-se:

$$\frac{I}{I_o} \propto e^{-[C]d_{c.o.}} \quad (4)$$

Aplicando a função logarítmica neperiana:

$$\ln \left(\frac{I}{I_o} \right) \propto \ln (e^{-[C]d_{c.o.}}) \quad (5)$$

$$\ln \left(\frac{I}{I_o} \right) \propto -[C]d_{c.o.} \quad (6)$$

Igualando através da constante de proporcionalidade (β):

$$\ln \left(\frac{I}{I_o} \right) = -\beta[C]d_{c.o.} \quad (7)$$

Multiplicando por (-1):

$$-\ln \left(\frac{I}{I_o} \right) = \beta[C]d_{c.o.} \quad (8)$$

$$\ln \left(\frac{I_o}{I} \right) = \beta[C]d_{c.o.} \quad (9)$$

Transformando em logaritmo decimal:

$$\ln \left(\frac{I_o}{I} \right) = \log_e \left(\frac{I_o}{I} \right) = \frac{\log_{10} \left(\frac{I_o}{I} \right)}{\log_{10} (e)} = \frac{\log \left(\frac{I_o}{I} \right)}{\log (e)} = \beta[C]d_{c.o.} \quad (10)$$

Rearranjando:

$$\log \left(\frac{I_o}{I} \right) = \beta[C]d_{c.o.} \log(e) = \beta[C]d_{c.o.} 0.4343 = \frac{\beta[C]d_{c.o.}}{2.302} \quad (11)$$

Substituindo $\frac{\beta}{2.302}$ por ε :

$$\log \left(\frac{I_o}{I} \right) = \varepsilon[C]d_{c.o.} \quad (12)$$

Portanto,

$$-\log(I_{Transmitancia}) = \log \left(\frac{I_o}{I} \right) = \varepsilon[C]d_{c.o.} = DO = Abs \quad (13)$$

Nesta equação DO é a densidade óptica e Abs é a absorbância, ambas são grandezas adimensionais. A concentração ($[C]$) é dada em molar (M), o comprimento do caminho óptico ($d_{c.o.}$) em centímetro (cm) e o coeficiente de extinção molar (ε) em $M^{-1}cm^{-1}$ [53].

A relação entre o coeficiente de extinção molar, a concentração da amostra, e a espessura do caminho óptico é caracterizada pela lei de Beer-Lambert (Equação 14), a qual indica que a absorbância é diretamente proporcional à concentração da amostra, para sistemas diluídos [52, 53].

$$Abs = \log \left(\frac{I_o}{I} \right) = \varepsilon[C]d_{c.o.} \quad (14)$$

3.3.3 Filtragem Interna

O efeito de filtragem interna foi identificado por Stokes ao observar que a luz UV ao atravessar uma solução de quinina era atenuada após a emissão, ou seja, sua intensidade diminui, não mais causando o brilho azulado. Esse fenômeno ocorre devido à dissipação da energia absorvida através de energia térmica, energia de colisão com as moléculas do solvente, e também a transferência de energia para outras moléculas na solução [52, 53].

No espectrofluorímetro usual o feixe de emissão é registrado perpendicularmente ao feixe de excitação. Considerando que a emissão é detectada no centro da cubeta, tem-se que o feixe incidente vai passar por metade do comprimento do caminho da cubeta (caminho óptico) antes da emissão ser gerada e o feixe de emissão deve também atravessar a metade do comprimento do caminho da cubeta antes de ser detectado [53]. Devido o sistema, a intensidade da emissão observada (F_{obs}) será subestimada, portanto deve-se fazer uma correção desta auto-absorção pela solução, ou seja, para este efeito de filtragem interna [53].

Uma resposta não linear da fluorescência é obtida e a correção da intensidade de fluorescência, devido ao efeito de filtragem interna, é realizada utilizando a equação 15:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{(A_{ex}+A_{em})/2} \quad (15)$$

Nesta equação, F_{corr} e F_{obs} são as intensidades de fluorescência corrigida e observada, respectivamente. A_{ex} e A_{em} são as absorbâncias no comprimento de onda de excitação e no comprimento de onda de emissão, respectivamente [53].

3.3.4 Supressão de Fluorescência

A diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra é denominada supressão de fluorescência. A supressão pode ocorrer por inúmeros processos, mas os mecanismos de supressão são geralmente classificados por estático ou dinâmico, onde ambos requerem contato molecular entre o fluoróforo e o supressor. Na supressão dinâmica o fluoróforo no estado excitado é desexcitado, retornando ao estado fundamental sem emissão de fótons, após o contato com alguma molécula supressora, porém, sem a formação de complexos. Já na supressão estática, o supressor entra em contato com o fluoróforo no estado fundamental e forma um complexo não fluorescente. Portanto, informações sobre sistemas bioquímicos podem ser obtidas com auxílio da análise das supressões, pois os mecanismos indicam o processo pelo qual a supressão ocorre [52, 53].

A diminuição da intensidade de fluorescência em função do aumento da concentração de supressor é descrita pela equação de Stern-Volmer (Equação 16) [52, 53]:

$$\frac{F_o}{F} = 1 + \tau_o K_q [Q] = 1 + K' [Q] \quad (16)$$

Nesta equação F e F_o são as intensidades de fluorescência na presença e na ausência de supressor, respectivamente. τ_o é o tempo de vida do fluoróforo na ausência de supressor (para o triptofano τ_o é aproximadamente 6ns). K_q é a constante de supressão bimolecular, K' é a constante de supressão de Stern-Volmer; e $[Q]$ é a concentração do supressor [52, 54].

Pela análise de Stern-Volmer (Equação 16), apresentada pela fração $\frac{F_o}{F}$ versus $[Q]$, espera-se um comportamento linear; entretanto este comportamento não determina o mecanismo

de supressão, pois em ambos mecanismos a supressão é proporcional à concentração do supressor. Para distingui-los a condição ideal de medida seria a fluorescência com resolução temporal, mas variações como viscosidade e temperatura podem elucidar tal mecanismo de supressão [52, 53].

Na supressão estática o tempo de vida médio de fluorescência analisado na presença (τ) e ausência de supressor (τ_o) serão iguais, porque apenas as moléculas fluorescentes são observadas, ou seja, os fluoróforos livres têm o tempo de vida inalterado. Portanto, neste caso, a intensidade da fluorescência e o rendimento quântico diminuem, mas o tempo de vida da fluorescência não muda ($\frac{\tau_o}{\tau} = 1$) [52, 53].

Na supressão dinâmica o tempo de vida médio de fluorescência na presença de supressor será menor do que na ausência, porque neste caso há uma perda parcial de energia das moléculas de fluoróforo ao colidirem com as moléculas do supressor. Portanto, a intensidade de fluorescência, o rendimento quântico e o tempo de vida diminuem ($\frac{F_o}{F} = \frac{\tau_o}{\tau}$) [1, 52, 53, 55].

Conforme o aumento da temperatura, a difusão molecular será mais rápida e a supressão de intensidade de fluorescência será mais evidente (supressão dinâmica) (Figura 9). Entretanto a supressão da intensidade de fluorescência no caso estático será menor conforme o aumento da temperatura porque os complexos fracamente ligados são dissociados, ou seja, alguns dos fluoróforos que não estavam fluorescendo (devido a formação do complexo) passam a fluorescer (Figura 9) [52, 53]. Neste trabalho, a supressão da intensidade de fluorescência de emissão foi analisada em sistemas com diferentes temperaturas.

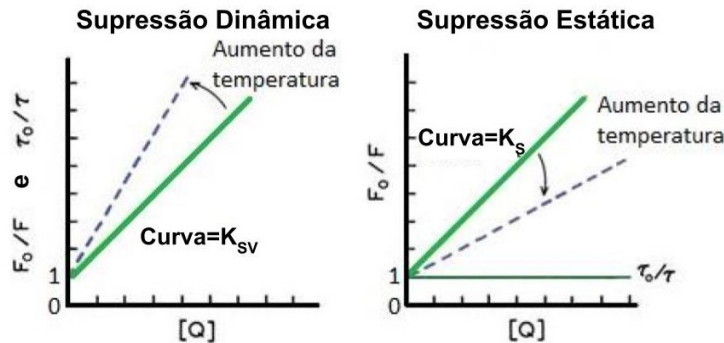


Figura 9: Comparação dos mecanismos de supressão dinâmico e estático [52].

Dinâmica A supressão dinâmica ocorrerá quando o fluoróforo for desexcitado, voltando ao estado fundamental, através de um encontro difuso com alguma outra molécula em solução durante o tempo de vida do estado excitado, ou seja, este é um processo dependente do tempo.

Na equação 16, a constante K' indica a sensibilidade do fluoróforo a uma molécula supressora. Um fluoróforo no interior de uma biomolécula é geralmente inacessível a supressores solúveis em água, portanto o valor de K' é baixo. Entretanto valores maiores de K' são encontrados quando o fluoróforo está livre em solução ou próximo à superfície de uma biomolécula [52].

Diferenciando a constante K' (Equação 16) para o mecanismo de supressão dinâmica e estática utilizam-se K_{SV} e K_S , respectivamente. Portanto, no caso dinâmico tem-se:

$$\frac{F_o}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (17)$$

Nesta equação K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer para o mecanismo dinâmico.

Estática A supressão estática ocorre quando os fluoróforos formam complexos (no estado fundamental) com supressores, e o complexo ao absorver luz retorna, imediatamente, ao estado fundamental sem emissão de fótons, ou seja, não fluorescendo [53].

Portanto, substituindo a constante K' por K_S na equação 16, para o caso estático tem-se:

$$\frac{F_o}{F} = 1 + K_S[Q] \quad (18)$$

Nesta equação K_S é a constante de supressão de Stern-Volmer para o mecanismo estático. Utiliza-se a equação 16 para análise da constante de Stern-Volmer em sistemas com diferentes temperaturas (T) e, conseqüentemente, para determinar o tipo de mecanismo de supressão [52, 53].

Pressupondo que existam n locais de interações do supressor com o peptídeo, a equação da reação pode ser descrita como [53, 56]:



Portanto, tem-se a constante de afinidade (K_a):

$$K_a = \frac{[Q_n P]}{[Q_F]^n [P_F]} \quad (20)$$

Nesta equação, $[Q_F]$ e $[P_F]$ são as concentrações do supressor e do peptídeo livres, respectivamente. $[Q_n P]$ é a concentração do supressor-peptídeo na interação [52, 53].

A concentração total de peptídeo ($[P_T]$) pode ser descrita como:

$$[P_T] = [Q_n P] + [P_F] \quad (21)$$

Isolando $[Q_n P]$:

$$[Q_n P] = [P_T] - [P_F] \quad (22)$$

Substituindo na equação 20:

$$K_a = \frac{[P_T] - [P_F]}{[Q_F]^n [P_F]} \quad (23)$$

A intensidade de fluorescência na ausência do supressor (F_o) é proporcional à concentração de peptídeo total $[P_T]$. Assumindo que a intensidade de fluorescência (F) é diretamente proporcional à concentração de peptídeo livre $[P_F]$, tem-se:

$$\frac{F_o}{F} = \frac{[P_T]}{[P_F]} \quad (24)$$

Rearranjando a equação 23:

$$K_a = \frac{[P_T]}{[Q_F]^n [P_F]} - \frac{[P_F]}{[Q_F]^n [P_F]} \quad (25)$$

$$K_a = \frac{[P_T]}{[Q_F]^n [P_F]} - \frac{1}{[Q_F]^n} \quad (26)$$

$$K_a [Q_F]^n = \frac{[P_T]}{[P_F]} - 1 \quad (27)$$

Substituindo a equação 27 na equação 24:

$$\frac{F_o}{F} - 1 = K_a [Q_F]^n \quad (28)$$

$$\frac{F_o - F}{F} = K_a [Q_F]^n \quad (29)$$

A concentração total do supressor ($[Q_T]$) pode ser descrita como:

$$[Q_T] = [Q_nP] + [Q_F] \quad (30)$$

Considerando $[Q_nP] \ll [Q_T]$. Assume-se que $[Q_T] = [Q_F]$ [53]. Portanto, a equação 29 pode ser escrita como:

$$\frac{F_o - F}{F} = K_a [Q_T]^n \quad (31)$$

Aplicando a função logarítmica:

$$\log \left(\frac{F_o - F}{F} \right) = \log (K_a [Q_T]^n) \quad (32)$$

Rearranjando:

$$\log \left(\frac{F_o - F}{F} \right) = \log (K_a) + \log ([Q_T]^n) \quad (33)$$

$$\log \left(\frac{F_o - F}{F} \right) = \log (K_a) + n (\log ([Q_T])) \quad (34)$$

Com esta relação duplo-logarítmica, $\log \left(\frac{F_o - F}{F} \right)$ versus $\log ([Q_T])$, determina-se a constante de afinidade (K_a) e o número de sítios de interação com o peptídeo (n).

3.3.5 Termodinâmica da Interação

As forças moleculares que regem as interações são geralmente: ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, eletrostáticas e hidrofóbicas. Os modos de interação podem ser indicados através das análises dos parâmetros termodinâmicos (variações da energia livre de Gibbs (ΔG°), entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°)) [57]. Para determinar a energia livre de Gibbs utiliza-se a equação:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad (35)$$

Nesta equação, T e R são a temperatura e a constante universal dos gases ($8.31 J mol^{-1} K^{-1}$), respectivamente. K_a é a constante de afinidade, obtida utilizando-se a equação 34, para cada temperatura (T). Com isso, substituindo o valor de K_a na equação 35, obtém-se o valor de ΔG° .

Igualando a equação 35 a seguinte relação da energia livre de Gibbs:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (36)$$

Obtém-se:

$$-RT \ln K_a = \Delta H^o - T\Delta S^o \quad (37)$$

Rearranjando:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^o}{RT} + \frac{\Delta S^o}{R} \quad (38)$$

Para identificar o valor de ΔH^o , utiliza-se a relação de van't Hoff (Equação 38) e gera-se o gráfico de $\ln K_a$ *versus* o inverso da temperatura ($\frac{1}{T}$). O ajuste linear deste, nos permite estimar o valor de ΔH^o . Em seguida, para determinar os valores de $T\Delta S^o$, deve-se substituir os valores de ΔG^o e ΔH^o , conforme obtidos anteriormente, na equação 36. Não se recomenda obter os valores da contribuição entrópica diretamente através do intercepto com o eixo das ordenadas pela relação de van't Hoff (Equação 38), embora matematicamente não esteja errado, fisicamente é preferível fazê-lo como aqui descrito, dado que não haveria dependência à situação de temperatura infinita, ou seja, no limite em que $\frac{1}{T}$ tende a zero no gráfico.

3.4 Materiais e Métodos – Biofísica Molecular

3.4.1 Compostos e Soluções

A amostra de Piperlongumina ($C_{17}H_{19}NO_5$; CAS number: 20069-09-4) foi doada pelo colaborador Dr. Daniel Pereira Bezerra. O peptídeo Ac₂₋₂₆ da anexina A1 foi obtido da Thermo Scientific (Waltham, Ma, USA). O fosfato de sódio dibásico (CAS Number: 7558-79-4), ácido cítrico anidro (CAS Number: 77-92-9) e cloreto de sódio (CAS Number: 7647-14-5) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co., e álcool etílico foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea LTDA. Água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação de água (Direct-Q UV-3) da Millipore. O peptídeo Ac₂₋₂₆ da anexina A1 (MM = 3,05 kDa) foi diluído em solução aquosa de tampão fosfato (MM = 141,96 g/mol) de 50 mM, contendo 150 mM de cloreto de sódio dibásico (MM = 58,44 g/mol) e ajustado com ácido cítrico anidro (MM = 192,12 g/mol) para pH fisiológico. As soluções estoques de piperlongumina (MM = 317,3 g/mol) foram preparados em álcool etílico nas análises de biofísica molecular.

3.4.2 Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Visível

O espectro de absorção UV-Vis foi coletado no espectrofotômetro Cary-3E (Varian, Palo Alto, CA) à temperatura ambiente (298K). Duas cubetas de quartzo, cada uma com caminho óptico igual a 10 mm de comprimento, foram utilizadas nos experimentos. Os espectros foram coletados varrendo os comprimentos de onda entre 200 e 500 nm, com tempo de integração de 0.333 s. O software Cary foi utilizado para coletar os dados medidos. Com esta técnica pode-se determinar as concentrações das soluções estoques.

3.4.3 Espectroscopia de Fluorescência

As medidas foram realizadas no espectrofluorímetro de estado estacionário ISS PC1 (Champaign, IL, USA) equipado com banho térmico Neslab RTE-221. Uma cubeta de quartzo de 3 ml e com caminho óptico de 10 mm foi utilizada nos experimentos. A largura das fendas de excitação e de emissão foram ajustadas para o comprimento de 8.0 nm. Os

aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) são capazes de absorver luz na faixa do UV, mas com o comprimento de onda em 295 nm evita-se a excitação dos resíduos de tirosina e de fenilalanina e proporciona a excitação do resíduo de triptofano [52]. Os comprimentos de onda de excitação monitorados foram 280 e 295 nm e os espectros de emissão foram analisados até 500 nm, com resolução de 1.0 nm, e cada ponto de emissão coletado é a média de 10 acumulações sucessivas. O software Vinci foi utilizado para coletar os dados medidos.

Estudos da Supressão de Fluorescência Nas análises do mecanismo de supressão de fluorescência e das constantes de interação, pequenas alíquotas de piperlongumina foram adicionadas na solução do peptídeo de Anexina Ac₂₋₂₆ (3,0 mL) a 5 μ M. A concentração de piperlongumina variou de 0 a 15,6 μ M com incrementos de 1,2 μ M. As medidas foram realizadas às temperaturas de 288, 298 e 308K. Em todas os experimentos, o volume final de álcool etílico no tampão foi $\leq 0.6\%$, a correção da fluorescência de fundo foi obtida pela subtração do espectro de emissão do tampão fosfato de cada espectro medido. As correções dos efeitos de filtragem interna também foram realizadas, conforme descrito na seção 3.3.3.

3.5 Resultados e Discussões – Biofísica Molecular

Nesta seção apresenta-se e discute-se os resultados à nível molecular da interação da piperlongumina com o peptídeo Ac₂₋₂₆ da proteína Anexina A1.

3.5.1 Supressão de Fluorescência

A figura 10 apresenta espectros de emissão de fluorescência do peptídeo na presença de diferentes concentrações de PL. A diminuição da intensidade dos espectros conforme o aumento da concentração de PL é denominada como supressão da intensidade de fluorescência. A interação entre a Piperlongumina e o peptídeo da Anexina A1 (Ac₂₋₂₆) foi investigada através da supressão da intensidade de fluorescência do peptídeo Ac₂₋₂₆ (5,0 μ M) em função do aumento da concentração de PL, adicionando 1,2 μ M a cada titulação até atingir 15,6 μ M de PL (Figura 10). A emissão de fluorescência do peptídeo (Figura 10) foi analisada a partir da excitação:

- 1) dos resíduos de tirosina e triptofano: $\lambda_{ex} = 280\text{nm}$;
- 2) do resíduo de triptofano: $\lambda_{ex} = 295\text{nm}$.

A figura 10 apresenta a supressão da intensidade de fluorescência dos espectros de emissão para temperatura de 298K, no entanto, os ensaios foram monitorados em 3 temperaturas diferentes, 288, 298 e 308K. Com esses dados, é possível analisar o mecanismo da supressão através da equação de Stern-Volmer (Equação 16). Segundo a equação, ao gerar o gráfico de $\frac{F_0}{F}$ versus [PL], obtém-se um comportamento linear. Tal comportamento foi observado para cada ensaio, conforme apresenta a figura 11. Ao realizar o ajuste linear dos dados, pode-se determinar a constante de Stern-Volmer (Tabela 1).

A partir dos resultados da Figura 11 e Tabela 1, observa-se que com o aumento da temperatura, há um aumento da constante de Stern-Volmer, *i.e.*, as temperaturas e as constantes de Stern-Volmer são diretamente proporcionais, o que indica que o mecanismo de supressão é dinâmico, segundo as condições das análises [58].

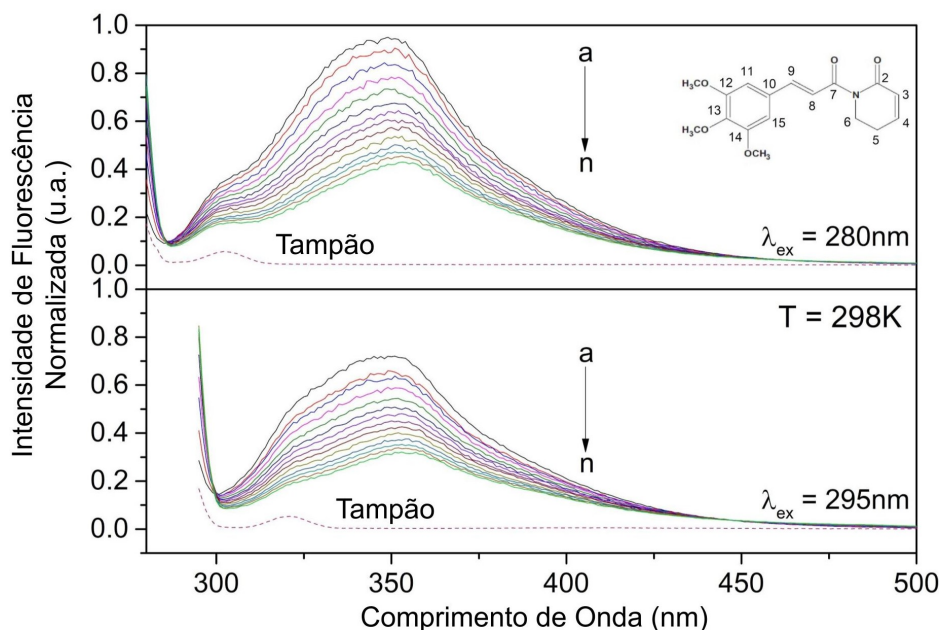


Figura 10: Espectro de emissão do peptídeo ($5,0 \mu\text{M}$) na ausência (a) e presença de piperlongumina (b-n: $1,2\text{-}15,6\mu\text{M}$) nos comprimentos de onda de excitação de 280 nm (acima) e 295 nm (abaixo). A seta indica o progresso da titulação, com incrementos de $1,2 \mu\text{M}$ (pH fisiológico e $T = 298 \text{ K}$). A linha tracejada representa o espectro de emissão do tampão fosfato. Inserção: estrutura química da piperlongumina.

3.5.2 Constantes de Afinidade

Com os dados obtidos da supressão de fluorescência do peptídeo Ac_{2-26} por diferentes concentrações de PL (Figura 10), pode-se determinar a constante de afinidade (K_a) e o número de sítios de interação com o peptídeo (n) utilizando a equação 34, em condições de equilíbrio entre as moléculas [1, 2, 56, 59, 60]. Segundo a equação, ao gerar o gráfico de $\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right)$ versus $\log([PL])$, e com o ajuste linear dos mesmos (Figura 12), obtém-se os valores de K_a e n . Esses valores são apresentados na Tabela 1 para cada temperatura estudada ($288, 298$ e 308K), em cada λ_{ex} analisado, o que permite monitorar o microambiente do peptídeo mais especificamente.

Segundo os valores de K_{SV} , na tabela 1, observa-se que a variação de K_{SV} , entre temperaturas, seja aproximadamente a mesma ($K_{SV308-298K} \approx K_{SV298-288K} \approx 1,2$ para $\lambda_{ex} = 280\text{nm}$; e $K_{SV308-298K} \approx K_{SV298-288K} \approx 1,0$ para $\lambda_{ex} = 295\text{nm}$). Observa-se, também, um aumento de uma ordem de grandeza para K_a referente ao sinal da região dos resíduos

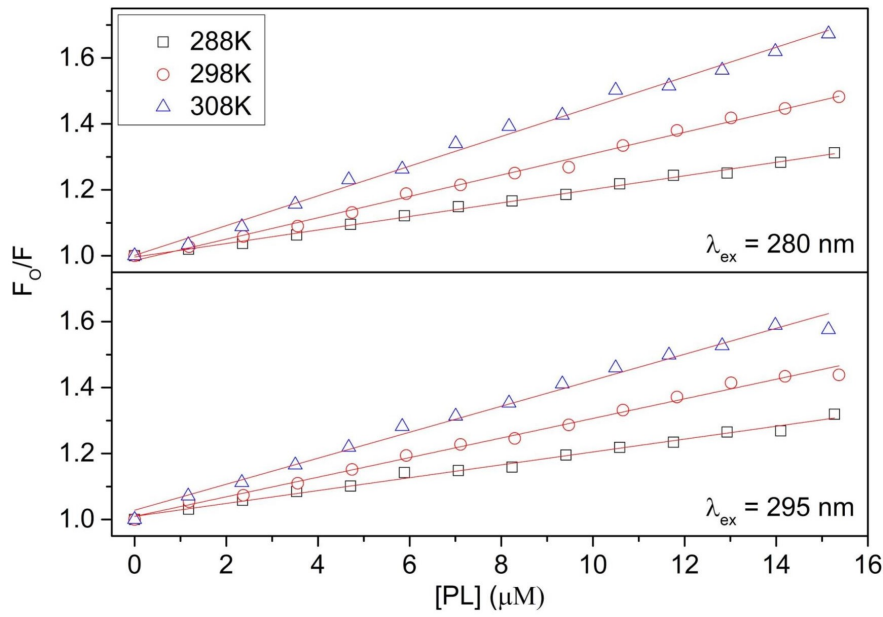


Figura 11: Gráfico de Stern-Volmer - análise da supressão da intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação de 280 nm (acima) e 295 nm (abaixo) do peptídeo Ac₂₋₂₆ pela titulação de piperlongumina (PL). Análises em diferentes temperaturas 288, 298 e 308K, e pH fisiológico. F_o : intensidade de fluorescência na ausência de PL e F : intensidade de fluorescência na presença de PL.

de aminoácidos aromáticos ($\lambda_{ex} = 280\text{nm}$), em comparação à região, somente, do resíduo do triptofano ($\lambda_{ex} = 295\text{nm}$). Segundo as análises duplo-logarítmicas, os dados obtidos referem-se à interação entre o peptídeo e uma molécula de PL, $n \approx 1$, em condições de equilíbrio.

3.5.3 Análises Termodinâmicas

O modo de interação pode ser indicado através da análise dos parâmetros termodinâmicos (variações da energia livre de Gibbs (ΔG°), entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°)) [57]. Utilizando a equação 35, e os valores obtidos (Tabela 1), determina-se os valores da energia livre de Gibbs (ΔG°) da interação entre o peptídeo-Ac₂₋₂₆ e piperlongumina [1, 61].

Com os dados obtidos da constante de afinidade de Ac₂₋₂₆-PL (Tabela 1), e segundo a equação de van't Hoff (Equação 38), gera-se o gráfico $\ln(K_a)$ versus $\frac{1}{T}$. O ajuste linear (gráficos inseridos na Figura 12) nos permite estimar os valores de ΔH° a partir da

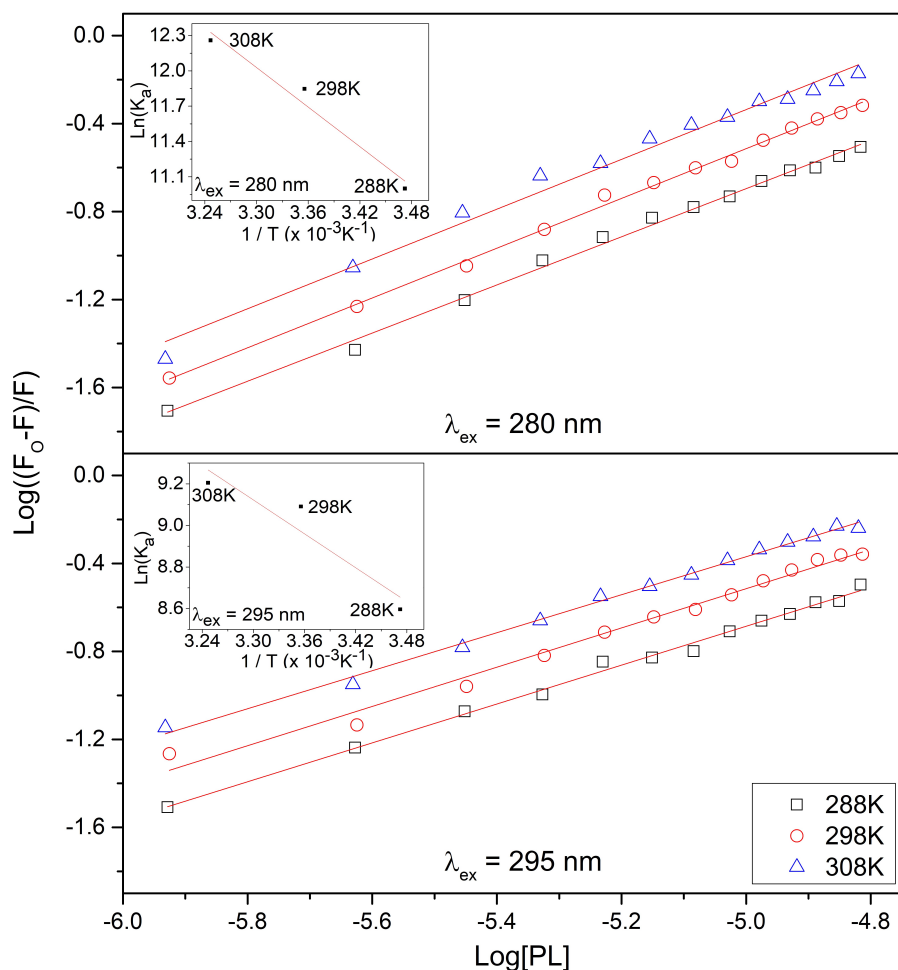


Figura 12: Gráficos duplo-logarítmicos em diferentes temperaturas (288, 298 e 308K) da interação entre a PL e Ac_{2-26} , de acordo com a Equação 34. $[Ac_{2-26}] = 5\mu M$ e $[PL] = 1,2-15,6\mu M$ (com incrementos de $1,2\mu M$). Em diferentes comprimentos de onda de excitação de 280 nm (acima) e 295 nm (abaixo). Inserção: Análises de Van't Hoff de acordo com a Equação 38 . T: temperatura, K_a : Constante de Afinidade

Tabela 1: Constante de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), constante de afinidade (K_a) e números de sítios de interação com o peptídeo (n) da interação entre Ac₂₋₂₆ e PL em pH fisiológico e 288, 298 e 308K.

λ_{ex} (nm)	T(K)	K_{SV} ($\times 10^4$ M ⁻¹)	K_a ($\times 10^4$ M ⁻¹)	n
280	288	2,1	6,0	1,1
	298	3,2	14,0	1,1
	308	4,5	21,1	1,1
295	288	2,0	0,5	0,9
	298	3,0	0,9	0,9
	308	3,9	1,0	0,9
Coeficiente de correlação $\geq 0,985$.				

inclinação da reta do ajuste. Os valores são apresentados na Tabela 2 para os experimentos analisados em diferentes λ_{ex} .

Já a contribuição entrópica é determinada utilizando a equação 36, a partir dos parâmetros (ΔG° e ΔH°) obtidos previamente.

Os parâmetros termodinâmicos determinados são apresentados na Tabela 2. A energia livre negativa ($\Delta G^\circ < 0$) indica que a interação PL–Ac₂₋₂₆ é um processo espontâneo. A principal fonte para o valor da energia livre foi proveniente de uma maior contribuição entrópica, juntamente com uma contribuição entálpica menor. Assim, a interação é conduzida entropicamente. As análises das contribuições energéticas, variações de entalpia positiva ($\Delta H^\circ > 0$) e entropia positiva ($\Delta S^\circ > 0$) indicam que as forças dominantes na interação entre a PL e Ac₂₋₂₆ são não-específicas, como por exemplo hidrofóbicas [57].

Tabela 2: Parâmetros termodinâmicos (variações de energia livre de Gibbs (ΔG°), entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°)) da interação PL-Ac₂₋₂₆ em pH fisiológico e temperaturas 288, 298 e 308K. Análises em diferentes comprimento de onda de excitação (λ_{ex})

λ_{ex} (nm)	T(K)	ΔH° (kJ · mol ⁻¹)	ΔG° (kJ · mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (kJ · mol ⁻¹)
280	288	46,5	-26,3	72,9
	298		-29,3	75,9
	308		-31,4	77,9
295	288	22,6	-20,6	43,1
	298		-22,5	45,1
	308		-23,6	46,1

Coeficiente de correlação $\geq 0,794$.

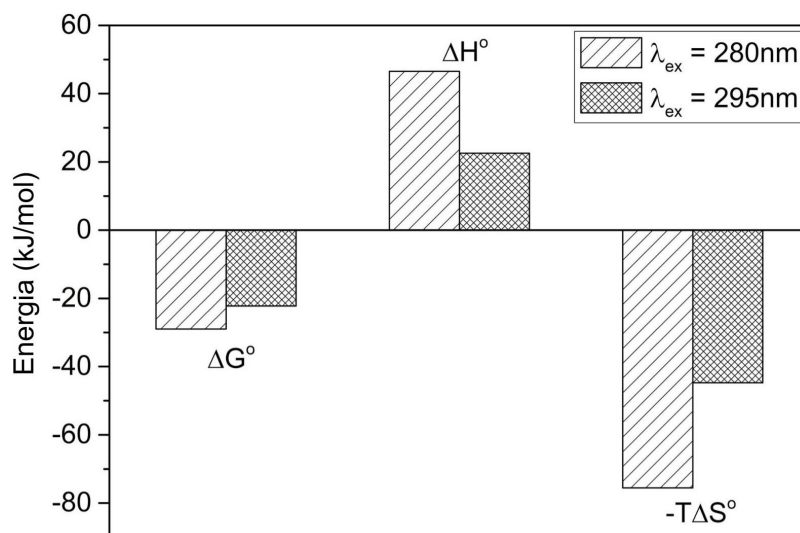


Figura 13: Contribuição energética da interação entre Ac₂₋₂₆ e piperlongumina nos comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) de 280 nm e 295 nm. ΔG° : variação da energia livre de Gibbs, ΔH° : variação entálpica, ΔS° : variação entrópica, T: temperatura.

3.6 Conclusões – Biofísica Molecular

Este estudo descreve a interação entre a piperlongumina e o peptídeo Ac₂₋₂₆ da proteína Anexina A1, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência de estado fundamental. Pelas análises dos dados de fluorescência, determinou-se o mecanismo de supressão como dinâmico. As análises da contribuição energética são as principais evidências para descrever o modo de interação; portanto, os parâmetros termodinâmicos foram determinados e o resultado sugere que o processo de interação entre PL e Ac₂₋₂₆ é espontâneo ($\Delta G^\circ < 0$) e é dirigido por forças não-específicas, como por exemplo hidrofóbicas ($\Delta H^\circ > 0$ and $\Delta S^\circ > 0$) [57]. A interação entre a PL e a Ac₂₋₂₆ sugere uma condição inicial favorável para análises, em conjunto, no nível celular [2].

4 Biofísica Celular

Neste capítulo, o qual é dado maior enfoque nesta tese, apresenta-se o estudo da influência de PL em nível celular. Encontra-se uma introdução sobre células na temática do câncer e suas propriedades mecânicas. PL têm sido descrita na literatura como um agente desestabilizador de MT. Diante disso, buscou-se verificar a influência de PL nas células HeLa em diferentes condições de ensaios utilizando AFM. Descreve-se uma breve teoria de AFM com foco nos parâmetros de análise, a força de passo (SF, *step force*). Na metodologia, apresenta-se os protocolos detalhados para a realização dos experimentos, o desenho do experimento foi desenvolvido junto à professora Dra. Ching-Hwa Kiang, no departamento de Física e Astronomia da *Rice University* em Houston-TX (EUA), durante aproximadamente 2 anos do estágio de doutoramento, o qual deu origem à uma próspera colaboração. Os resultados, aqui provenientes, encontram-se também depositados no *BioRxiv* [12], e submetidos ao *Scientific Reports*. Além disso, interessantes associações com a literatura foram discutidas. Os parâmetros obtidos são originados diretamente do equipamento do AFM, e com isso é possível abordar sistemas clássicos (de análises citotóxicas, de migração e proliferação celular) de uma forma pouco explorada, quantitativamente através da força.

4.1 Introdução – Propriedades Mecânicas Celulares

4.1.1 Células Cancerígenas

O câncer, não é apenas uma doença de crescimento celular descontrolado, mas também de migração celular descontrolada [16]. A migração das células cancerígenas para longe do tumor primário é denominada metástase e é um problema desafiador para os oncologistas [16,62]. A invasão celular é um processo que tem grande importância na cascata metastática, o qual ocorre via várias atividades biológicas e envolve a interação da célula tumoral com o meio circundante [62].

As células no processo de invasão tumoral devem primeiro atravessar a membrana basal (MB) [16,62]. MB é uma barreira natural entre o epitélio e o estroma, uma rede de matriz extracelular (ECM) povoada por vários outros tipos de células que circundam o tecido

(Figura 14). As células em metástase migram através do estroma para alcançar os vasos sanguíneos ou linfáticos, de onde podem ser transportadas para outros órgãos [16, 62].

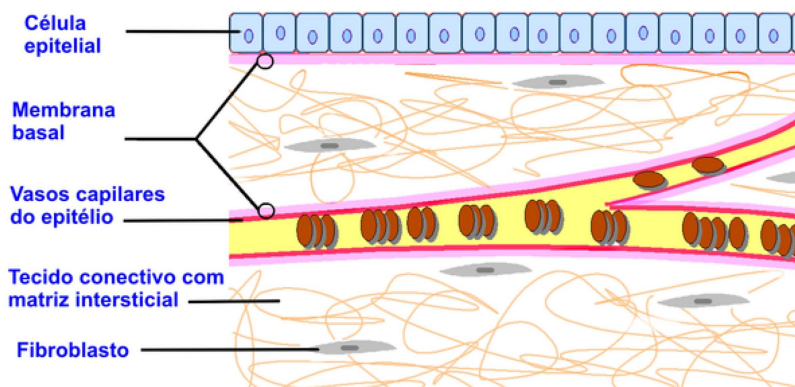


Figura 14: Tecido epitelial com outras células e matrizes extracelulares [63]. Figura adaptada de [63].

Estudos *in vivo*, apresentaram células tumorais migrando de diferentes formas, individualmente como células únicas, como fluxos de células fracamente ligadas, e como coletivos aderentes bem organizados [16]. Em estudos de patologia de câncer humano, as células de tumores epiteliais tendem a migrar coletivamente [16]. Estudos *in vitro* identificaram fatores intrínsecos que regulam o modo de migração e a morfologia [16]. O aumento das interações célula-célula via caderinas e ligação de ECM celular via integrinas pode promover a migração coletiva em células cancerígenas [16, 64]. Além de fatores intrínsecos, o microambiente desempenha um papel significativo na determinação do modo e morfologia de migração das células cancerígenas [16].

4.1.2 Organização Celular: Matriz extracelular

Em 1960, Paul A. Weiss, um biólogo celular e do desenvolvimento, propôs a estrutura da célula como um todo integrado e não apenas como fragmentos e frações celulares; um sistema ordenado hierarquicamente, de espécies mutuamente interdependentes de moléculas, agrupamentos moleculares e entidades supramoleculares [65, 66].

Na maioria dos organismos multicelulares, as células residem em um ambiente denominado matriz extracelular (ECM) [67]. A matriz extracelular fornece um suporte estrutural afim de manter as células juntas para formar um tecido, e também permite que as células

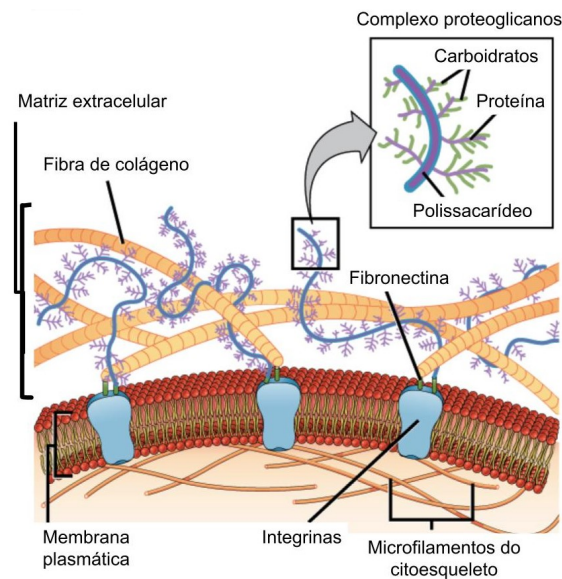


Figura 15: Principais componentes da matriz extracelular de células animais [68,69]. Figura adaptada de [69].

dentro do tecido se comuniquem umas com as outras através de sinais biomecânicos e bioquímicos que controlam a homeostase do tecido [67,68]. A matriz extracelular (Figura 15) consiste em proteínas estruturais (fibrosas) para fornecer flexibilidade (por exemplo colágeno); proteoglicanos para estabilizar os fatores de crescimento e o espaço tridimensional devido sua alta capacidade de ligação à água; e glicoproteínas, como as integrinas para regular a adesão celular e a sinalização entre as células e o ECM [68]. Essas moléculas interagem entre si e com as células locais que as produzem (Figura 15) [68].

A topologia e composição exata de cada ECM do tecido é governada durante o processo de desenvolvimento do tecido, que é controlado pelas células e pelo ambiente em desenvolvimento [67]. As células têm a capacidade de regular forças e controlar a absorção e deposição de componentes químicos, que podem remodelar a ECM; as alterações na ECM, por sua vez, podem afetar as funções celulares [67].

4.1.3 Organização Celular: Citoesqueleto

As células são preenchidas com uma rede tridimensional de filamentos de proteínas que compreendem a estrutura do citoesqueleto [65,70]. Tal rede de biopolímeros, consiste em três componentes principais: microfilamentos de actina, filamentos intermediários e

microtúbulos (Figura 16) [65, 71, 72].

Em células eucarióticas, forças podem atuar através dos polímeros do citoesqueleto para controlar as propriedades mecânicas, as forças de adesão e o comportamento celular [65, 73]. O citoesqueleto não é uma estrutura fixa cuja função pode ser entendida isoladamente; mas sim, uma estrutura dinâmica e adaptativa cujos polímeros componentes e proteínas reguladoras estão em fluxo constante [65].

O citoesqueleto desempenha três funções: conecta a célula física e bioquimicamente ao ambiente externo (Figura 15); organiza espacialmente o conteúdo da célula (Figura 16); e gera forças coordenadas que permitem que a célula se mova e mude de forma (Figura 18) [65].

Componentes do Citoesqueleto

Filamentos de Actina Os filamentos de actina (Figura 16 - B) são os principais contribuintes para a migração celular, exercem força na parte frontal da célula e contração na parte traseira [65, 77].

Em contraste com a actina, os microtúbulos geralmente não estão associados à geração de força durante a migração, mas sim à polarização celular e aderências focais [77].

Microtúbulo Os microtúbulos (MT) (Figura 16 - A) são os principais componentes do citoesqueleto [30]. São tubos ocos, cujo diâmetro interno é em torno de 14 nm, com comprimento de até micrômetros [30]. MTs são formados pela polimerização de heterodímeros de α/β -tubulina (Figura 17) [30]. O papel dos MTs pode ser dividido em três categorias: participação na motilidade celular por meio de sua própria mecânica, via transdução de sinal e como estrutura de transporte (Figura 16 - D) [77].

Os microtúbulos prontamente se polimerizam e despolimerizam nas células, e sofrem dois tipos interessantes de dinâmica chamados de instabilidade dinâmica e esteira [30, 32]. A instabilidade dinâmica, com suas extremidades alternando constantemente entre períodos crescendo ou encurtando rapidamente, é caracterizada por alguns parâmetros principais:

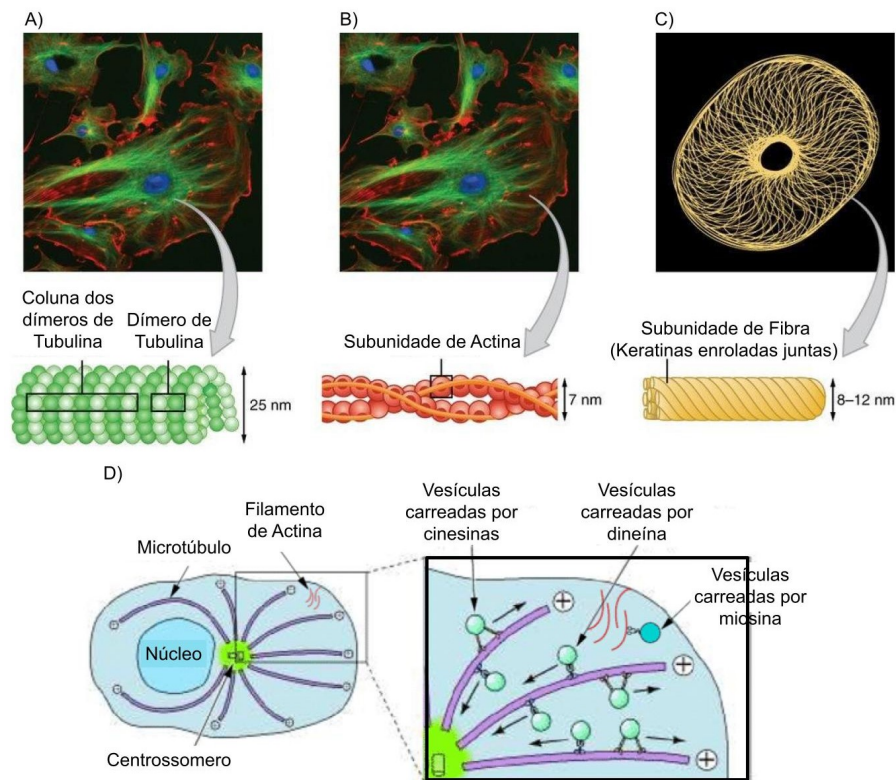


Figura 16: Estrutura do citoesqueleto e suas principais subdivisões. A) microtúbulo em verde (dímeros de tubulina em destaque), estrutura com diâmetro de aproximadamente 25nm; B) microfilamentos de actina em vermelho (subunidades de actina em destaque), estrutura com diâmetro de aproximadamente 7nm; em azul: DNA nuclear; C) filamentos intermediários (subunidade da fibra em destaque), estrutura com diâmetro em torno de 8-12nm [70]. D) Proteínas motoras transportando vesículas ao longo de filamentos do citoesqueleto [74]. Figura adaptada de [74–76].

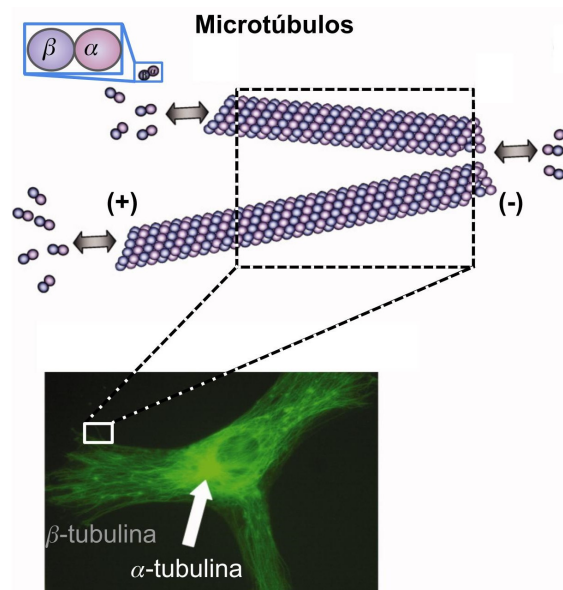


Figura 17: Organização estrutural dos microtúbulos. As extremidades dos microtúbulos apresentam dinâmicas diferentes, às quais estão relacionadas às subunidades de tubulina, onde as regiões com extremidades de β -tubulina (+) são mais dinâmicas do que as regiões de α -tubulina (-). A seta branca indica o centro organizador do microtúbulo, onde as extremidades (-) são geralmente ancoradas. Figura adaptada de [30].

as taxas de eventos de crescimento e de encurtamento, a duração da pausa, a frequência de transição do crescimento ou pausa para o encurtamento (chamada catástrofe) e a frequência de transição do encurtamento para a pausa ou crescimento (chamado de resgate). Por outro lado, a esteira é um processo no qual heterodímeros de tubulina fluem continuamente de uma extremidade dos MTs para a outra. [30]

Para realizar várias funções celulares, o MT pode sofrer profundas modificações morfológicas [30]. A dinâmica dos microtúbulos é regulada durante o ciclo celular por reguladores celulares endógenos [32]. Durante a interfase, a rede do MT deve garantir a manutenção da forma celular, mediar o tráfego intracelular e contribuir para a motilidade celular, enquanto durante a mitose, ela deve se reorganizar completamente para formar o fuso mitótico e orquestrar a segregação cromossômica, formando novas células (Figura 18) [30,32].

Tal propriedade dinâmica está envolvida em todas as funções celulares dos MTs e são os principais alvos dos agentes de ligação à tubulina (TBAs) [30]. Muitos fármacos antitumorais e compostos naturais alteram a dinâmica da polimerização dos microtúbulos,

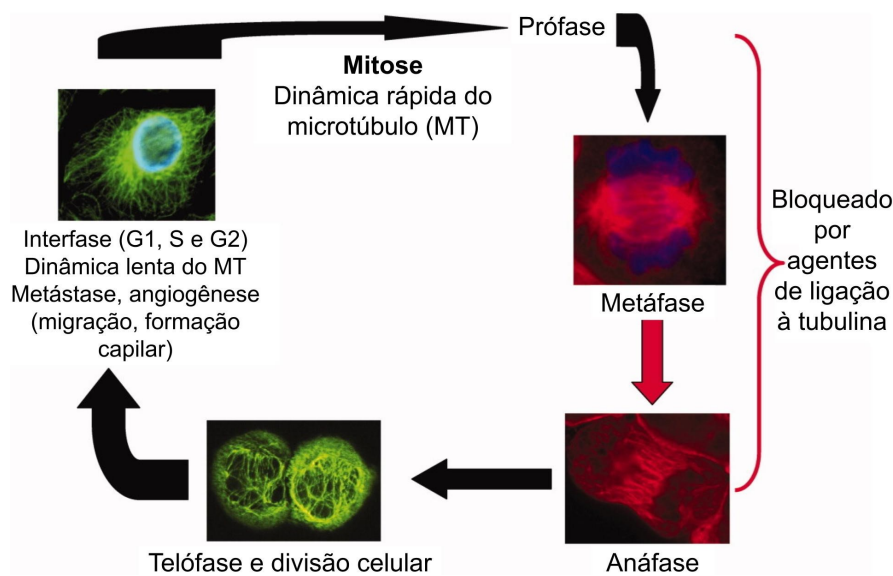


Figura 18: Ciclo celular - organização estrutural dos microtúbulos (MTs). MTs na metáfase e anáfase (em vermelho). MTs na telófase e interfase (em verde). DNA cromossômico (em azul). Figura adaptada de [30].

bloqueando a mitose e, conseqüentemente, induzindo a morte celular por apoptose [32, 77].

4.1.4 Mecânica Celular

As propriedades mecânicas da célula são majoritariamente determinadas pelo citoesqueleto [71, 72]. O citoesqueleto é uma estrutura complexa, heterogênea e dinâmica, o que torna o estudo de suas propriedades extremamente difícil [71]. As duas principais abordagens para esse problema são: estudos *in vitro* de redes modelo projetadas para mimetizar as propriedades de componentes individuais do citoesqueleto e estudos das propriedades mecânicas das próprias células [71].

O movimento celular é crítico em muitas doenças, incluindo desenvolvimento de tumor e metástase, onde as células de um tumor primário se movem e se espalham para outras partes do corpo [78]. A migração celular é um processo cíclico impulsionado principalmente pela polimerização de actina e contratilidade actomiosina, e pode ser dividido em três etapas: protrusão da borda dianteira do corpo celular, adesão da borda dianteira e desprendimento da borda traseira da célula, seguida pela contração do citoesqueleto para impulsionar o corpo celular para frente conforme a célula se move [78].

O entendimento das propriedades mecânicas de células cancerígenas pode ajudar a aperfeiçoar o combate à metástase [17, 30, 73, 79, 80]. Tendo em vista a importância do citoesqueleto na disseminação e migração das células tumorais, sua disfunção pode resultar em instabilidade cromossômica, parada mitótica e morte celular; tornando-os alvos comuns e úteis para o desenho de drogas [77, 81].

4.1.5 Agentes de Ligação à Tubulina (TBA)

Fármacos anticancerígenos podem atuar de diferentes maneiras, e por meio do citoesqueleto pode ser uma delas [30]. Os microtúbulos (MT) são importantes em muitos eventos celulares e desempenham um papel crucial na divisão celular e, como tal, são alvos de fármacos contra o câncer [30].

Os agentes de ligação à tubulina (TBAs, *tubulin-binding agents*; também conhecidos como antimicrotúbulos ou agentes de ligação aos microtúbulos) estão entre as drogas quimioterápicas mais amplamente utilizadas no tratamento do câncer pois interferem na função do MT, inibem a proliferação de células cancerígenas ao impedir a correta formação do fuso mitótico, necessário para a congruência e segregação cromossômica precisa (Figura 18) [30, 32]. Sua eficácia foi demonstrada na pesquisa clínica para o tratamento de uma ampla variedade de cânceres humanos, incluindo mama, pulmão, ovário, próstata e cânceres infantis [30, 82, 83].

Os TBAs são geralmente divididos em duas categorias distintas, em relação aos seus efeitos na rede do MT [30]:

Agentes estabilizadores de MT São compostos que se ligam na parede do MT, e estimulam a polimerização dos microtúbulos em altas concentrações [30, 32]. Dentre os agentes estabilizadores de MT clinicamente úteis incluem os taxanos, paclitaxel (TaxolTM) e docetaxel (TaxotereTM), bem como, fármacos quimioterápicos mais novos, as epotilonas [30, 32].

Agentes desestabilizadores de MT São compostos que se ligam à subunidade β -tubulina do heterodímero α/β -tubulina, e inibem a polimerização de microtúbulos em altas concentrações [30, 32]. Dentre os agentes desestabilizadores de MT incluem os fármacos quimioterápicos: alcalóides vinca, criptoficinas, halicondrinas, estramustina e colchicina, além dos novos compostos clinicamente utilizados, como 2-metoxiestradiol (2-ME2), dolastatina e as combretastatinas [30, 32]. Recentemente a piperlongumina tem sido caracterizada como um agente desestabilizador de MT [29, 30].

É importante ressaltar que, em concentrações mais baixas, essas drogas têm um mecanismo de ação comum; eles suprimem a dinâmica dos microtúbulos sem alterar significativamente a massa dos microtúbulos na célula [30, 32]. Os fármacos se ligam à diversos locais na tubulina e em diferentes posições dentro do microtúbulo e têm diversos efeitos na dinâmica dos microtúbulos. No entanto, por seu mecanismo comum de supressão da dinâmica dos microtúbulos, os TBAs bloqueiam a mitose na transição metáfase-anáfase e induzem a morte celular por apoptose (Figura 18) [30, 32, 77].

Apesar do sucesso clínico, a eficácia dos TBAs são frequentemente limitadas pelo surgimento de células tumorais resistentes. Dentre os mecanismos de resistência, destaca-se o fenótipo de multirresistência (MDR) e as alterações do sistema tubulina/MT [30]. Com isso, nos últimos anos, tem havido um grande foco na identificação e compreensão de alterações no alvo celular dos TBAs, o sistema tubulina/MT, a fim de selecionar e direcionar medicamentos para terapia personalizada [30].

4.1.6 Células HeLa

As células cancerígenas selecionadas neste estudo foram células HeLa, as quais são de uma linhagem de células epiteliais do organismo humano, denominadas imortais e derivadas de um tumor cancerígeno do colo do útero (adenocarcinoma). As células HeLa foram estabelecidas em 1951 a partir de uma biópsia tecidual de Henrietta Lacks, e foi a primeira linhagem de células humanas a sobreviver e crescer em laboratório [84]. Durante a maior pandemia mundial de poliomielite (início da década de 1950), Jonas Salk idealizou a primeira vacina, mas testá-la exigiria uma grande quantidade de células vivas, as células HeLa foram então utilizadas efetivamente para os testes, poupando, na época, a vida de

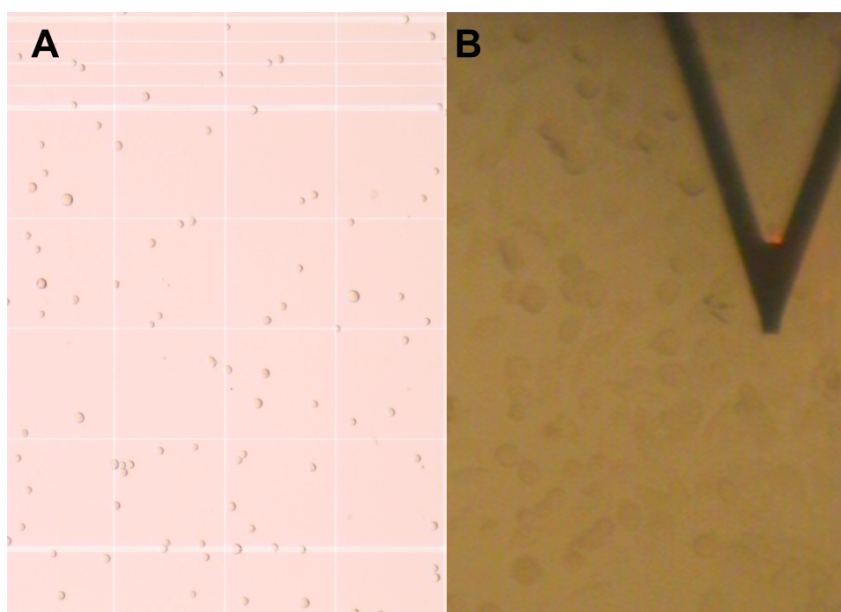


Figura 19: Imagens de células HeLa por microscopia óptica. A) Células em suspensão na câmara de Neubauer (hemocitômetro). B) Células anexas ao substrato, durante análise pelo AFM.

milhares de macacos [84]. As células HeLa permitiram vários avanços nos estudos científicos genéticos, virais, foi a primeira célula clonada, além de várias outras contribuições para ciência médica, mas algumas questões éticas, raciais e socioeconômicas têm, também, recebido atenção desde a década de 1950 [84]. Atualmente uma estátua em homenagem à Henrietta Lacks tem sido permanentemente exposta na *University of Bristol*, no Reino Unido.

4.2 Motivação e Objetivos – Biofísica Celular

A dinâmica do citoesqueleto gera efeitos na motilidade e divisão celular, e nos processos mecânicos gerais, cujas disfunções podem resultar na morte celular [65, 81, 85]. Como os microtúbulos são importantes componentes da rede do citoesqueleto, analisar a influência de agentes que interagem com a tubulina (TBAs) em células cancerígenas, é de interesse científico. TBAs auxiliam na inibição da proliferação de células cancerígenas, promovem a morte celular pela supressão da instabilidade dinâmica dos microtúbulos e interferem no transporte intracelular [17, 30–32]. Recentemente, um composto natural, piperlongumina (PL), foi apresentado como um agente desestabilizador de microtúbulos com efeitos antiproliferativos em células de câncer de mama [29]. 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]. Portanto, entender a biomecânica de células cancerígenas sob influência de compostos que alvejam o citoesqueleto pode auxiliar no desenvolvimento de fármacos mais eficazes.

Neste trabalho, investiga-se padrões biomecânicos da célula cancerígena cervical humana (HeLa) sob influência de PL. Estudos sugerem que a citotoxicidade da PL é dependente da dose aplicada em células HeLa [4, 5]. A literatura relata o EC_{50} (concentração que inibe o crescimento celular em 50%) como 2,7 e 7,1 μM da PL–HeLa [4–6]. Apesar dos avanços na compreensão das propriedades bioquímicas, do sistema PL–HeLa, faltam informações sobre suas características mecânicas.

O objetivo deste trabalho é caracterizar quantitativamente a influência da piperlongumina nas propriedades mecânicas das células HeLa. Os parâmetros biofísicos em análise são as forças de passo (SF, *step force*) as quais foram obtidas utilizando o microscópio de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*), durante o processo de afastamento da sonda após aproximação da superfície celular, para obter os gráficos de força-distância (Figura 27).

Portanto, pretende-se obter uma compreensão mecânica integrada da célula; observando a orquestração do citoesqueleto em escala de força (SF) induzida pelo microambiente e pela ação do fármaco (PL). Ou seja, monitorando o SF de células HeLa sob influência das

concentrações e dos tempos de ação de PL, e da sensibilidade celular aos substratos de cultura (superfície onde as células crescem, os quais possuem diferentes rigidezes).

4.3 Princípios de Microscopia de Força Atômica – Biofísica Celular

4.3.1 Forças nos Sistemas Biológicos

As células são materiais complexos e dinâmicos cujo entendimento de suas propriedades mecânicas, apesar dos recentes avanços, continuam como um desafio [71]. As forças mecânicas desempenham um papel essencial em muitos processos biológicos. Por exemplo, proteínas motoras geram pinças de força para se mover ao longo dos filamentos do citoesqueleto (Figura 16 - D); o citoesqueleto gera forças coordenadas para ajustar a morfologia da célula; a polimerização da actina empurra a membrana celular para formar protrusões, favorecendo a migração celular; as forças de tração impulsionam a migração das células [30, 74, 78].

Elucidar os detalhes da força envolvida nos sistemas biológicos auxilia na compreensão dos seus mecanismos. As propriedades mecânicas de células únicas têm sido investigadas utilizando as técnicas de microscopia de força atômica e pinça óptica (*optical tweezers*) [9, 73, 79, 80, 86, 87]. O microscópio de força atômica (AFM) tem sido uma ferramenta poderosa para investigar a viscosidade, superfície, rigidez, e propriedades adesivas de células em condições próximas à fisiológica [85, 86, 88–91].

A força mecânica é uma grandeza obtida utilizando o AFM, tal valor representa um parâmetro inespecífico, ou seja, independente dos tipos de moléculas, células e tecidos em estudo [79]. A técnica de AFM também pode ajudar a entender como a mecânica celular é afetada por drogas, dessa forma, favorece a compreensão das influências dos medicamentos nas células [85, 88].

4.3.2 Microscópio de Força Atômica (AFM)

Existem dois tipos principais de microscópios de varredura por sonda (SPM, *scanning probe microscopy*): Microscópio de Varredura por Tunelamento (STM, *scanning tunneling microscopy*) e Microscópio de Força Atômica (AFM, *atomic force microscopy*); os quais se baseiam nas interações mecânicas locais entre a sonda e a superfície da amostra [92].

A primeira técnica, introduzida em 1982, foi a microscopia de varredura por tunelamento

(STM) [92]. Utilizando o microscópio de tunelamento, o parâmetro observado é a queda exponencial da corrente de tunelamento entre uma ponteira metálica e uma superfície condutora em função do aumento da distância [92]. Esta técnica apresenta algumas limitações para o uso generalizado ligadas à natureza da amostra, as quais precisam ter características específicas (condutividade elétrica), e às condições experimentais (em vácuo) [92]. Para superar as restrições da aplicação de STM, em 1986, um novo progresso na área de SPM foi alcançado com o desenvolvimento da microscopia de força atômica [92]. Esta técnica é baseada no monitoramento das forças de atração e repulsão entre uma ponteira afiada e a amostra em função de sua distância (Figura 27), a imagem de AFM pode ser obtida independentemente das características da amostra e das condições ambientes. Portanto, o AFM pode ser aplicável para visualizações de diferentes amostras, desde ciências materiais até biológicas. [92]

4.3.3 Teoria - AFM

Basicamente, o aparato de AFM é composto de um *cantilever*, um sistema óptico e um *scanner* piezoelétrico para detecção da força (Figura 27 - A). A sonda do AFM (*cantilever*) é pressionada na amostra para detectar a força devido à deflexão do *cantilever*, a qual é determinada pela Lei de Hooke:

$$F = -k\delta z \quad (39)$$

onde F é a força medida, k é a constante da mola do *cantilever* e δz é o deslocamento do *cantilever*.

A deflexão do *cantilever* é determinada pelo sistema óptico, um feixe de laser é refletido no cantilever, e coletado em um fotodetector. O feixe do laser se move com a deflexão do cantilever, resultando nas mudanças de tensão de saída do fotodetector e, portanto, convertido em deslocamento e força (Figura 27 - A).

AFM é utilizado em amostras celulares principalmente de duas maneiras, obtenção de imagens e estudos espectroscópicos de força [92]. Em geral, a medição da força pode ser classificada em dois tipos de experimentos - pressionando a superfície celular, onde

analisa-se a curva de aproximação; e puxando a superfície celular, onde a curva de retração é analisada. O foco desta tese é a análise da força de retração utilizando AFM para monitorar a força de passo em células cancerígenas na presença e na ausência de composto anticâncer, em várias condições do ensaio (Figura 27 - C).

AFM possui diferentes modos operacionais a serem selecionados dependendo da amostra, propósito e ambiente [92]. Os modos mais comuns são o de contato (*contact mode*) e o de toque (*tapping mode*).

O modo de contato é o modo em que o *cantilever* está em contato direto com a superfície da amostra. A deflexão do *cantilever* é detectada e medida [92, 93]. O modo de contato pode ser conduzido tanto em ar quanto em fluido. A vantagem do modo de contato é que ele é menos complexo de operar, no entanto, as desvantagens incluem danos à amostra e contaminação do *cantilever* [92, 93].

O modo de toque foi desenvolvido posteriormente para minimizar o impacto do *cantilever* na superfície da amostra [92, 93]. Neste modo, o *cantilever* oscila para cima e para baixo, tocando a superfície da amostra por um período muito curto, a amplitude da oscilação é normalmente medida [92, 93]. A vantagem deste modo é a diminuição dos danos à amostra, no entanto a varredura é relativamente lenta e requer mais habilidades operacionais [92, 93].

4.3.4 Calibração da Constante da Mola

A calibração da constante da mola (k) do *cantilever* do AFM é necessária antes de todos os experimentos de AFM para uma precisão das forças medidas, conforme ilustra a equação 39. Uma forma usual para a estimativa da constante da mola é através do método de flutuação térmica (*thermal noise*), o qual é utilizado na determinação do k para todos os experimentos nesta tese [94–96].

Assumindo que o *cantilever* se comporte como um oscilador harmônico, dado o teorema de equipartição da energia:

$$\left\langle \frac{1}{2} m \omega_0^2 z_0^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (40)$$

onde m é a massa oscilante, ω_0 é a frequência angular ressonante e z_0 é a amplitude de oscilação do *cantilever* e k_B é a constante de Boltzmann. Como,

$$\omega_0^2 = \frac{k}{m} \quad (41)$$

onde k é a constante da mola.

Substituindo a equação 41 na equação 40, tem-se:

$$\left\langle \frac{1}{2} m \left(\frac{k}{m} \right) z_0^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (42)$$

Isolando k :

$$k = \frac{k_B T}{\langle z_0^2 \rangle} \quad (43)$$

$\langle z_0^2 \rangle$ é estimado calculando a área abaixo de uma linha Lorentziana que se ajusta à densidade espectral de potência da flutuação térmica.

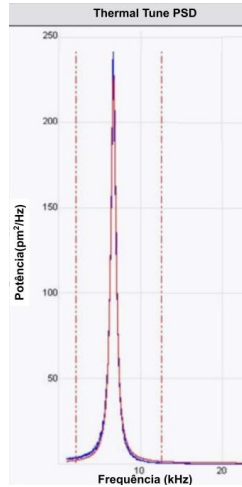


Figura 20: Ajuste Lorentziano à densidade espectral de potência (PSD) da flutuação térmica para o cálculo da constante da mola (k).

O controlador NanoScope V automatiza os cálculos de ajuste térmico. A constante de mola real de cada *cantilever* é calibrada antes do experimento pelo método do teorema de equipartição da energia (Equação 40).

4.3.5 *Pulling*: afastamento após contato na superfície celular

A tensão na membrana tem sido relacionada à um fator físico que limita ou controla as mudanças da forma celular, e podem ser iniciadas por forças produzidas devido a polimerização do citoesqueleto ou por atividades motoras [8,97].

No intuito de sondar as mudanças mecânicas de células, pode-se analisar a formação de nanotubos, por exemplo, após o contato entre uma sonda e a superfície celular [85]. A força total para extrair um nanotubo (F_t), neste processo, é a soma de todas as contribuições macromoleculares [85,98]. E pode ser escrita como:

$$F_t = F_{c-m} + F_{g-m} + F_m \quad (44)$$

onde F_{c-m} é a força de associação entre o citoesqueleto e a membrana; F_{g-m} é a força de associação entre o glicocálice e a membrana; e F_m é a força para puxar um nanotubo composto puramente de membrana celular [98].

Para compreender a força ao puxar a superfície celular, é interessante entender, primeiramente, o caso mais simples de uma força pontual induzida pela formação do nanotubo a partir de uma vesícula de fosfolipídeos (membrana pura). A força crítica necessária para manter o nanotubo estendido da superfície da vesícula de membrana pura (f_t , ou força estática), depende da tensão da membrana (σ), da constante de flexão (κ) e do raio do nanotubo (r) (Figura 21) pela relação [97,99]:

$$f_t = \frac{\pi\kappa}{r} + \sigma_m 2\pi r \quad (45)$$

A bicamada lipídica, geralmente apresenta propriedades de um fluido 2D, com resistência elástica do tipo sólido como:

- Resistência à curvatura, a qual é caracterizada por uma constante de flexão elástica (κ), que quantifica a força necessária para alterar o raio de curvatura de uma bicamada, da sua configuração de equilíbrio [97].

- Resistência à mudança de área, a qual é caracterizada pela tensão da membrana (σ), quantificada pela área média por molécula dentro do plano da membrana [97].

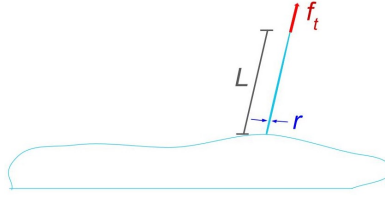


Figura 21: Esboço da formação do nanotubo na membrana celular com destaque para força f_t , a qual é sentida pela célula quando o comprimento do nanotubo é L , com raio r . A força necessária para puxar a amarra depende tanto da constante de flexão quanto da tensão da membrana [97].

Essas respostas elásticas são governadas pelo custo de energia livre associada com a deformação da bicamada lipídica, de uma maneira que aumente a exposição das cadeias acila ou anéis esteróides hidrofóbicos dos lipídios à água, ou que aumente as repulsões estéricas ou eletrostáticas entre os grupos de cabeça lipídica [97, 100–102].

Com isso, a energia livre do nanotubo pode ser escrita como [7]:

$$E_f = \pi\kappa\frac{L}{r} + \sigma 2\pi r L - f_t L \quad (46)$$

onde κ é a constante de flexão, σ é a tensão superficial, f_t é a força estática, r é o raio do nanotubo e L é o comprimento do nanotubo. Assume-se que a diferença de pressão entre a membrana interna e externa é pequena o suficiente para ser ignorada ($\rho = 0$) [7]. Para minimizar E_f , a tensão superficial atua reduzindo o raio, enquanto a constante de flexão atua contra isso [7]. Portanto, em equilíbrio, o raio e a força do nanotubo podem ser obtidos minimizando a energia livre [7]:

$$\frac{\partial E_f}{\partial r} = 0 \quad e \quad \frac{\partial E_f}{\partial L} = 0 \quad (47)$$

Analisando as derivadas,

$$\frac{\partial E_f}{\partial r} = -\pi\kappa\frac{L}{r^2} + \sigma 2\pi L = 0 \quad (48)$$

Isolando r :

$$\pi\kappa\frac{L}{r_0^2} = \sigma 2\pi L \quad (49)$$

$$\frac{r_0^2}{\pi\kappa L} = \frac{1}{\sigma 2\pi L} \quad (50)$$

$$r_0^2 = \frac{\pi\kappa L}{\sigma 2\pi L} \quad (51)$$

Portanto, em equilíbrio [7]:

$$r_0 = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}} \quad (52)$$

A fim de determinar a força do nanotubo na situação de equilíbrio (f_0), analisa-se a derivada:

$$\frac{\partial E_f}{\partial L} = \frac{\pi\kappa}{r} + \sigma 2\pi r - f_t = 0 \quad (53)$$

Isolando f_t :

$$f_0 = \frac{\pi\kappa}{r} + \sigma 2\pi r \quad (54)$$

Substituindo a equação 52:

$$f_0 = \frac{\pi\kappa}{\sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}}} + \sigma 2\pi \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}} \quad (55)$$

$$f_0 = \pi\kappa \sqrt{\frac{2\sigma}{\kappa}} + \sigma 2\pi \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}} \quad (56)$$

$$f_0 = \pi\sqrt{2\sigma\kappa} + \pi\sqrt{2\sigma\kappa} \quad (57)$$

Portanto, em equilíbrio, a força do nanotubo (ou a força de passo constante) da membrana pura pode ser escrita como [7, 8]:

$$f_0 = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa} \quad (58)$$

A equação 58 indica que a força de passo de uma membrana pura depende apenas da rigidez e da tensão de flexão da membrana. Apesar da simplicidade do modelo, o qual leva em conta a membrana pura, ele é o único modelo que explica a reação à ação da força. Os parâmetros elásticos que descrevem a flexão e o alongamento são afetados por interações com o citoesqueleto e proteínas de ligação à membrana periférica [97, 103, 104]. Ou seja, variações na organização da actina e na curvatura ou tensão da membrana estão relacionadas às mudanças na forma da célula, criação da polaridade da célula e ao mecanismo de motilidade [97, 105–107].

Isolando σ da equação 58, tem-se a expressão da tensão da membrana pura:

$$\sigma = \left(\frac{f_0}{2\pi} \right)^2 \frac{1}{2\kappa} = \frac{f_0^2}{8\kappa\pi^2} \quad (59)$$

No entanto, a força de passo (SF) medida a partir de experimentos de tração, puxando a superfície celular com a sonda do AFM, como no caso descrito nesta tese, é atribuída à contribuições da tensão da membrana, constante de flexão da bicamada e adesão membrana-citoesqueleto [98]. A tensão aparente pode ser então decomposta em tensão da membrana da bicamada puramente e adesão citoesqueleto-membrana, conforme ilustra a equação:

$$\sigma_{AP} = \sigma + \gamma_{c-m} = \frac{SF^2}{8\kappa\pi^2} \quad (60)$$

onde σ é a tensão da membrana, σ_{AP} é a tensão aparente da membrana, SF é a força de passo estática da superfície da célula, γ_{c-m} é o termo de adesão membrana-citoesqueleto e κ é a constante de flexão [98, 108]. Estudos anteriores demonstraram que o termo de adesão é responsável pela maior parte da tensão aparente, e a membrana pura contribui com menos de 25% [98, 108, 109]. Com isso, a força de passo obtida pelo AFM fornece uma maneira direta de estimar a tensão aparente da membrana das células [86, 108].

4.4 Materiais e Metodologia – Biofísica Celular

Nesta tese, encontra-se os protocolos utilizados para realização de experimentos em células utilizando microscopia de força atômica, para observar espectros de força das células HeLa em diferentes ensaios. As influências dos suportes de cultura celular e dos tratamentos com agente de ligação à tubulina (entidade do microtúbulo), foram analisadas. Os protocolos aqui apresentados foram elaborados junto à professora Dra. Ching-Hwa Kiang, na *Rice University*, durante o período de estágio de doutoramento.

4.4.1 Materiais e Soluções

Células de câncer cervical humano (HeLa; ATCC) foram cultivadas em meio contendo DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle Medium; Corning*), suplementado com 10% FBS (*Fetal Bovine Serum; Gibco*) e 1% Pen-Strep (Penicilina / Estreptomicina; Gibco), e incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Piperlongumina (C₁₇H₁₉NO₅; CAS number: 20069-09-4) foi doada pelo colaborador Dr. José Maria Barbosa-Filho e dissolvida em DMSO (Dimetilsulfóxido; ATCC) nas concentrações finais de 5, 10 e 15 μ M [10,19]. As concentrações finais de DMSO nos meios de cultura são inferiores à 0.5% [110]. Substratos macios com rigidez específica (0,5 e 16 kPa) foram doados pelo colaborador Dr. Ian Lian. O cantilever MLCT-O10 (Bruker) foi utilizado como sonda em experimentos de AFM.

4.4.2 Cultura Celular

Ao trabalhar com células deve-se seguir alguns protocolos de biossegurança, além de mantê-las vivas em condições apropriadas. Alguns guias para a cultura celular de mamíferos podem ser exploradas na literatura [111].

A amostra celular para realização dos experimentos de microscopia de força atômica é descrita à partir do descongelamento em banho térmico, e em seguida, solubilizada no meio de cultura celular suplementado – contendo DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle Medium; Corning*), 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum / Soro Fetal Bovino; Gibco*), e 1% de Pen-Strep (Penicillin – Streptomycin; Gibco) – para remoção da substância *cryo*-protetiva

através de centrifugação, e posterior cultura celular no *petri dish*, mantendo-o incubado a 37°C com atmosfera umidificada com 5% de CO₂ (Figura 22). Após a amostra na estufa atingir a confluência de, aproximadamente, 80% da superfície, deve ser feita a sub-cultura celular (Figura 23), possibilitando futuras utilizações.

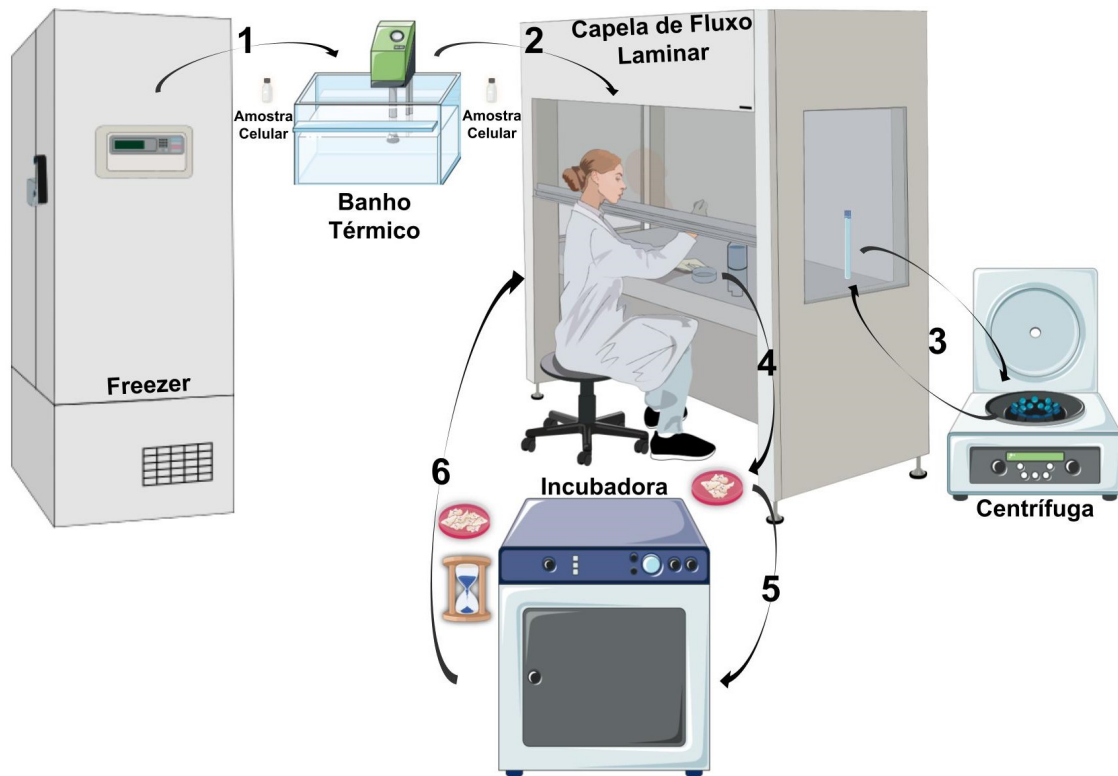


Figura 22: Representação dos passos de descongelamento à preparação da amostra de cultura celular. 1) As células (inicialmente congeladas à -80°C) passam pelo processo de descongelamento no banho térmico (37°C). 2) Na capela de fluxo laminar, adiciona-se o meio de cultura celular suplementado juntamente com a amostra recém descongelada. 3) A amostra é então centrifugada e remove-se o sobrenadante. 4) Realiza-se a cultura celular no *petri dish* e 5) o incuba até atingir a confluência de aproximadamente 80% da superfície, e então 6) deve-se realizar a subcultura celular (vide figura 23). Figura gerada pela autora utilizando os ícones de [112]

Para sub-cultura celular e preparação da amostra celular à ser utilizada no experimento de AFM (Figura 24), deve-se:

- 1º) Remover o meio de cultura do *petri-dish*;
- 2º) Lavar com PBS (*Phosphate Buffered Saline*);

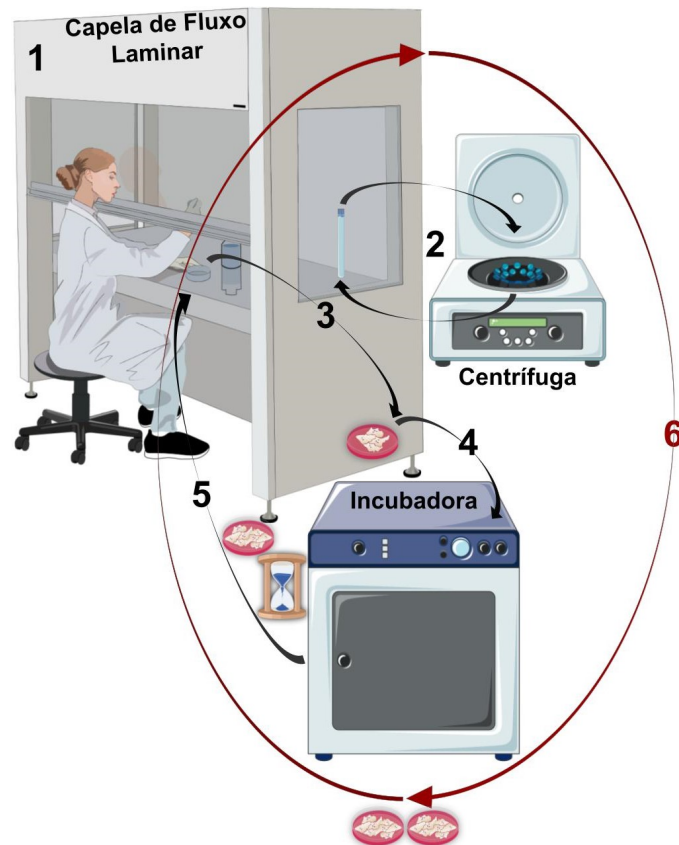


Figura 23: Ciclo esquemático da subcultura celular. Após a amostra atingir a confluência de aproximadamente 80% da superfície do *petri dish*, deve-se realizar a subcultura celular. 1) Na capela de fluxo laminar as células passam pelo processo de limpeza com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), dissociação com tripsina (geralmente faz-se necessário uma breve incubação), e adição do meio de cultura celular suplementado. 2) A amostra passa pelo processo de centrifugação e remove-se o sobrenadante; o péllete é ressuspenso com meio de cultura celular suplementado, e 3) sub-culturado em novo *petri dish*; 4) após esses processos é, então, incubado. 5) Ao atingir a confluência, a amostra é sub-culturada para futuras utilizações. 6) Esse ciclo se repete, e a população celular cresce em ordem exponencial. Figura gerada pela autora utilizando os ícones de [112]

- 3º) Adicionar Tripsina;
- 4º) Incubar (37°C com atmosfera umidificada com 5% de CO₂);
- 5º) Adicionar meio de cultura celular suplementado;
- 6º) Centrifugar (350 x g em temperatura ambiente);
- 7º) Remover o sobrenadante e re-suspender o pélete com as células, utilizando meio de cultura suplementado;
- 8º) Sub-cultura e Contagem Celular:
- 8.1) Preparação da amostra para sub-cultura em novo *petri dish* (Figura 23);
- 8.2) Contagem das células utilizando a câmara de *Neubauer* (Figura 24 - passo 4');
4');
- 8.2.1) Preparação da amostra para análise de microscopia de força atômica (AFM) em pequeno *petri dish* com substrato de rigidez específica.
- 8.2.1.1) Os discos de aço para AFM previamente limpos por banho ultrassônico são utilizados para anexar as superfícies (previamente recortadas no cortador a laser), as quais possuem rigidezes específicas (Figura 25), ao suporte magnético do AFM. Tal procedimento é necessário devido ao equipamento de AFM não ser fisicamente projetado para análises das amostras diretamente no *petri dish*.
- 8.2.1.2) Após todos os aparatos, previamente, preparados e esterilizados é então feita a sub-cultura celular para posterior análise no AFM (Figura 24 - passo 5'). Foram cultivadas em torno de 10⁵ células/ml.
- 8.2.1.3) A amostra é então incubada (24H) até o momento de administração ou do agente anticâncer ou do controle (DMSO), de acordo com os parâmetros utilizados para análises.
- 8.2.1.4) A amostra é mantida na incubadora até o momento das análises da influência do tratamento nas propriedades mecânicas celulares, utilizando o AFM (Figura 26).

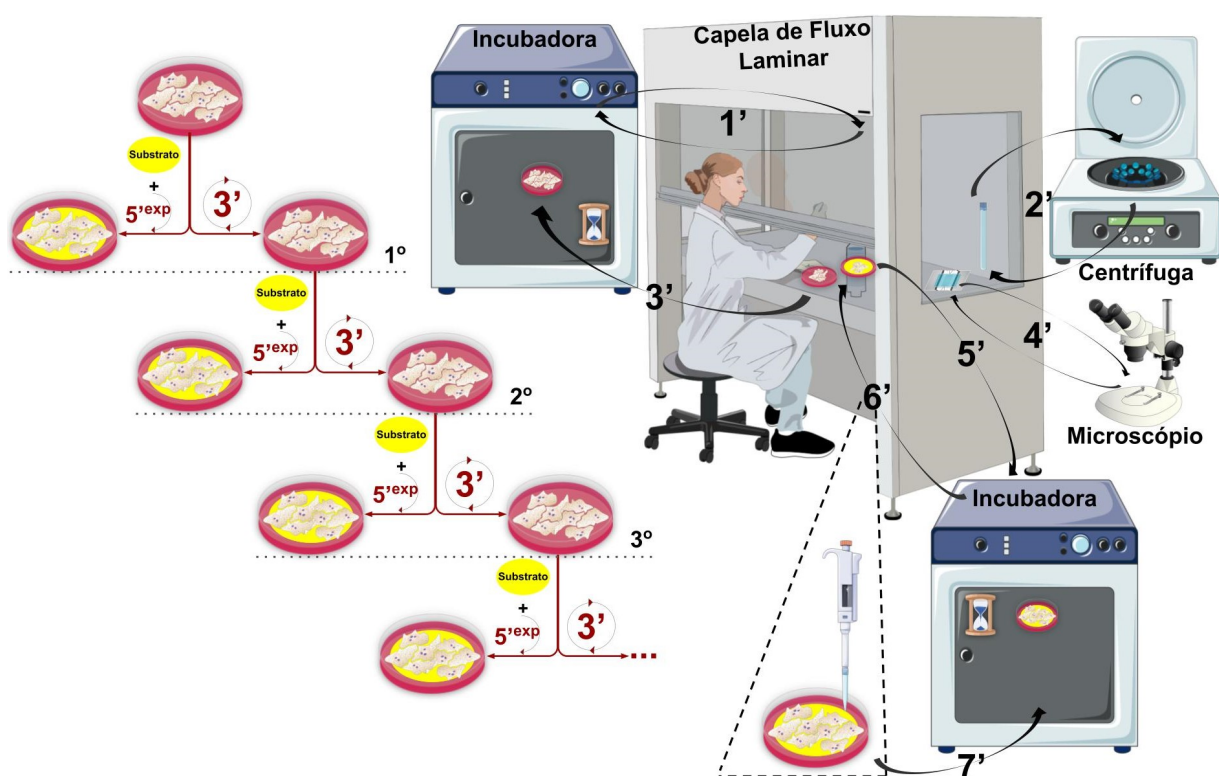


Figura 24: Ciclo esquemático da subcultura celular e preparação da amostra no substrato de cultura com rigidez específica para análises no AFM. Após a amostra atingir a confluência de aproximadamente 80% da superfície do *petri dish*, deve-se realizar a subcultura celular. (Os passos 1') e 2') desta figura são equivalentes aos passos 1) e 2) da figura 23). 1') Na capela de fluxo laminar as células passam pelo processo de limpeza com PBS, dissociação com Tripsina (geralmente faz-se necessário uma breve incubação), e adição do meio de cultura celular suplementado. 2') A amostra passa pelo processo de centrifugação, remove-se o sobrenadante; o pélete é ressuspenso com meio de cultura celular suplementado. 3') Realiza-se a sub-cultura no *petri dish* e o incuba até atingir a confluência e iniciar o próximo ciclo da subcultura, e todo o processo se repete (Figura 23). 4') A parte remanescente das células ressuspensoas (2') são contadas através da câmara de Neubauer e utilizadas para 5') subcultura celular no substrato de rigidez específica e, então, a amostra é incubada. 6') Após a incubação, administra-se, sobre a amostra, DMSO ou o composto anticancerígeno utilizado (Seção 4.4.6), de acordo com os parâmetros das análises para o estudo. 7') A amostra é, então, mantida na incubadora até a realização do experimento utilizando AFM. À esquerda, encontra-se um diagrama dos *petri dishes* durante cada ciclo de preparação da subcultura celular juntamente com a amostra para o experimento de AFM (linhas tracejadas indicam o 1º, 2º e 3º ciclo). Figura gerada pela autora utilizando os ícones de [112]

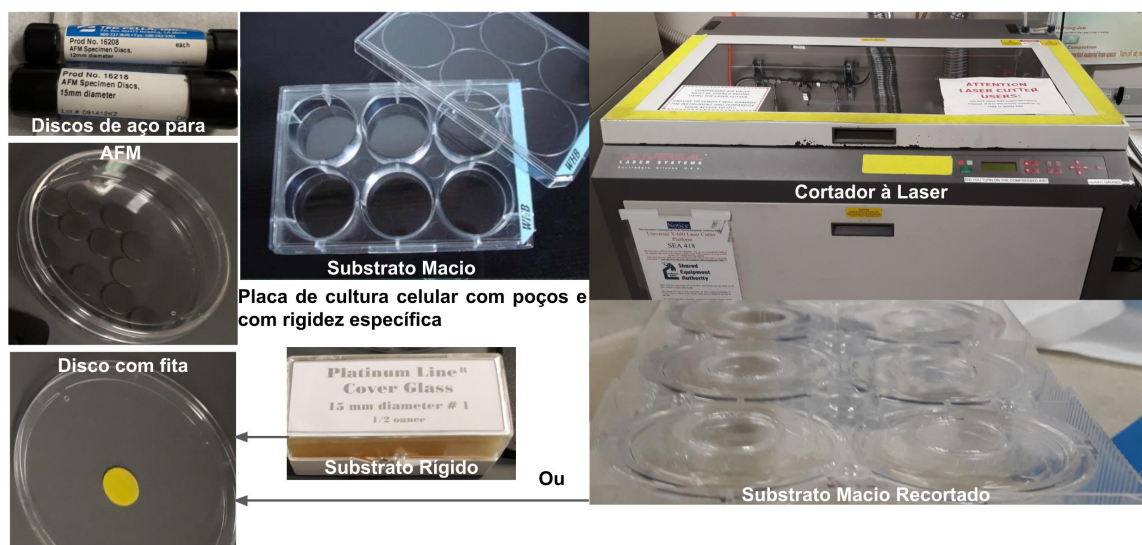


Figura 25: Materiais utilizados na montagem dos substratos de cultura celular com rigidez específica. Os discos de aço para AFM são limpos em banho ultrassônico, e então é anexada uma fita e o substrato com rigidez específica (de vidro ou macio). O substrato de vidro já é fornecido nas dimensões corretas. Já, os substratos macios são adaptados utilizando o cortador a laser, à partir da placa de cultura com poços; dessa forma, obtêm-se o substrato macio ajustado e pronto para ser anexo ao disco de aço, para posterior utilização no AFM.

4.4.3 Aparato - AFM

O microscópio de força atômica abre oportunidades para quantificar as interações de sistemas biológicos em escalas que variam de moléculas à células individuais [79, 86, 96]. As curvas força-distância foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica (MultiMode 8, Bruker) equipado com um controlador Nanoscope V (Bruker) com PicoForce. O sistema é projetado para medidas ultrasensíveis de forças, na ordem de picoNewtons (pN). Devido a sensibilidade, o equipamento se encontra no subsolo sobre uma mesa de isolamento de vibração a fim de minimizar interferências externas.

Embora o aparato seja normalmente utilizado para análises de moléculas e células, estendi sua aplicação para análises de células cancerígenas sob influência de compostos anticâncer pela primeira vez no laboratório. Junto à professora Dra. Ching-Hwa Kiang

elaboramos o desenho dos experimentos de células na presença de fármacos, conforme descrito nesta tese.

Cantilever As células, em temperatura ambiente, foram analisadas por meio de sondas do AFM (*cantilever*). A sonda triangular de nitreto de silício (MLCT-O10) com constante de mola com valor nominal igual a 0,01 N/m é utilizada no experimento de AFM para monitorar a célula. Antes de cada experimento no AFM, a constante de mola do *cantilever* deve ser calibrada (Seção 4.3.4).

Ajuste da Amostra no AFM O disco metálico com a amostra celular deposta na superfície do suporte específico (substratos de vidro ou macios) (Figura 25) é retirado do *petri dish* e anexado na câmara do piezoelétrico do AFM (Figura 26). A sonda (MLCT-O10) com seu suporte é inserida no topo da amostra, vide o conjunto montado na inserção da Figura 26.

Configuração e Coleta de Dados - AFM A Figura 27 - A apresenta uma estrutura esquemática do AFM. Um feixe de laser é refletido pelo cantilever AFM e coletado em um fotodetector (fotodiodo) enquanto a sonda e a amostra são aproximadas e afastadas (eixo Z). Os dados foram coletados pelo modo de contato. Os parâmetros (tamanho da rampa, velocidades, limiar da força, tempos de retardo, constante de mola) são configurados de acordo com o objetivo do experimento (Tabela 3). A seleção da célula única, com auxílio do microscópio óptico anexo ao AFM (Figura 27 - B), é realizada através de ajustes nas direções X-Y do *scanner*. Com isso, pode-se fazer uma varredura do substrato, e deve-se escolher a célula que esteja visivelmente aderida ao mesmo, e mais solitária. O *cantilever* é posicionado no topo da célula única no substrato e, em seguida, aproximado em direção à célula até que a força de contato predefinida seja estabelecida. O contato é mantido por, aproximadamente, 3 segundos, favorecendo a adesão entre o *cantilever* e a superfície da célula. Após o contato, a sonda e o suporte se afastam, esticando a amostra anexada no substrato. Durante esse processo, a força é medida pela deflexão da sonda. Sugere-se esperar um certo tempo, pelo menos igual ao tempo de contato, entre as análises devido a deformação da célula [113]. Esse processo se repete várias vezes para cada uma das células

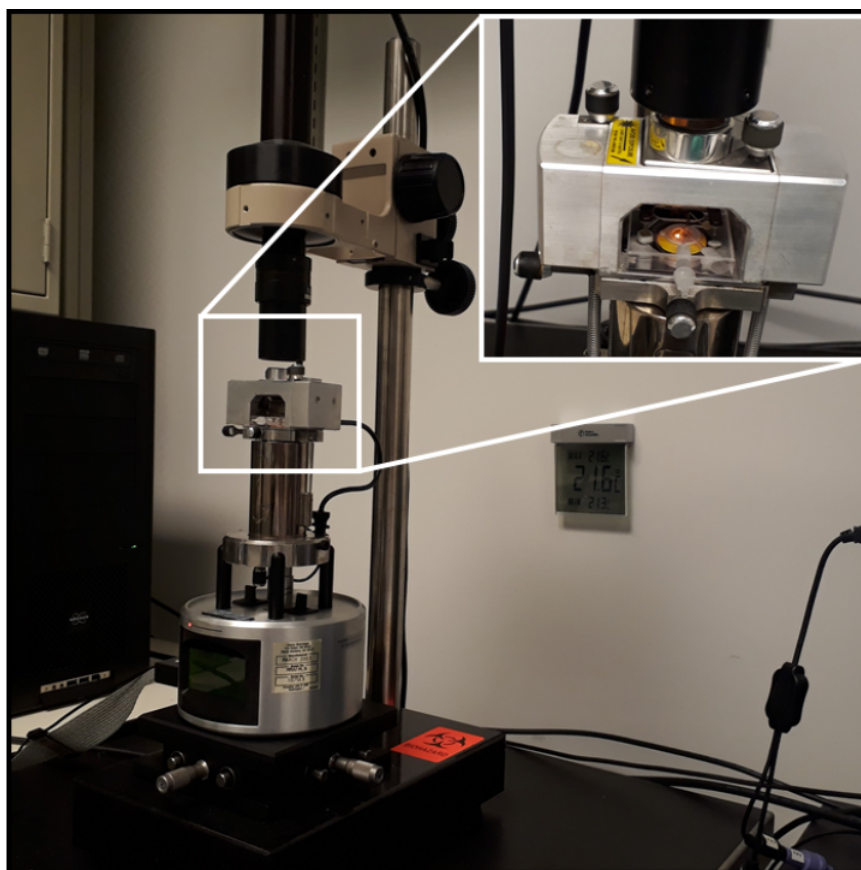


Figura 26: Equipamento do AFM, em destaque apresenta-se a câmara do piezoelétrico onde as amostras são analisadas

analisadas, em cada ensaio dezenas de células únicas foram escolhidas e monitoradas.

Tabela 3: Parâmetros para análise das forças de passo no AFM, utilizando o *cantilever* MLCT-O10.

Tamanho da Rampa	Velocidade de Avanço	Velocidade Reversa	Limiar da Força	Retardo na Superfície	Retardo Retraído	Constante de Mola
5 μm	3 $\mu\text{m/s}$	3 $\mu\text{m/s}$	1 nN	3 s	3 s	0,01 N/m

4.4.4 Medidas de Força utilizando AFM - *Pulling*

Cada ciclo da sonda AFM é realizado aproximando-a e retirando-a da superfície celular. O ciclo gera um gráfico com um par de curvas força-distância (aproximação e retração entre a célula e a sonda, Figura 28). A Figura 27 - C apresenta uma curva típica do processo de retração (*pulling*).

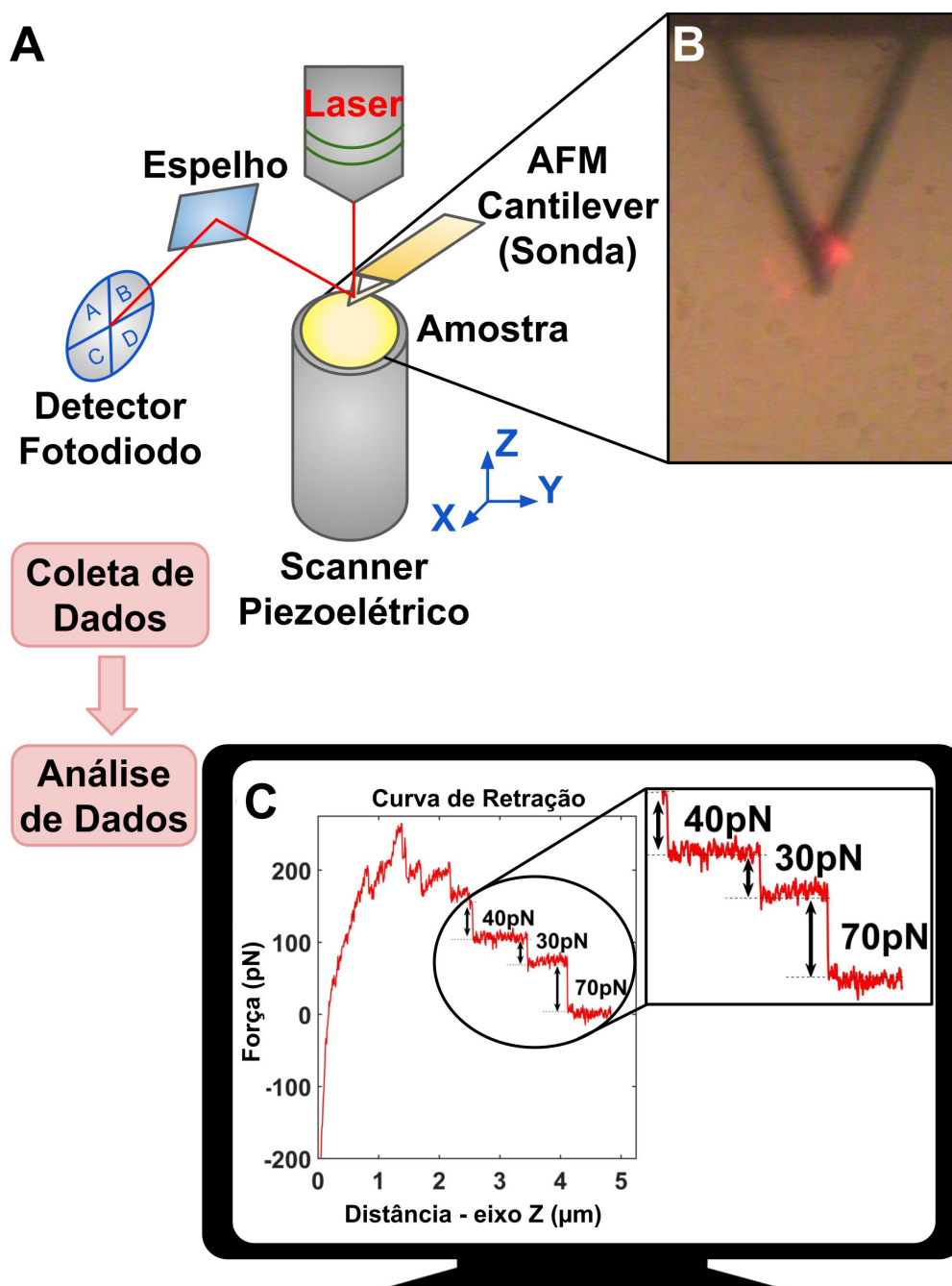


Figura 27: Força de passo (SF, *step force*), da coleta à análise de dados. A - Representação esquemática do AFM. B - Imagem do microscópio óptico acoplado ao AFM: Seleção de células individuais com a sonda do AFM (*cantilever*). C - Saída do software Nanoscope: Curva força-distância utilizada para análises da força de passo. As setas duplas indicam a força de passo, como resultado do desprendimento ou quebra da amarra.

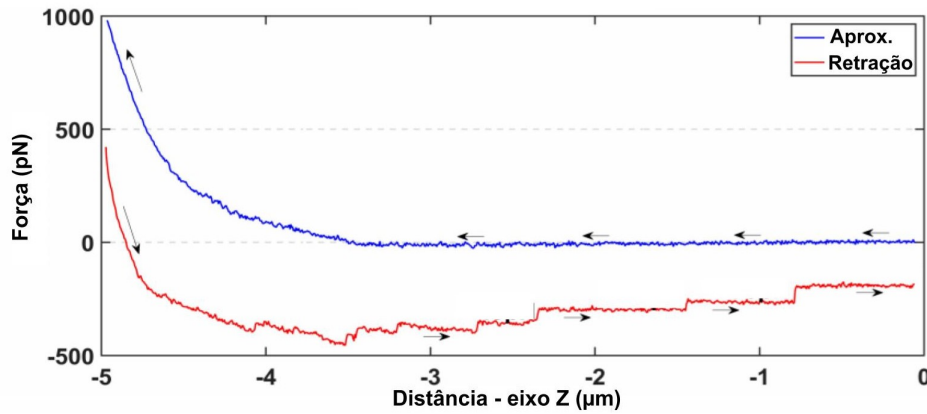


Figura 28: Curva força-distância gerada pelo ciclo de aproximação (azul) e retração (vermelho) entre a superfície celular e o *cantilever*, utilizando o AFM. As setas indicam o processo de aproximação/retração entre o *cantilever* e a célula.

Força de Passo (SF) A Figura 27 - C apresenta o perfil dos platôs ocorrendo à forças constantes, separados por degraus. A formação de múltiplos passos foi observada por meio de curvas força-distância geradas pelo AFM quando a sonda se afastou da superfície da célula após seu contato. Sugere-se que o processo de puxar resulta na formação de finos nanotubos ou amarras [85]. Então, semelhante à molas conectadas em paralelo, várias amarras podem ser formadas entre o *cantilever* e a célula [86]. As setas duplas na figura 27 - C indicam a diferença da força entre platôs consecutivos das curvas Força-Distância, definida como a força de passo (SF ou ΔF ou *Step Force* do inglês) e interpretada como o alongamento simultâneo à perda sequencial do nanotubo [85]. SF especifica a força necessária para manter o nanotubo extraído da célula [85].

Para cada ensaio foram analisadas dezenas de células únicas, e para cada célula monitorada, obteve-se dezenas de gráficos força-distância (mediante dezenas de ciclos de aproximação e retração da sonda à superfície celular, Figura 28). Dessa forma, centenas de curvas força-distância foram registradas para cada ensaio. Cada curva pode apresentar diferentes frequências de discontinuidades na força (SF). Um algoritmo de ajuste para determinar as alturas dos degraus foi utilizado para extrair os valores da força de passo [114].

A propriedade mecânica celular e a resistência à força externa resultam em uma força característica no experimento de tração de célula única. Os experimentos de SF visam extrair informações biomecânicas de células HeLa em resposta à ação de PL em diferentes

ensaios (tempo de ação, concentração e dependência de substrato de cultura).

4.4.5 Análise da Força obtida pelo AFM

Os gráficos força-distância apresentam curvas de aproximação e retração (Figura 28), a seleção das curvas de retração é realizada. Utilizando o algoritmo para as análises no Matlab [114], inicia-se o procedimento para aquisição das forças de passo (*step force*, SF), o qual contém três etapas:

- 1) Seleção manual da linha de base de cada curva de força, a região que se estende no primeiro platô;
- 2) Seleção e ajuste à região dos degraus: A região onde há os degraus é selecionada manualmente e deve-se indicar a quantidade de passos que há na mesma. Através de métodos de minimização obtém-se o ajuste otimizado ao dado.
- 3) Seleção da região de cada degrau, indicando o "início" e "fim" da altura, para determinar o ajuste ideal. Com isso, obtém-se o valor do *step force* (SF).

Essas etapas são realizadas para análise de cada gráfico força-distância (Figura 27 - C).

Para cada condição celular foram analisadas centenas de curvas de retração, originadas por dezenas medidas de cada célula unitária, onde dezenas de células foram observadas por ensaio. Utilizando o algoritmo, determina-se um conjunto de valores de força de passo (SF) para cada ensaio. Com isso, gera-se o gráfico de violino (*violin plot*) e o histograma para cada condição celular estudada. O histograma é ajustado por uma curva gaussiana e indica o valor médio da força de passo. O gráfico de violino foi gerado para analisar o valor da mediana e os quartis dos dados da distribuição de SF para cada condição celular.

O gráfico de violino é uma combinação de duas representações de dados [115]: O diagrama de caixas [116] e a estimativa de densidade de kernel [117, 118]. Dado um conjunto de dados, o diagrama de caixas representa os limites, inferior e superior, juntamente com o primeiro e terceiro quartil. Além disso, o diagrama de caixas também indica o valor da mediana em sua representação. Todos esses elementos são incorporados pelo gráfico de violino. Já a estimativa de densidade de kernel é utilizada para representar a distribuição dos

dados com a suavização da representação e redução de ruídos em dados amostrados. Desta forma, o gráfico de violino representa a distribuição dos dados incorporando duas técnicas de gráficos em uma única análise, o que favorece a comparação entre diferentes dados. Os gráficos de violinos foram gerados através do Python 3 e a biblioteca *Seaborn* [119]. Os histogramas foram gerados utilizando Matlab [120].

4.4.6 Design do Experimento HeLa–PL utilizando AFM

As células possuem uma estrutura bastante dinâmica, elas podem alterar a forma, se dividir e locomover [70, 71]. Os processos dinâmicos celulares podem estar relacionados a vários fatores biológicos críticos e, também, à adaptação ao microambiente [70, 71]. A compreensão integrada da estrutura e mecânica celular é essencial para elucidar muitos aspectos fundamentais do comportamento celular, desde a motilidade até a diferenciação e o desenvolvimento. [71]

A técnica de AFM foi utilizada para sondar as influências do fármaco PL (descrito como desestabilizador do microtúbulo [29]) nas propriedades mecânicas das células HeLa (Figura 26). Os parâmetros analisados foram obtidos pelas curvas de retração Força-Distância, ou seja, distanciando a sonda do AFM (*cantilever*) após o contato com a superfície celular. Tais curvas apresentam descontinuidades na força (Figura 27 - C), como degraus, aqui denominados como força de passo. As células foram analisadas individualmente em condições específicas de tratamento e substratos de cultura:

- Validação da metodologia, análises do veículo DMSO em células HeLa após diferentes tempos de administração (0, 6, 24 e 30 horas); e Influências dos tempos de ação de PL a 10 μM (30 min, 6, 24 e 30 horas) em células HeLa;
- Influências das concentrações de PL (5, 10 e 15 μM) em células HeLa;
- Influências dos suportes onde as células crescem (substratos), utilizando substratos macios e de vidro, os quais possuem diferentes rigidezes (0,5, 16 e 10⁶ kPa). Tais rigidezes são comparadas aos tecidos, conforme apresenta a figura 29. Análises em células HeLa controle e tratadas com PL (10 μM).

O volume equivalente de veículo DMSO sem PL foi adicionado ao grupo de controle

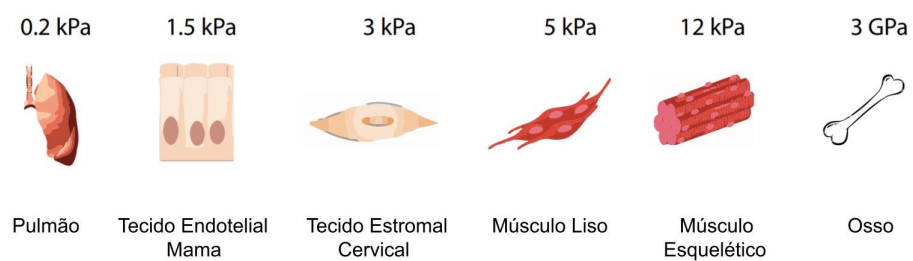


Figura 29: Rigidezes dos tecidos, em analogia às rigidezes dos substratos utilizados. Figura adaptada de [108].

DMSO e nenhum DMSO/PL ao grupo de controle negativo. DMSO, à menos de 0,5%, no meio de cultura celular [110].

4.5 Resultados e Discussões – Biofísica Celular

Com o intuito de entender como a perturbação das moléculas individuais do citoesqueleto influenciam os comportamentos celulares em grande escala, desenvolvemos os protocolos descritos nesta tese para obter uma compreensão mecânica integrada. Os parâmetros monitorados são as forças de passo (SF), obtidas após o afastamento da sonda de AFM da superfície celular.

4.5.1 Método de Validação do Protocolo

As condições investigadas foram monitoradas para garantir que a origem do sinal seja apenas devido à influência do composto anticâncer. PL foi diluída em DMSO, e análises de células HeLa foram realizadas após diferentes tempos de tratamento com DMSO (6, 24 e 30H), e comparadas ao controle negativo (células HeLa sem PL e sem DMSO, 0H). A Figura 30 - A apresenta análises de *step force* (SF) para células tratadas com DMSO em diferentes tempos (6, 24 e 30H) e controle negativo (0H). A presença de DMSO não afetou a força de passo (*tether force*) para células HeLa, conforme observado durante as 30 horas da administração. O valor do SF médio para a análise das células controle foi mantido em torno de 50pN (Figura 30 - A). As análises dos *violin plots* e histogramas, respectivamente, mostraram que os valores medianos e médios para células HeLa tratadas com DMSO se mantiveram iguais ao controle negativo (0 H). Portanto, assume-se que o meio de solubilização do composto (DMSO) não interfira nos sinais observados dos ensaios em estudo.

Além disso, a Figura 30 - B apresenta análises de força de passo para o tempo de ação do composto. O valor de SF médio para HeLa nos primeiros 30 minutos de ação da piperlongumina (10 μ M, $SF_m \approx 50$ pN) é igual às análises do grupo controle (Figura 30 - A). Após 6 horas de tratamento com piperlongumina (10 μ M, $SF_m \approx 60$ pN) o pico da distribuição variou, a força de passo aumentou com relação ao grupo controle ($\Delta SF \approx 10$ pN). A variação do SF entre o grupo controle e os ensaios de 24 e 30 horas de células HeLa sob influência de PL (10 μ M), também foram aproximadamente 10pN. Com isso, sugere-se um tempo de ação de PL (10 μ M) nas propriedades mecânicas de HeLa entre 30

minutos e 6 horas.

Vários mecanismos de ação da PL têm sido observados, dentre eles o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) [4, 10]. Recentemente, foi observado uma correlação entre o ambiente livre de ROS e a instabilidade dinâmica, o qual tem sido relatado como importante na motilidade e divisão celular [30, 31, 121]. Os estudos indicam que os microtúbulos apresentam uma instabilidade dinâmica aumentada (extremidades do MT alternam constantemente entre períodos crescendo ou encurtando rapidamente) no ambiente livre de ROS [30, 121]. Em estudo anterior, foi relatado o aumento do nível de ROS em células HeLa tratadas com PL após 1,5 horas [4]. Neste sentido, o aumento do nível de ROS por PL nas células HeLa parece estar relacionado à supressão da instabilidade dinâmica nos microtúbulos, e pode estar associado à variação da força de passo (ΔSF) observada pelo tempo de ação da PL em HeLa (Figura 30 - B). As análises da Figura 31 sugerem que o efeito mecânico da piperlongumina nas células HeLa ocorre nas primeiras 6 horas de tratamento. Os resultados em função do tempo indicam que as análises de força de passo nas células são sensíveis ao tempo de ação do fármaco.

4.5.2 Influências da Concentração

A piperlongumina é relatada como citotóxica em dependência da concentração [4, 5]. Nesse sentido, analisamos os efeitos biomecânicos dependentes da concentração de piperlongumina nas células HeLa.

A Figura 32 apresenta uma distribuição da força de passo para células HeLa tratadas com 5, 10 e 15 μM de piperlongumina, em comparação com o controle (DMSO), para um tempo de ação constante (24 horas). As células não mostram variação da força de passo (ΔSF) em 5 μM de piperlongumina em comparação com o controle. Porém, no tratamento com 10 μM e 15 μM de PL, as distribuições apresentam um aumento específico no valor da força de passo, para cada concentração, em relação ao controle ($\Delta SF \approx 10 pN$).

Observa-se que os efeitos biomecânicos da PL nas células HeLa são sensíveis por análises da força de passo em dependência da concentração. Esses resultados podem estar relacionados ao valor de viabilidade celular em 50% para células HeLa na presença de PL,

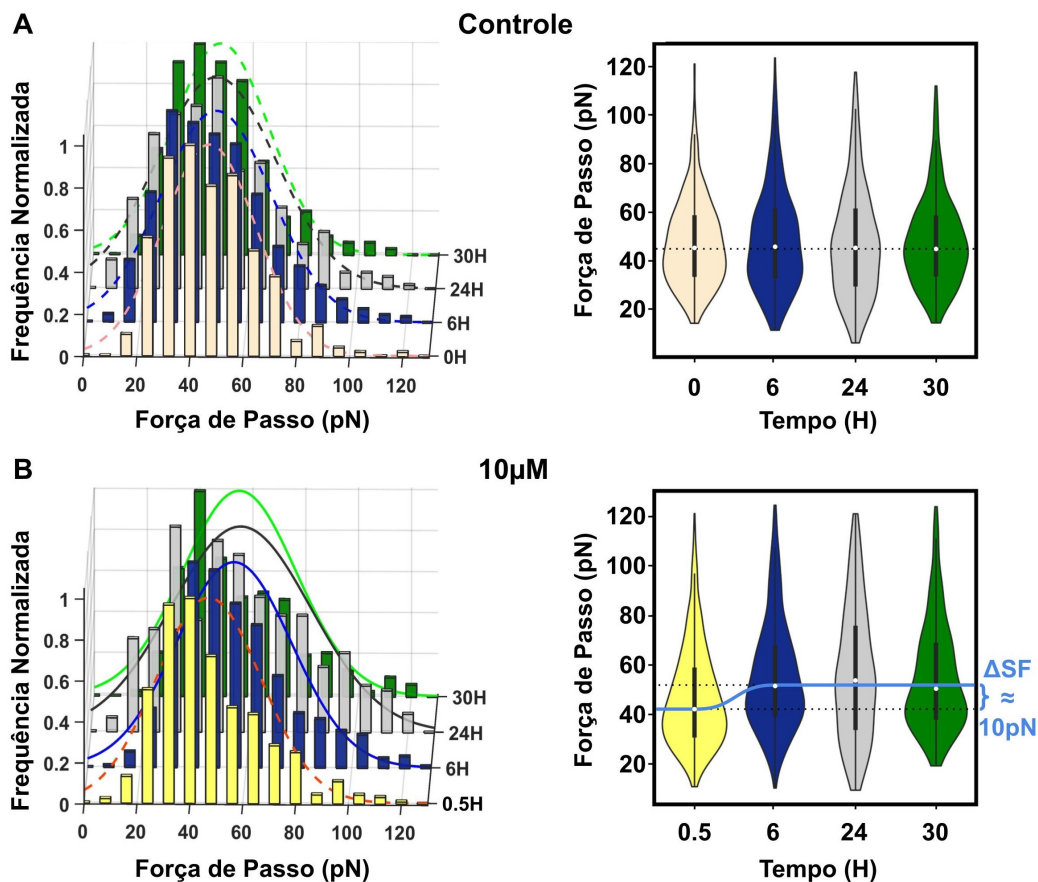


Figura 30: Histogramas (à esquerda) e gráficos de violino (*Violin plots*, à direita) das forças de passo (SF) obtidas pelas curvas força-distância das células HeLa em função do tempo de tratamento. A - Células controle (sem (0 h) e com DMSO (6, 24 e 30 horas) a 0 μM de PL). A média dos histogramas é em torno de 50pN (curvas tracejadas). B - Células tratadas com PL (10 μM) em 0,5, 6, 24 e 30 horas. A média dos histogramas é em torno de 50pN (curva tracejada) e 60pN (curvas contínuas) para 0,5 hora e os demais tempos analisados (6, 24 e 30 horas), respectivamente. A barra preta (figuras à direita) apresenta o primeiro e o terceiro quartil dos dados. Os pontos brancos (figuras à direita) apresentam a mediana da distribuição de SF. ΔSF é a variação do valor mediano da força do degrau após 6 horas de tratamento com PL (10 μM) até as 30 horas observadas (a curva em azul claro auxilia a visualização (Figura 30-B, à direita)). As células foram cultivadas em substratos de vidro. As análises estatísticas são apresentadas nas Tabelas S1 e S2 do anexo II na Seção 6.

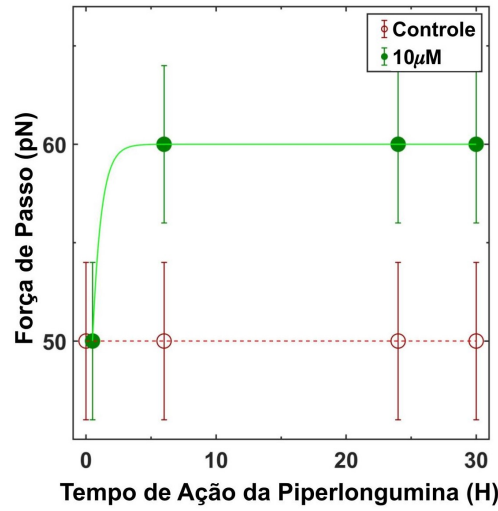


Figura 31: Força de passo média em função do tempo. Células HeLa na presença de 10 μM de PL (0,5, 6, 24 e 30 horas) e controle (0, 6, 24 e 30 horas)

que são apresentadas na literatura como menores que 8 μM [4–6].

4.5.3 Influências do Ambiente Extracelular

Estudos relataram que o microambiente da cultura celular influencia o modo e a dinâmica da invasão de células cancerígenas [16, 86]. A rede do citoesqueleto pode ser reconstruída e reordenada para uma adaptação à matriz do substrato, no entanto como esse efeito é refletido na força, ainda é pouco explorado [70, 86]. Aqui, foram investigadas as forças de passo de células HeLa sob influência de PL (10 μM , 24 horas) em diferentes substratos (macios e vidro) de cultura celular, com rigidez específica: 0,5, 16 e 10⁶ kPa. A Figura 33 apresenta mudanças no pico das distribuições para um valor de força de passo maior, de células controle para células tratadas com PL, em cada substrato específico.

A Figura 33 - E apresenta os valores médios arredondados da força de passo mais provável para células HeLa em matrizes de substratos diferentes. Os valores de SF na mesma condição de tratamento, seja controle ou 10 μM de piperlongumina, aumenta conforme o aumento da rigidez do substrato (vide curvas na figura 33 - E). Esses resultados indicam que o ambiente extracelular influencia nos efeitos biomecânicos celulares.

Além disso, para cada substrato analisado, a variação do valor de SF mais provável

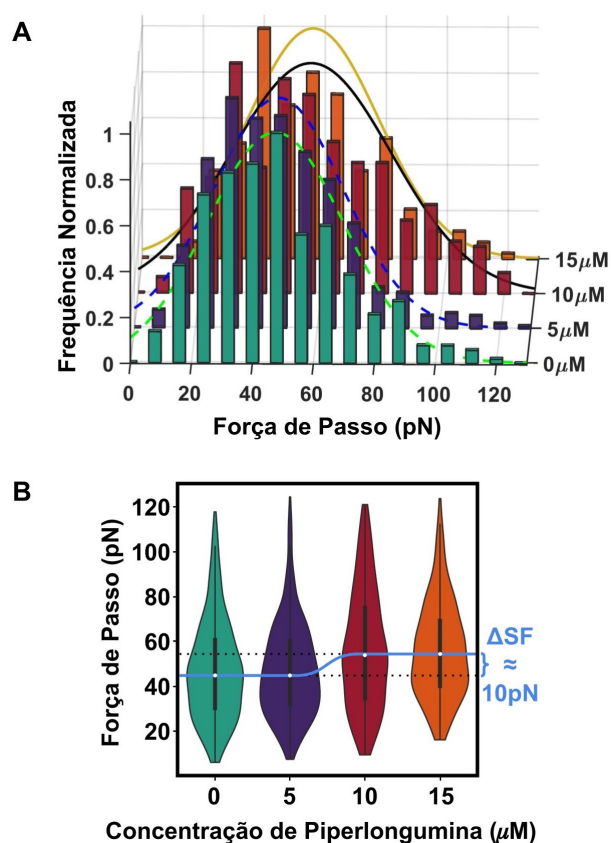


Figura 32: A - Histogramas e B - Gráficos de violino da força de passo obtidas pelas curvas força-distância para células HeLa sob influência da concentração de PL (0 (controle), 5, 10 e 15 μM), em 24 horas de tratamento. Os valores medianos (pontos brancos) aumentam, aproximadamente, 10pN (ΔSF , Figura 32 -B) entre 5 μM e 10 μM de PL. A curva azul clara deve auxiliar a visualização, e a barra preta apresenta o primeiro e o terceiro quartil dos dados (Figura 32 -B). As células foram cultivadas em substratos de vidro. A análise estatística é apresentada na Tabela S3 do anexo II na Seção 6.

entre as células controle e tratadas é a mesma, e em torno de 10pN ($\Delta SF_{10\mu M-C}$, Tabela S5 do anexo II na Seção 6). Essas análises indicam que o efeito da PL nas células HeLa apresenta um padrão na ΔSF independente da rigidez do substrato.

As curvas na figura 33 - E referem-se aos ajuste utilizando a Equação 61 para os SF_m das amostras controle e tratada com PL (10 μM) em função da rigidez do substrato.

$$SF(E_{Substrate}) = SF_{\infty} - \left[(SF_{\infty} - SF_0) * \exp^{-\frac{E_{Substrate}}{E_{Cell}}} \right] \quad (61)$$

SF_{∞} e SF_0 são os valores extrapolados de step force (SF) para infinito e zero, respectivamente; $E_{Substrate}$ é a rigidez do substrato; E_{Cell} é a rigidez da célula [86]. Os parâmetros determinados pelo ajuste encontram-se na Tabela S6 do anexo II na Seção 6.

A força de passo é sugerida como sendo o resultado do desprendimento ou quebra da amarra, dado pelo nanotubo formado entre a superfície celular e o *cantilever*. Conforme apresentado na literatura, as propriedades do nanotubo dependem dos filamentos de actina e da rede de microtúbulos, que são os principais componentes do citoesqueleto [80, 85]. Recentemente, o estudo de Pontes et al. observou a presença de filamentos de actina na estrutura do nanotubo [9, 87]. Em estudos anteriores, as células tratadas com o agente desestabilizador de microfilamentos de actina (latrunculina A (LATA)), bem como, com o agente que rompe a estrutura (*backbone-disrupt agent*) do glicocálice (hialuronidase), apresentaram uma diminuição do valor da força de passo na presença de cada fármaco [85]. No entanto, neste estudo, células HeLa tratadas com PL, um agente desestabilizador de microtúbulos, apresentaram aumento da força de passo em vários ensaios (tempos de ação, concentrações do fármaco e substratos de cultura). Devido esse comportamento diferente sugerimos que a PL atue na região celular não periférica, de forma diferente da LATA e da hialuronidase. Embora PL e LATA apresentem propriedades desestabilizadoras do citoesqueleto, elas têm, como alvo, diferentes subunidades do citoesqueleto (tubulina e actina, respectivamente) [29, 30, 85, 122, 123]. Portanto, este estudo sugere que a força de passo (amarra) pode ser utilizada como um biomarcador mecânico sensível ao local do alvo celular por fármacos.

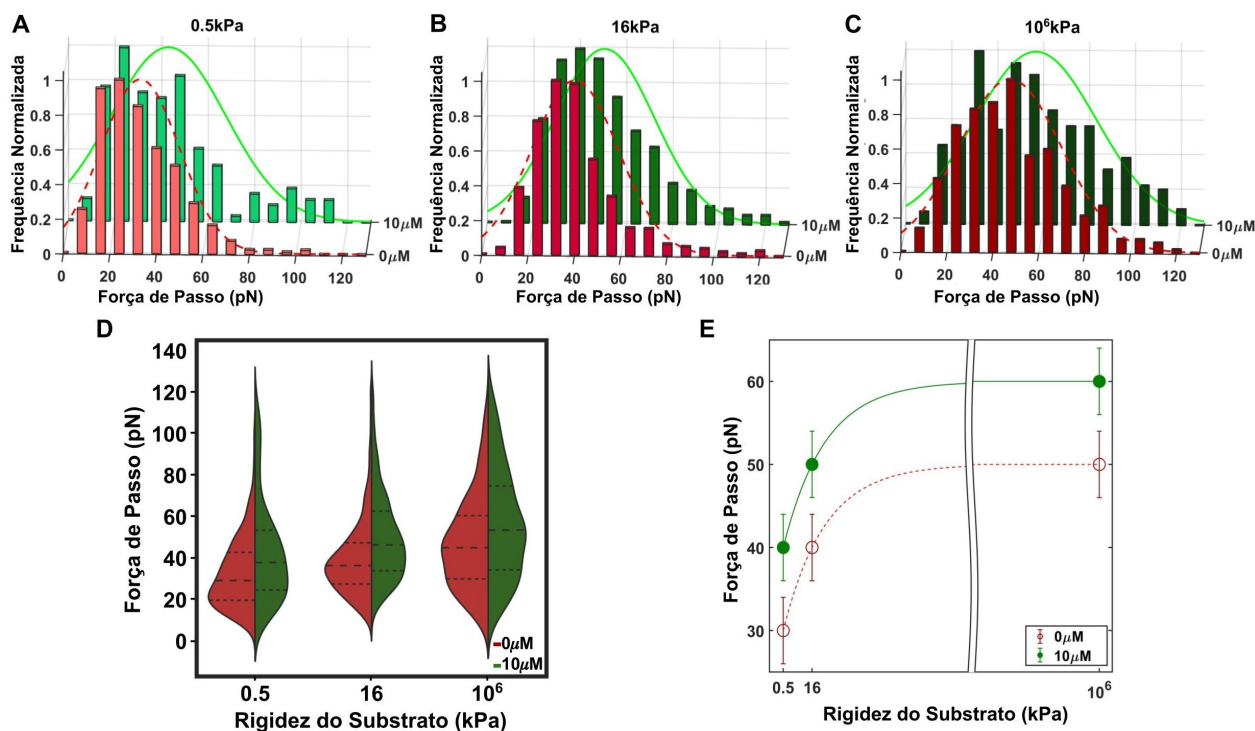


Figura 33: A a C - Histogramas e D - Gráficos de violino de forças de passos gerados pelas curvas força-distância de retração para células HeLa em dependência da matriz (0,5kPa, 16kPa e 10⁶ kPa (vidro)) na presença de PL (10 μM) e controle (0 μM de PL) após 24 horas de tratamento. No gráfico de violino, os valores medianos (linhas tracejadas pretas) aumentam à medida que a matriz (substrato) fica mais rígida. Além disso, em cada substrato específico, os valores medianos aumentam entre o controle (meio-violino vermelho) e 10 μM de PL (meio-violino verde). As linhas pontilhadas pretas apresentam o primeiro e o terceiro quartis dos dados. E - Valores médios arredondados da força de passo mais provável de células HeLa em dependência da matriz (0,5kPa, 16kPa e vidro) sob influência de PL (curva verde) e controle (curva vermelha tracejada) após 24 horas de tratamento. A análise estatística é apresentada na Tabela S4 do anexo II na Seção 6.

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 Nastri, 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 piplartine (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 piplartina 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 Glaucé 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. Dyche 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, Xuwen 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.

6 Anexos

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

1 Quantifying the Effect of Anti-cancer Compound 2 Piperlongumine on Cancer Cells Using Single-Cell 3 Force Spectroscopy

4 **Nayara Sousa de Alcântara-Contessoto^{1,2}, José Maria Barbosa-Filho³, Ian Lian⁴,**
5 **Marinônio Lopes Cornélio¹, and Ching-Hwa Kiang^{2,*}**

6 ¹Department of Physics, São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto-SP, 15054-000, Brazil

7 ²Department of Physics & Astronomy, Rice University, Houston-TX, 77005, USA

8 ³Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa-PB, 58051-900, Brazil

9 ⁴Department of Biology, Lamar University, Beaumont-TX, 77710, USA

10 *chkiang@rice.edu

11 ABSTRACT

Natural compounds have shown a great potential in anti-cancer research by tumor growth inhibition and anti-metastatic properties. Piperlongumine (PL) is a natural compound derived from pepper species that has been demonstrated to have anti-cancer effect on HeLa cells. Using Atomic Force Microscopy (AFM) based single-cell force spectroscopy, we characterized properties of HeLa cells with PL treatment. We used AFM to pull single HeLa cells and acquired the force-distance curves that showed stepwise patterns. We analyzed the step force (SF) and observed that cells treated with PL exhibit higher SF compared to control cells. This SF increase was also observed in experiments performed on substrates of increasing stiffness. Therefore, the effects of PL on the mechanical properties of the HeLa cells may be reflected in its SF. Understanding of PL's influence on HeLa cells' mechanical properties may help in the screening of effective therapeutic drugs against cancers.

13 Introduction

14 Anti-cancer research is a challenge and a worldwide interest. Cancer causes millions of people's death every year, and in 2020,
15 it was responsible for around 10 million^{1,2}. Cancer diseases have two main concerns: cell growth and cell migration, which can
16 be uncontrolled³. Metastasis, being the cause for most cancer patients' mortality, receives increasing attention in both scientific
17 and clinical research⁴. Understanding cancer cell mechanics can improve the metastasis combat through observations into the
18 diagnosis, prognosis, and treatment^{4,5}. In this sense, the mechanical properties of single molecules and single-cells have been
19 investigated using atomic force microscopy (AFM)⁶⁻⁸ and optical tweezers⁹⁻¹¹.

20 In eukaryotic cells, physical forces can act through the cytoskeleton polymers (actin filaments, microtubules, and interme-

diate filaments) to control the mechanical properties, adhesion forces, and cellular behavior^{8,12}. The cytoskeletal dynamic generates effects on cell motility, division, and overall mechanical processes^{12,13}. Its dysfunction may result in chromosomal instability, mitotic arrest, and cell death, becoming common and useful targets to drug design¹⁴. In particular, AFM can detect a range of forces from picoNewtons to nanoNewtons, and it has been a powerful tool for high-resolution imaging and mechanical measurement of single-cell investigations in near-physiological conditions^{6,13,15}. AFM technique can also help understand how cell mechanics are affected by drugs, i.e., providing an alternative to evaluate drug-cell interactions^{13,15}.

Piperlongumine (PL), also known as Piplartine (Figure 1), is a natural compound that presents several pharmacological properties, such as genotoxic, cytotoxic, antimetastatic, and antitumoral^{16,17}. Its target can be reached through the blood plasma, as observed through *in vitro* and *in vivo* studies^{16,18–20}. Recently, Meegan et al. presented PL as a microtubule-destabilizing agent with antiproliferative effects in breast cancer cells²¹. Additionally, Henrique et al. showed the inhibitory effect of PL on the α -tubulin expression in endothelial cells²². Microtubule-targeting agents (MTA) are potent mitotic poisons that inhibit eukaryotic cell proliferation, promote cell death by suppressing microtubule dynamic instability, and interfere with intracellular transport^{5,23,24}. PL presents different mechanisms of action and has been proposed as a potential anti-cancer drug and an interesting compound to be investigated^{16,25,26}.

Studies suggest the cytotoxicity of piperlongumine in a dose-dependence on HeLa cells^{25,27}. The literature reports the EC₅₀ (concentration inhibiting cell growth by 50%) as 2.7 and 7.1 μM ^{25,27}. Notwithstanding the advances in understanding biochemical properties, there is a lack of information regarding the mechanical features and how they can affect cancer cell stability under the influence of drugs. AFM has been used to investigate the viscosity, surface, stiffness, adhesive properties of drug effects on cells^{13,15,28–30}. Mechanical force is a nonspecific parameter, i.e., independent of the types of molecules, cells, and tissues⁷. Thus, it can be used to sense the influences of drugs on cells.

In this study, we performed characterization of mechanical response of HeLa cells in PL presence. The analyses were performed at different conditions of HeLa at piperlongumine treatment and their respective controls, using AFM through single-cell manipulation. We varied the PL concentrations, treatment times, and culture substrates (the surface where cells grow up) with different stiffness. This study provide quantified mechanical information of the compounds on cells, which can be related to PL's anti-proliferative effect. Therefore, investigate the cellular mechanical properties can aid cancer therapeutic and diagnostic research⁴.

Materials and Methods

Materials and Solutions

Human cervical cancer cells (HeLa; ATCC) were cultured in a medium containing DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle Medium; Corning), supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco) and 1% Pen-Strep (Penicillin/ Streptomycin; Gibco), and incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Piperlongumine (C₁₇H₁₉NO₅) was donated by collaborators and dissolved in DMSO (Dimethylsulfoxide; ATCC) at final concentrations of 5, 10, and 15 μM ^{16,31}. Polymeric substrates

with specific stiffness (0.5 and 16 kPa) were donated by a collaborator. MLCT-O10 cantilever (Bruker), tipless, was used as a probe in AFM experiments.

Cellular Sample Preparation

Sterilized steel disks were covered by glass or specific polymeric substrates (with determined stiffness) and kept in 35mm Petri dishes; the cells (10^5 cells/ml) were subcultured with DMEM supplemented (10%FBS and 1%Pen Strep) medium on this assay and kept overnight in an incubator (5% CO₂ and 37°C). After this step, the cells were treated by Piperlongumine at different action times and different concentrations. The equivalent volume of vehicle DMSO without PL was added to the DMSO control group and no DMSO/PL to the negative control group. DMSO at less than 0.5% in the cell culture medium³².

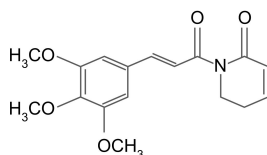


Figure 1. Chemical structure of Piperlongumine (PL), also known as Piplartine, (5,6-dihydro-1- [(2E) -1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) -2-propen-1-yl] -2 (1H) -pyridinone)^{16,31}.

Atomic Force Microscopy

Force-distance curves were acquired using an Atomic Force Microscope (MultiMode 8, Bruker) equipped with a Nanoscope V controller (Bruker) with PicoForce. The cantilever (MLCT-O10) was calibrated, measuring the deflection sensitivity and using the thermal noise method to determine the cantilever spring constant^{33,34}. Single-cells on glass or soft substrates (at room temperature) were analyzed using the cantilever probes with spring constant approximately equal to 0.01 N/m (shape C triangular).

Figure 2 - A presents an AFM framework. The data collected by AFM contact mode was performed positioning (X-Y axis) the probe (AFM cantilever) on a single-cell. The parameters are set up (ramp size, velocities, trig threshold, delay times, spring constant) according to the experiment's aim (Table 1). A laser beam is reflected by the AFM cantilever and collected in a photodetector (photodiode) while the probe is engaged and withdrawn from the sample (Z-axis).

Force-Distance Curves

Each cycle of the AFM probe is performed by engaging and withdrawing it from the cell surface. The cycle generates a pair of force-distance curves (approach and retract). Figure 2 - C presents a usual retracts curve.

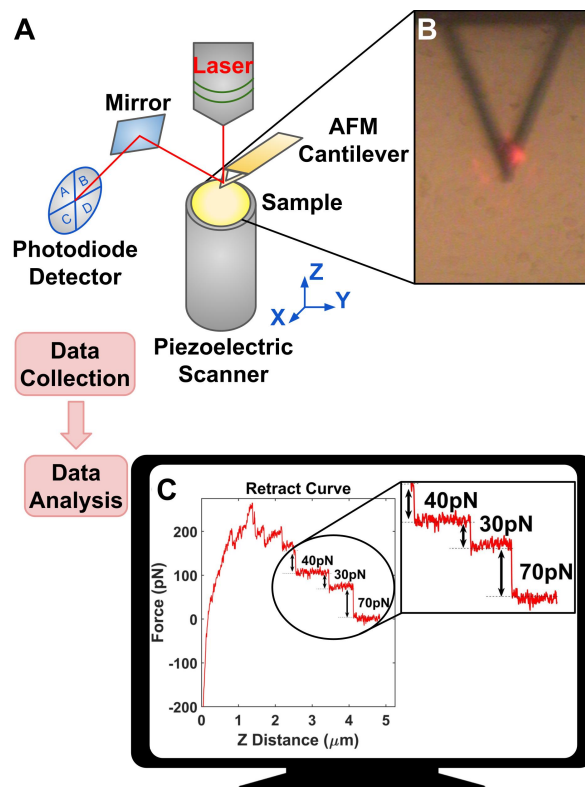


Figure 2. Step Force, a schematic figure from data collection to data analysis. A - AFM framework. B - Image of the optical microscope attached to AFM: Single-cells selection in the sample. C - The output of Nanoscope software: force-distance curve from AFM cantilever retract move (half cycle) used for analyses of the tether force. The double arrows indicate the step force, likely resulting from the detachment or breaking of a tether.

Step Force Studies

Figure 2 - C presents plateaus profile occurring at constant forces, separated by steps. The multiple-step formation was observed through force-distance curves generated by an AFM when the probe withdrawal from the cell surface after its engagement. It is suggested that the pulling process results in the formation of thin nanotubes or tethers¹³. Then, similar to springs connected in parallel, multiple tethers can be formed between the cantilever and the cell⁶. The double arrows in figure 2 - C indicate the discrete step force (SF or ΔF) between consecutive plateaus, interpreted as simultaneous elongation and sequential loss of tether¹³.

The tether force (or Step Force) was obtained by measuring retract curve steps (Figure 2 - C) from several single-cells. Hundreds of force-distance curves were recorded for each assay. A step-fitting algorithm was used to extract the step force values³⁵.

An ensemble of step force values generates distribution graphs (histogram and violin plots). The histogram is fitted by a Gaussian curve and identifies the most probable step force (SF) value. The violin plots were generated to observe the median value and the quartiles of the data within the distribution.

The step force experiments aim to extract biomechanical information of HeLa cells in response to PL action in different

assays (action time, concentration, and culture substrate dependence). Table 1 shows the AFM setup parameters for performing the measure.

Table 1. Parameters for analyzes of the step forces in contact mode AFM, using MLCT-O10 cantilever.

Ramp Size	Forward Velocity	Reverse Velocity	Trig Threshold	Surface Delay	Retracted Delay	Spring Constant
5 μm	3 $\mu\text{m/s}$	3 $\mu\text{m/s}$	1 nN	3 s	3 s	0.01 N/m

Results and Discussions

Validation Method

The investigated conditions were monitored to guarantee that the signal's origin is only due to the influence of the compound. Figure 3 - A presents step force analyzes for cells with DMSO at different times. DMSO presence did not affect the SF for HeLa cells, as observed during 30 hours of the administration. The most probable SF value was kept at around 50pN (Figure 3 - A). Therefore, it is assumed that the medium of compound solubilization (DMSO) does not interfere in its action.

Furthermore, Figure 3 - B presents step force analyzes for the compound action time. The most probable SF value for HeLa at the first 30 minutes of piperlongumine action (10 μM , SF $\approx$ 50pN) is equal to the control group analyses (Figure 3 - A). After 6 hours of piperlongumine treatment (10 μM , SF $\approx$ 60pN), the distribution peak shifted to greater step force than the control group ($\Delta\text{SF} \approx$ 10pN).

Bezerra et al. presented several PL's mechanisms of action, such as the increase of reactive oxygen species (ROS)^{16,25}. Recently, it was observed a correlation between ROS-free environment and dynamic instability, which has been related as important in cell division and motility^{5,23,36}. Microtubules showed an enhanced dynamic instability in a ROS-free environment³⁶. PL has been reported to increase the level of ROS in HeLa cells within 1.5 hours²⁵. The increase of ROS level by PL on HeLa cells appears to be related to suppressing dynamic instability on microtubules, and it can be associated with the step force variation (ΔSF) by PL action time on HeLa (Figure 3 - B). Figure 4 suggests that the mechanical effect of piperlongumine on HeLa cells occurs at the first 6 hours of treatment. The time-dependence results indicate that step force analyzes on cells are sensitive to drug action time.

Concentration Influences

Piperlongumine is reported to be cytotoxic in a concentration dependence^{25,27}. In this sense, we analyzed the biomechanical effects dependents of the piperlongumine concentration on HeLa cells.

Figure 5 presents the step force distributions for HeLa cells treated with 5, 10, and 15 μM of piperlongumine, compared with the control (DMSO), for a constant action time (24 hours). The cells were not sensitive to step force changes in 5 μM of piperlongumine as compared to control, i.e., no shift at most probable SF was observed for this concentration. However, in treatment with 10 μM and 15 μM , the distributions showed a specific increase of step force value, for each concentration, compared to the control ($\Delta\text{SF} \approx$ 10pN).

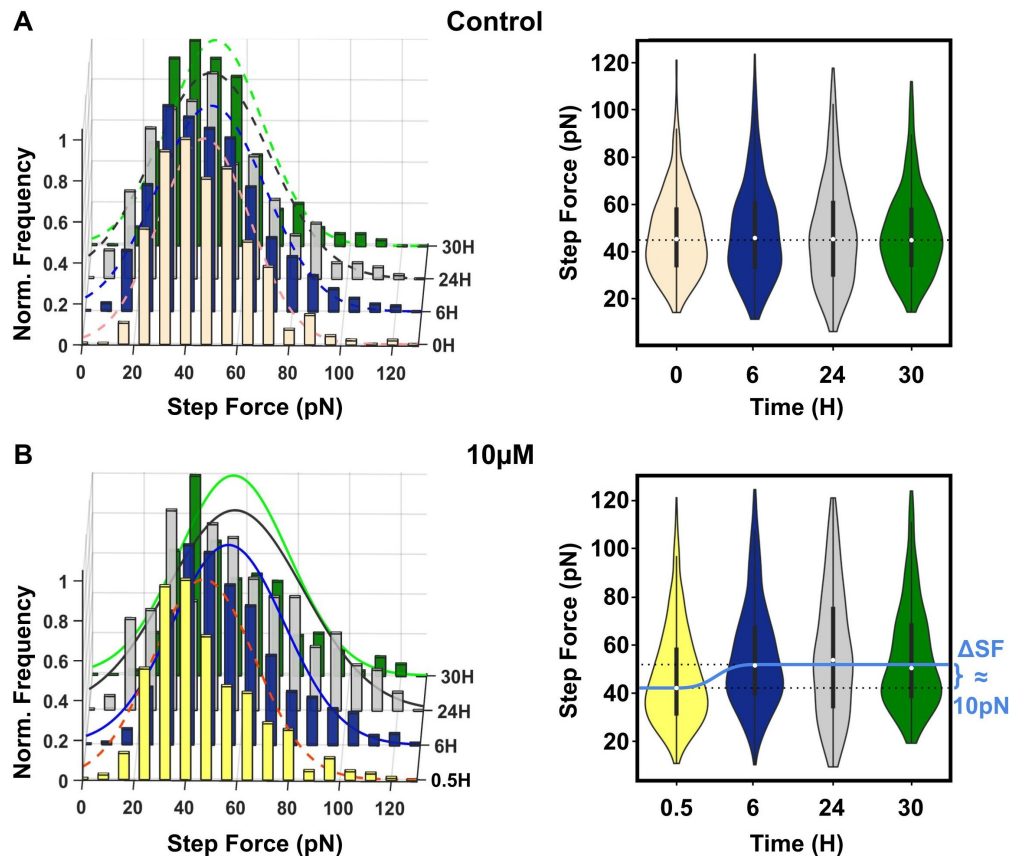


Figure 3. Histograms (left) and violin plots (right) of step force from force-distance curves of HeLa cells as a function of time. A - Control cells (without (0 h) and with DMSO (6, 24, and 30 hours) at $0 \mu\text{M}$ of PL). The mean of the histograms is around 50 pN (dashed curves). B - Cells treated with PL ($10 \mu\text{M}$) at 0.5, 6, 24, and 30 hours. The mean of the histograms is around 50 pN (dashed curve) and 60 pN (continuous curves) for the 0.5 hour and the other analyzed times (6, 24, and 30 hours), respectively. The black bar (right figures) presents the first and third quartile of the data. The white dots (right figures) present the median value for SF. ΔSF is the variation of the step force's median value after 6 hours of treatment with PL ($10 \mu\text{M}$) until the 30 hours observed (the light blue curve is to guide the eyes (Figure 3-B, right)). The cells were cultured on glass substrates. The statistical analyzes are presented in Tables S1 and S2 of Supporting Information.

The biomechanical effects of PL on HeLa cells is sensitive by the SF analyzes in a concentration-dependence. These results can be related to the cellular viability value in 50% for HeLa cells in PL presence, which are presented in the literature as smaller than $8 \mu\text{M}$.

Extracellular Environment Influences

Studies reported that the microenvironment of the cell culture influences the mode and dynamics of cancer cell invasion. Here, it was investigated the step force of HeLa cells in different substrates of cellular culture with specific stiffness (0.5 kPa, 16 kPa, and glass). Figure 6 presents a shift of distribution peak to larger step force value, from control to piperlongumine treated cells, for each specific substrate.

Figure 6 - E shows the most probable step force for HeLa cells in different substrates matrices. The SF values at the same condition, either control or $10 \mu\text{M}$ of piperlongumine, increase with the stiffer substrate (as guided by the lines in figure 6 - E).

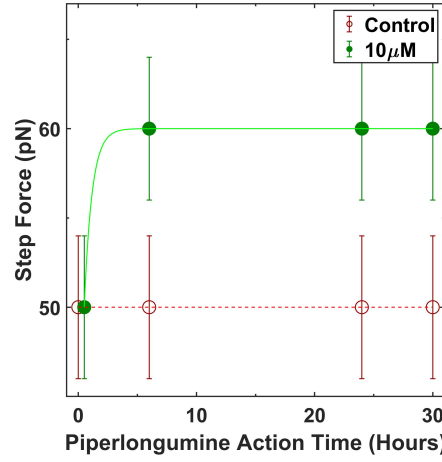


Figure 4. The probable step force as a function of time. HeLa cells in the presence of 10μM of PL (30 min, 6, 24, and 30 Hours) and control (0, 6, 24, and 30 Hours).

These results indicate the extracellular environment influences the biomechanical effects.

Furthermore, for each substrate analyzed, the variation of the most probable SF value between control and treated cells is the same, and around 10pN ($\Delta SF_{10\mu M-C}$, Table S5 of Supporting Information). These analyses indicate that the effect of PL on HeLa cells presents a ΔSF pattern that is independent of the substrate rigidity.

The curve in figure 6 - E (Table S6 of Supporting Information) of SF for different substrates (0.5kPa, 16kPa, and glass) was analyzed using Equation 1 for each sample (Control and treated with 10μM of PL).

$$SF(E_{Substrate}) = SF_{\infty} - \left[(SF_{\infty} - SF_0) * \exp^{-\frac{E_{Substrate}}{E_{Cell}}} \right] \quad (1)$$

SF_{∞} and SF_0 are the extrapolated SF values to infinity and zero, respectively; $E_{Substrate}$ is the substrate stiffness; E_{Cell} is the cell stiffness⁶.

The step force is likely a result of tether breaking. As presented in the literature, the tether properties depend on actin filaments and microtubules network, which are the major cytoskeleton components^{9,13}. It has been shown that actin filaments are present in tether structures^{10,11}. In previous studies, cells treated with actin microfilaments-destabilizing agent (latrunculin A (LATA)), as well as glycocalyx backbone-disrupt agent (hyaluronidase), trend a decrease of the step force value in the presence of each drug¹³. However, in this study, HeLa cells treated with PL, a microtubule-destabilizing agent, presented an increase of the step (tether) force in several assays (action times, drug concentrations, and culture substrates). Due to this different behavior, we suggest that PL should act in the non-peripheral cellular region differently from LATA and hyaluronidase. Although both PL and LATA present cytoskeleton-destabilizing properties, they target different cytoskeleton subunits (tubulin and actin, respectively)^{5,13,21,38,39}. Therefore, this study suggests that step (tether) force can be used as a mechanical biomarker sensitive to the site of the cellular target by drugs.

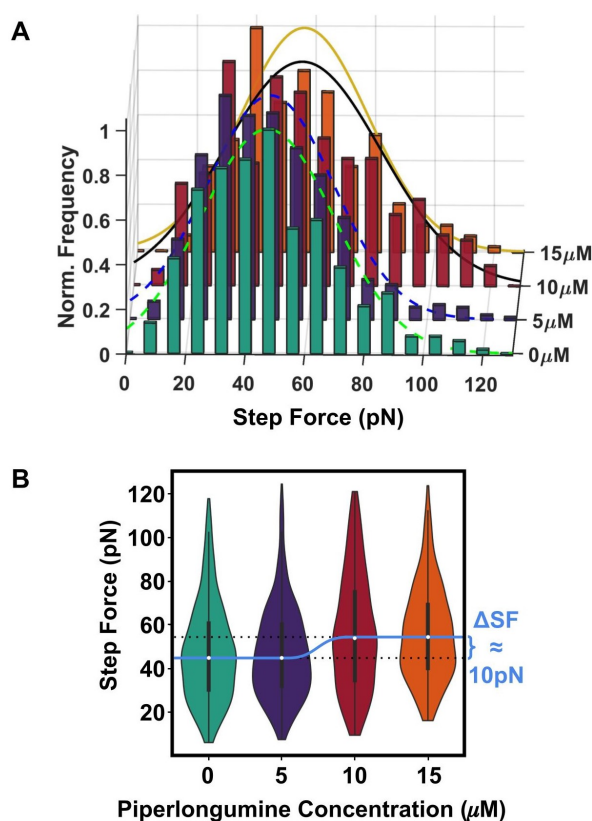


Figure 5. A - Histograms of step force from retract force-distance curves and B - Violin plots of step force of HeLa cells at concentration-dependence (0 (control), 5, 10, and 15 μM) and 24 hours of treatment. The median values (white dots) increase around 10 pN (ΔSF , Figure 5-B) between 5 μM and 10 μM . The light blue curve is to guide the eyes, and the black bar presents the first and third quartile of the data (Figure 5-B). The cells were cultured on glass substrates. The statistical analysis is presented in Table S3 of Supporting Information.

Conclusion

Understanding the biomechanical properties in cells upon compound interaction can help elucidate the underlying mechanism of anti-cancer drug activities. In this context, Atomic Force Microscopy (AFM) is a technique that can be used to quantify cellular drug response. Here, we employed AFM experiments to investigate cancer cells' biomechanical properties under the influences of an anti-cancer compound. Different conditions of the compound and substrate rigidity were explored using HeLa cells. The results indicated that the step force (SF) varies with the action time; PL acts on HeLa cells in the first 6 hours of the treatment. Additionally, SF is sensitive to the PL concentration; between 5 and 10 μM of PL treatment, HeLa cells experiments present an increase of SF, a variation of around 10 pN. Besides action time and the compound concentration, SF is also sensitive to the cytoskeleton organizations; HeLa cells in the presence of 10 μM of the PL increase the tether force ($\Delta\text{SF}_{10\mu\text{M}-\text{C}} \approx 10\text{pN}$) compared with the control, independently of the substrate stiffness. Recently, PL has been described in the literature as a microtubule-destabilizing agent²¹. In this study, we observed an increase in the step force values of HeLa cells in the presence of the PL in different assays (action times, drug concentrations, and culture substrates). Such SF increment suggests that PL acts by targeting the microtubule of HeLa cells. The pipeline of AFM experiments presented here showed an effective

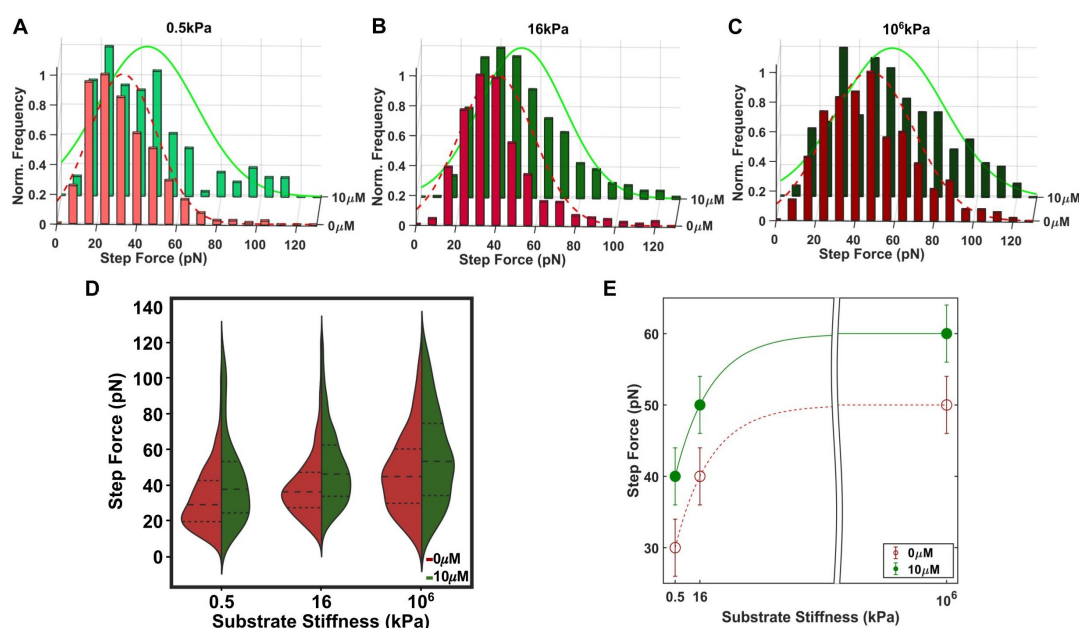


Figure 6. A to C - Histograms of step force from retract force-distance curves and D - Violin plots of the step force for HeLa cells at matrix-dependence (0.5kPa, 16kPa, and 10^6 kPa (glass)) in the presence of PL (10 μ M) and control (0 μ M of PL) after 24 hours of treatment. The median values (black dashed lines) increase as the matrix (substrate) is stiffer. Besides, the median values increase between control (red half-violin) and 10 μ M (green half-violin) in each specific matrix substrate. The black dotted lines present the first and third quartiles of the data. E - The most probable step force (round value) of HeLa cells at matrix-dependence (0.5kPa, 16kPa, and glass) in the presence of PL (10 μ M), green curve, and control (dashed red curve) after 24 hours of treatment. The statistical analysis is presented in Table S4 of Supporting Information.

procedure to characterize the overall interactions between anti-cancer drugs and cancer cell lines.

Acknowledgements

The authors thank Jingqiang Li for laboratory technical support and Lucas Fugikawa Santos for the valuable discussions. N.S.A.C. thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, (Grant 141714/2017-4 and 163893/2018-7). C.-H.K. and N.S.A.C. thank Welch Foundation, United States, (C-1632). C.-H.K. thank Rice University Faculty Initiatives Fund, and E&M Foundation for support.

References

1. Sung, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer J. for Clin.* DOI: [10.3322/caac.21660](https://doi.org/10.3322/caac.21660) (2021).
2. Ferlay, J. *et al.* Global cancer observatory: Cancer today. Lyon, France: Int. Agency for Res. on Cancer (2020). Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [April 2021].).
3. Clark, A. G. & Vignjevic, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr. Opin. Cell Biol.* **36**, 13–22, DOI: [10.1016/j.ceb.2015.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.004) (2015).

- 170 **4.** Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J. & Jiang, W. G. *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular*
171 *Perspective* (Landes Bioscience, 2013).
- 172 **5.** Pasquier, E. & Kavallaris, M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB life* **60**, 165–170, DOI:
173 [10.1002/iub.25](https://doi.org/10.1002/iub.25) (2008).
- 174 **6.** Li, J. *et al.* Dependence of Membrane Tether Strength on Substrate Rigidity Probed by Single-Cell Force Spectroscopy.
175 *The J. Phys. Chem. Lett.* **11**, 4173–4178, DOI: [10.1021/acs.jpclett.0c00730](https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.0c00730) (2020).
- 176 **7.** Guo, C.-L., Harris, N. C., Wijeratne, S. S., Frey, E. W. & Kiang, C.-H. Multiscale mechanobiology: mechanics at the
177 molecular, cellular, and tissue levels. *Cell & Biosci.* **3**, 25, DOI: [10.1186/2045-3701-3-25](https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-25) (2013).
- 178 **8.** Chaudhuri, O., Parekh, S. H., Lam, W. A. & Fletcher, D. A. Combined atomic force microscopy and side-view optical
179 imaging for mechanical studies of cells. *Nat. methods* **6**, 383–387, DOI: [10.1038/nmeth.1320](https://doi.org/10.1038/nmeth.1320) (2009).
- 180 **9.** Raucher, D. & Sheetz, M. P. Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys. J.* **77**,
181 1992–2002 (1999).
- 182 **10.** Pontes, B. *et al.* Cell Cytoskeleton and Tether Extraction. *Biophys. J.* **101**, 43–52, DOI: [10.1016/j.bpj.2011.05.044](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.044) (2011).
- 183 **11.** Nussenzweig, H. M. Cell membrane biophysics with optical tweezers. *Eur. Biophys. J.* **47**, 499–514, DOI: [10.1007/s00249-017-1268-9](https://doi.org/10.1007/s00249-017-1268-9) (2018).
- 185 **12.** Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492, DOI: [10.1038/nature08908](https://doi.org/10.1038/nature08908)
186 (2010).
- 187 **13.** Sun, M. *et al.* Multiple Membrane Tethers Probed by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **89**, 4320–4329, DOI:
188 [10.1529/biophysj.104.058180](https://doi.org/10.1529/biophysj.104.058180) (2005).
- 189 **14.** Rieder, C. L. & Maiato, H. Stuck in Division or Passing through: What Happens When Cells Cannot Satisfy the Spindle
190 Assembly Checkpoint. *Dev. Cell* **7**, 637–651, DOI: [10.1016/j.devcel.2004.09.002](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.002) (2004).
- 191 **15.** Yun, X. *et al.* Interrogation of drug effects on HeLa cells by exploiting new AFM mechanical biomarkers. *RSC Adv.* **7**,
192 43764–43771, DOI: [10.1039/C7RA06233H](https://doi.org/10.1039/C7RA06233H) (2017).
- 193 **16.** Bezerra, D. P. *et al.* Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). *Eur. J. Pharm. Sci.* **48**, 453–463,
194 DOI: [10.1016/j.ejps.2012.12.003](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.003) (2013).
- 195 **17.** Tripathi, S. K. & Biswal, B. K. Piperlongumine, a potent anticancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status
196 and future possibilities as an anticancer agent. *Pharmacol. Res.* **156**, 104772, DOI: [10.1016/j.phrs.2020.104772](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104772) (2020).
- 197 **18.** Bezerra, D. P. *et al.* Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. *Mutat. Res. Toxicol.*
198 *Environ. Mutagen.* **677**, 8–13, DOI: [10.1016/j.mrgentox.2009.04.007](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.04.007) (2009).
- 199 **19.** Bezerra, D. P. *et al.* Sensitive method for determination of piplartine, an alkaloid amide from piper species, in rat plasma
200 samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Qu@ACUTEACCENT@imica Nova* **35**, 460 – 465 (2012).

- 201 **20.** Alcântara-Contessoto, N. S., Caruso, I. P., Bezerra, D. P., Filho, J. M. B. & Cornélio, M. L. An investigation into the
202 interaction between piplartine (piperlongumine) and human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol.*
203 *Spectrosc.* DOI: [10.1016/j.saa.2019.04.076](https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.04.076) (2019).
- 204 **21.** Meegan, M. J., Nathwani, S., Twamley, B., Zisterer, D. M. & O’Boyle, N. M. Piperlongumine (piplartine) and analogues:
205 Antiproliferative microtubule-destabilising agents. *Eur. J. Medicinal Chem.* **125**, 453–463, DOI: [10.1016/j.ejmech.2016.](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.048)
206 [09.048](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.048) (2017).
- 207 **22.** Henrique, T. *et al.* Biological and physical approaches on the role of piplartine (piperlongumine) in cancer. *Sci. Reports* **10**,
208 22283, DOI: [10.1038/s41598-020-78220-6](https://doi.org/10.1038/s41598-020-78220-6) (2020).
- 209 **23.** Steinmetz, M. O. & Prota, A. E. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.*
210 **28**, 776–792, DOI: [10.1016/j.tcb.2018.05.001](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.001) (2018).
- 211 **24.** Jordan, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Medicinal Chem.*
212 *Anti-Cancer Agents* **2**, 1–17 (2002).
- 213 **25.** Adams, D. J. *et al.* Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. *Proc. Natl. Acad.*
214 *Sci. United States Am.* **109**, 15115–15120, DOI: [10.1073/pnas.1212802109](https://doi.org/10.1073/pnas.1212802109) (2012).
- 215 **26.** Wang, Y. *et al.* Piperlongumine induces autophagy by targeting p38 signaling. *Cell Death & Dis.* **4**, e824–e824, DOI:
216 [10.1038/cddis.2013.358](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.358) (2013).
- 217 **27.** Bosc, E. *et al.* Piperlongumine and some of its analogs inhibit selectively the human immunoproteasome over the
218 constitutive proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **496**, 961–966, DOI: [10.1016/j.bbrc.2018.01.100](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.100) (2018).
- 219 **28.** Kim, K. S. *et al.* AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in
220 Ishikawa and HeLa Cells. *PLOS ONE* **7**, e30066, DOI: [10.1371/journal.pone.0030066](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030066) (2012).
- 221 **29.** Lekka, M. *et al.* Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch. Biochem. Biophys.* **518**, 151–156, DOI:
222 [10.1016/j.abb.2011.12.013](https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.013) (2012).
- 223 **30.** Rotsch, C. & Radmacher, M. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force
224 microscopy study. *Biophys. J.* **78**, 520–535 (2000).
- 225 **31.** Boll, P. M., Hansen, J., Simonsen, O. & Thorup, N. Synthesis and molecular structure of piplartine (=piperlongumine).
226 *Tetrahedron* **40**, 171–175, DOI: [10.1016/0040-4020\(84\)85116-9](https://doi.org/10.1016/0040-4020(84)85116-9) (1984).
- 227 **32.** Trivedi, A. B., Kitabatake, N. & Doi, E. Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells
228 evaluated colorimetrically with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide. *Agric. Biol. Chem.* **54**,
229 2961–2966, DOI: [10.1271/bbb1961.54.2961](https://doi.org/10.1271/bbb1961.54.2961) (1990).
- 230 **33.** Hutter, J. L. & Bechhoefer, J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instruments* **64**, 1868–1873, DOI:
231 [10.1063/1.1143970](https://doi.org/10.1063/1.1143970) (1993).

- 232 **34.** Harris, N. C., Song, Y. & Kiang, C.-H. Experimental Free Energy Surface Reconstruction from Single-Molecule Force
233 Spectroscopy using Jarzynski's Equality. *Phys. Rev. Lett.* **99**, 068101, DOI: [10.1103/PhysRevLett.99.068101](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.068101) (2007).
- 234 **35.** Kerssemakers, J. W. J. *et al.* Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* **442**, 709–712, DOI:
235 [10.1038/nature04928](https://doi.org/10.1038/nature04928) (2006).
- 236 **36.** Islam, M. S., Kabir, A. M. R., Inoue, D., Sada, K. & Kakugo, A. Enhanced dynamic instability of microtubules in a ROS
237 free inert environment. *Biophys. Chem.* **211**, 1–8, DOI: [10.1016/j.bpc.2015.11.003](https://doi.org/10.1016/j.bpc.2015.11.003) (2016).
- 238 **37.** Afolabi, L. O., Bi, J., Chen, L. & Wan, X. A natural product, Piperlongumine (PL), increases tumor cells sensitivity to NK
239 cell killing. *Int. Immunopharmacol.* **96**, 107658, DOI: [10.1016/j.intimp.2021.107658](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107658) (2021).
- 240 **38.** Coué, M., Brenner, S. L., Spector, I. & Korn, E. D. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* **213**,
241 316–318, DOI: [10.1016/0014-5793\(87\)81513-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81513-2) (1987).
- 242 **39.** Kubitschke, H. *et al.* Actin and microtubule networks contribute differently to cell response for small and large strains.
243 *New J. Phys.* **19**, 093003, DOI: [10.1088/1367-2630/aa7658](https://doi.org/10.1088/1367-2630/aa7658) (2017).

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

Supporting Information - Quantifying the
Effect of Anti-cancer Compound
Piperlongumine on Cancer Cells Using
Single-Cell Force Spectroscopy

Nayara Sousa de Alcântara-Contessoto,^{†,‡} José Maria Barbosa-Filho,[¶] Ian Lian,[§]
Marinônio Lopes Cornélio,^{||} and Ching-Hwa Kiang^{*,‡}

[†]*Department of Physics, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São
Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil*

[‡]*Department of Physics & Astronomy, Rice University, Houston, TX, USA*

[¶]*Department of Pharmacy, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, Brazil*

[§]*Department of Biology, Lamar University, Beaumont, TX, USA*

^{||}*Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE),
UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil*

E-mail: chkang@rice.edu

Statistical Analysis

Analysis of T-test to verify the difference between groups with $\alpha \leq 0.05$.

The ND (or D) in the Sig column (at tables S3, S4, S5, and S6) mean there is not (or there is) evidence of the difference between the groups' means.

Control in Time Dependence

Table S1: Statistical Analysis (T-test) between 2 groups for control assays. Hela cells in the absence (0 min) and presence of DMSO at different times (6, 24, and 30 hours).

	Mean difference	Test Statistic	p-Value	Alpha	Sig
0min – 6H	1.4 pN	1.3	0.2	0.05	ND
0min – 24H	0.2 pN	0.1	0.9	0.05	ND
0min – 30H	0.6 pN	0.4	0.7	0.05	ND
6H – 24H	1.2 pN	0.8	0.4	0.05	ND
6H – 30H	0.8 pN	0.5	0.6	0.05	ND
24H – 30H	0.4 pN	0.2	0.8	0.05	ND

Critical Value ≈ 1.96

As shown in table S1, there is no evidence of a difference for the step force mean between the control groups, in a time dependence, at T-test analyses.

PL Action in Time Dependence

Table S2: Statistical Analysis (T-test) between 2 groups for PL action time assays. Hela cells in the presence of PL at different times (30 min, 6, 24, and 30 hours).

	Mean difference	Test Statistic	p-Value	Alpha	Sig
30min-6H	8.3 pN	6.6	$7.4 \cdot 10^{-11}$	0.05	D
30min-24H	9.6 pN	5.5	$4.1 \cdot 10^{-8}$	0.05	D
30min-30H	7.8 pN	5.5	$4 \cdot 10^{-8}$	0.05	D
6H-24H	1.3 pN	0.7	0.4	0.05	ND
6H-30H	0.5 pN	0.4	0.7	0.05	ND
24H-30H	1.8 pN	1.0	0.3	0.05	ND

Critical Value ≈ 1.96

As shown in table S2, there is evidence of a difference for the step force mean of PL action time assays: between 30 min and 6H, 30min and 24H, also between 30 min and 30H, at T-test analyses. Furthermore, there is no evidence of a difference for the step force mean for 6H, 24H, and 30H of PL action time, at T-test analyses.

PL Concentrations

Table S3: Statistical Analysis (T-test) between 2 groups for PL concentrations assays. HeLa cells in the presence of different PL concentrations (5, 10, 15, and 20 μ M).

	Mean difference	Test Statistic	p-Value	Alpha	Sig
0 – 5 μ M	0.2 pN	0.1	0.9	0.05	ND
0 – 10 μ M	9.2 pN	4.8	$2.1 \cdot 10^{-6}$	0.05	D
0 – 15 μ M	8.6 pN	4.6	$5.3 \cdot 10^{-6}$	0.05	D
5 – 10 μ M	9.4 pN	5.5	$5.4 \cdot 10^{-8}$	0.05	D
5 – 15 μ M	8.8 pN	5.3	$1.4 \cdot 10^{-7}$	0.05	D
10 – 15 μ M	0.6 pN	0.3	0.8	0.05	ND

Critical Value ≈ 1.96

As shown in table S3, there is no evidence of a difference for the step force mean of PL concentration assays: between 0 μ M and 5 μ M, between 10 μ M and 15 μ M, at T-test analyses. Furthermore, there is evidence of a difference for the step force mean among them at T-test analyses.

Cellular Matrix/Substrates

Table S4: Statistical Analysis (T-test) between 2 groups of cellular culture in substrates with different stiffness (0.5kPa, 16kPa, and glass (10^6 kPa)). HeLa cells in the presence of PL (10 μ M) and control. .5PL, 16PL, and GPL mean HeLa cells treated with PL in the softer substrate (0.5kPa), medium substrate (16kPa), and more rigid substrate (glass), respectively. .5C, 16C, and GC mean control HeLa cells in the softer substrate (0.5kPa), medium substrate (16kPa), and more rigid substrate (glass), respectively.

	Mean difference	Test Statistic	p-Value	Alpha	Sig
.5C – .5PL	10.0 pN	4.9	$1.7 \cdot 10^{-6}$	0.05	D
.5C – 16C	7.1 pN	7.1	$2.9 \cdot 10^{-12}$	0.05	D
.5C – 16PL	17.5 pN	16.9	$1.9 \cdot 10^{-54}$	0.05	D
.5C – GC	14.5 pN	9.5	$3 \cdot 10^{-20}$	0.05	D
.5C – GPL	23.7 pN	13.9	$8.1 \cdot 10^{-38}$	0.05	D
.5PL – 16C	2.9 pN	1.5	0.13	0.05	ND
.5PL – 16PL	7.5 pN	3.8	$1.5 \cdot 10^{-4}$	0.05	D
.5PL – GC	4.4 pN	2.0	0.04	0.05	D
.5PL – GPL	13.6 pN	5.7	$1.7 \cdot 10^{-8}$	0.05	D
16C – 16PL	10.4 pN	13.4	$7.9 \cdot 10^{-40}$	0.05	D
16C – GC	7.3 pN	5.4	$8.5 \cdot 10^{-8}$	0.05	D
16C – GPL	16.5 pN	10.6	$1.6 \cdot 10^{-23}$	0.05	D
16PL – GC	3.0 pN	2.2	0.02	0.05	D
16PL – GPL	6.1 pN	3.9	$1.1 \cdot 10^{-4}$	0.05	D
GC – GPL	9.2 pN	4.8	$2.1 \cdot 10^{-6}$	0.05	D

Critical Value ≈ 1.96

As shown in table S4, there is evidence of a difference for the step force mean of cellular culture (with PL and control) in substrates with different stiffness (0.5kPa, 16kPa, and glass), at T-test analyses ($\alpha \leq 0.05$), in exception between the assays with PL in 0.5kPa substrate (.5PL) and control in 16kPa substrate (16C).

Extracellular Environment Influences

The extracellular environment influences for Hela cells were investigated to piperlongumine (PL, 10 μ M) treated cells and control.

Table S5: Variation of the most probable value of tether force distribution (Δ SF) for Hela cells at 10 μ M of piperlongumine (compared with control, C) and 24 hours of treatment on different substrates (0.5kPa, 16kPa, and glass (10⁶ kPa)), according to figure 6 of Main Text.

Matrix Stiffness	ΔSF_{C-10μM} ($\pm$4pN)
0.5 kPa	10 pN
16 kPa	10 pN
10 ⁶ kPa	10 pN

Table S6: Parameters obtained by fitting the most probable value of tether force (SF) for Hela cells at 10 μ M of piperlongumine at 24 hours of treatment on different substrates (0.5kPa, 16kPa, and glass (10⁶ kPa)), using the Equation 1 of Main Text, and also for control cells (without PL), Figure 6 - E of Main Text.

Sample	SF_{∞} (pN)	SF₀ (pN)	E_{Cell} (kPa)
Control	50	30	22
10 μ M	60	40	22

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

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 220 (2019) 117084



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa



An investigation into the interaction between piplartine (piperlongumine) and human serum albumin

Nayara Sousa de Alcântara-Contessoto^a, Ícaro Putinhon Caruso^a, Daniel Pereira Bezerra^b, José Maria Barbosa Filho^c, Marinônio Lopes Cornélio^{a,*}

^a Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil

^c Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), UFPB, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2019

Received in revised form 22 April 2019

Accepted 27 April 2019

Available online 3 May 2019

Keywords:

Piplartine

Piperlongumine

Human serum albumin

Fluorescence spectroscopy

Molecular docking

ABSTRACT

Piplartines are alkaloid amides present in the roots and stems of different pepper species which have promising pharmacological properties including cancer prevention. Some recent studies have determined pharmacokinetic parameters of piplartine in rat blood plasma but without pointing to any molecular target or describing the physicochemical forces of the interaction. The present study investigated the interaction between piplartine and human serum albumin (HSA) the predominant protein in blood plasma. Fluorescence spectroscopy was utilized to observe the complex HSA-piplartine formation. Thermodynamic parameter analysis indicates that the process occurs spontaneously and is enthalpically driven; the affinity constant suggests that this interaction is reversible. This was reinforced by the binding density function method and by the displacement analysis that the piplartine binds on HSA at a single site, which was determined to be the IIA sub-domain. *In silico* analysis (molecular docking) identified the main residues involved in binding and the corresponding forces, which corroborates well with the experimental results.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Piplartines, also known as piperlongumine, 5,6 dihydro 1 [(2E) 1 oxo 3 (3,4,5 trimethoxyphenyl) 2 propen 1 yl] 2(1H) pyridinone, are biologically active compounds classified as alkaloid amides which are present in the roots and stem barks of different pepper species, of the Piperaceae family, genus *Piper*, such as Long pepper (*Piper longum* L.), and Pimenta-d'arda (*Piper tuberculatum* J. (de Jacq.)) [1–3]. *In vivo* and *in vitro* studies demonstrate that these compounds have various promising pharmacological properties such as antidepressant, anxiolytic, genotoxic, cytotoxic, antiangiogenic, antimetastatic and antitumoral [1,3–5]. In this way, synergistic analysis of piplartine with approved chemotherapeutic agents, as well as the synthesis of hybrids and analogs are other branches of research to aim improve its activity [6–10]. Since piplartine (PPTN) is such an important biological agent, the number of publications about its beneficial health properties is increasing, along with *in vivo* studies into techniques to determine the pharmacokinetic parameters of this compound in rat plasma [11]. However, to the

best of our knowledge, a full description of the interaction between piplartine and molecular targets has not outlined elsewhere.

The molecular target chosen in this study was human serum albumin (HSA), which predominates in blood plasma and is the carrier of several endogenous (e.g. fatty acids, hormones, toxic metabolites, and metals) and exogenous compounds (e.g. drug molecules) [12]. It is a monomeric globular protein and consists of three homologous α -helical domains (I, II and III), which are further divided into two subdomains (A and B); of 585 amino acid residues, it has only one tryptophan at position 214 (Trp 214) on the IIA subdomain [13]. Studies suggest that the major specific drug-binding sites on HSA are located in the hydrophobic cavities in subdomains IIA and IIIA, namely, site 1 and 2, respectively [13,14]. But an additional drug-binding site is found in subdomain IB, named as site 3, the third major site of HSA [15].

The present study characterized the interaction between piplartine and the main protein in blood plasma, human serum albumin (HSA), by fluorescence spectroscopy. Physicochemical information about the complex formed could be obtained, including thermodynamic parameters, site numbers and affinity constant by monitoring nearby microenvironment of the intrinsic fluorophore (Trp 214). The binding region of the piplartine on HSA was found through studies of drug displacement in the presence of three markers, warfarin, ibuprofen, and methyl orange [13,15]. *In silico* analysis through docking calculations was also

* Corresponding author at: Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, CEP 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

E-mail address: m.cornelio@unesp.br (M.L. Cornélio).



OPEN

Biological and physical approaches on the role of piplartine (piperlongumine) in cancer

Tiago Henrique^{1,10}, Caroline de F. Zanon^{2,10}, Ana P. Girol^{2,3}, Ana Carolina Buzzo Stefanini^{1,9}, Nayara S. de A. Contessoto⁴, Nelson J. F. da Silveira⁵, Daniel P. Bezerra⁶, Edilberto R. Silveira⁷, José M. Barbosa-Filho⁸, Marinonio L. Cornélio⁴, Sonia M. Oliani² & Eloiza H. Tajara^{1,9}✉

Chronic inflammation provides a favorable microenvironment for tumorigenesis, which opens opportunities for targeting cancer development and progression. Piplartine (PL) is a biologically active alkaloid from long peppers that exhibits anti-inflammatory and antitumor activity. In the present study, we investigated the physical and chemical interactions of PL with anti-inflammatory compounds and their effects on cell proliferation and migration and on the gene expression of inflammatory mediators. Molecular docking data and physicochemical analysis suggested that PL shows potential interactions with a peptide of annexin A1 (ANXA1), an endogenous anti-inflammatory mediator with therapeutic potential in cancer. Treatment of neoplastic cells with PL alone or with annexin A1 mimic peptide reduced cell proliferation and viability and modulated the expression of MCP-1 chemokine, IL-8 cytokine and genes involved in inflammatory processes. The results also suggested an inhibitory effect of PL on tubulin expression. In addition, PL apparently had no influence on cell migration and invasion at the concentration tested. Considering the role of inflammation in the context of promoting tumor initiation, the present study shows the potential of piplartine as a therapeutic immunomodulator for cancer prevention and progression.

Several epidemiological studies have indicated that persistent infection and chronic inflammation are predisposing factors for cancer, which is well-documented for the cervix after HPV infection¹ and the stomach in the presence of *Helicobacter pylori*². Supporting this idea are data from studies of tumor initiation and promotion, such as experiments using exogenous inducers of localized inflammation to promote cancer in mouse skin^{3,4} or xenotransplantation of colonic adenoma cells that only induce tumors if introduced into the host together with an inducer of inflammation⁵.

Mediators of inflammation, such as cytokines, chemokines, growth factors and free radicals, can provide a favorable microenvironment that fosters genome instability, survival, proliferation and migration and thus contribute to all cancer development stages, from initiation and promotion to metastasis⁶. This link between inflammation and tumorigenesis raises the possibility of therapeutic interventions that target inflammation for cancer prevention and treatment, especially because anti-inflammatory agents show a modest toxicity compared to conventional chemotherapy⁷.

¹Department of Molecular Biology, School of Medicine of São José do Rio Preto (FAMERP), Av Brigadeiro Faria Lima 5416, São José do Rio Preto, SP CEP 15090-000, Brazil. ²Department of Biology, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE) - Campus São José do Rio Preto, Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. ³Integrated College Padre Albino Foundation (FIPA), Catanduva, SP 15806-310, Brazil. ⁴Department of Physics, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (IBILCE) - Campus São José do Rio Preto, Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. ⁵Laboratory of Molecular Modeling and Computer Simulation/MolMod-CS, Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG 37130-001, Brazil. ⁶Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador, BA 40296-710, Brazil. ⁷Department of Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE 60020-181, Brazil. ⁸Laboratory of Pharmaceutics Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil. ⁹Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-090, Brazil. ¹⁰These authors contributed equally: Tiago Henrique and Caroline de F. Zanon. ✉email: tajara@famerp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 22/12/2021

Assinatura do autor