

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

ELAINE CRISTINA OLIVEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ALTERAÇÕES BIOMECÂNICAS E
BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR FÁRMACOS EM CÉLULAS
UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E
ESPECTROSCOPIA RAMAN**

Maceió
2019

ELAINE CRISTINA OLIVEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ALTERAÇÕES BIOMECÂNICAS E
BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR FÁRMACOS EM CÉLULAS
UTILIZANDO MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA E
ESPECTROSCOPIA RAMAN**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Física.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca
Coorientador: Prof. Dr. Samuel Teixeira de Souza

Maceió

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

S586a Silva, Elaine Cristina Oliveira da.
Avaliação *in vitro* de alterações biomecânicas e bioquímicas induzidas por fármacos em células utilizando microscopia de força atômica e espectroscopia Raman / Elaine Cristina Oliveira da Silva. – 2019.
88 + [46] f. : il. color.

Orientador: Eduardo Jorge da Silva Fonseca.
Co-orientador: Samuel Teixeira de Souza.
Tese (doutorado em Física) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Física, Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 76-87.
Apêndices: f. 88-[46].

1. Microscopia de Força Atômica. 2. Células - rugosidade superficial. 3. Células - Elasticidade. 4. Timócitos. 5. Semaforina-3A. 6. Análise espectral Raman. 7. Análise multivariada. 8. Células A549. 9. Dexametasona. 10. Macrófagos. 11. Flavonoides. 12. *Leishmania amazonensis*. I. Título.

CDU: 543.424.2



Universidade Federal de Alagoas Instituto de Física

Programa de Pós Graduação em Física

BR 104 km 14. Campus A.C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970 Maceió - AL, Brasil
Fone : (082) 3214-1423/FAX (82) 3214-1645

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DA PÓS-GRADUANDA ELAINE CRISTINA OLIVEIRA DA SILVA, REALIZADA NO DIA ONZE DE MARÇO DE DOIS MIL E DEZENOVE.

Aos onze dias do mês de março de dois mil e dezenove, às nove horas, em sessão pública realizada no Auditório do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, o professor Eduardo Jorge da Silva Fonseca, na qualidade de Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Física, instalou os trabalhos para defesa de Tese de Doutorado do Pós-Graduando Elaine Cristina Oliveira da Silva. O Coordenador apresentou a Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores: Eduardo Jorge da Silva Fonseca, como presidente da banca examinadora e orientador, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Samuel Teixeira de Souza (coorientador), do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Ueslen Rocha Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Anielle Christine Almeida Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas, Emiliano de Oliveira Barreto, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, e Alejandro Pedro Ayala, do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, e como suplentes: Carlos Jacinto da Silva, do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas e Morgana Vital de Araújo, Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas. Em seguida o presidente da banca convocou a candidata a expor seu trabalho de tese, intitulado: "**Avaliação in vitro de alterações biomecânicas e bioquímicas induzidas por fármacos em células utilizando Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia Raman**". Após a exposição da candidata, teve início a arguição por parte da banca examinadora. O presidente da banca examinadora, após solicitar perguntas ou comentários do público presente, suspendeu os trabalhos para que fosse realizado o julgamento. A banca examinadora decidiu aprovar a candidata com grau "A". Nada mais havendo a tratar, foi encerrada a sessão, da qual eu, Victor Xavier Brito, secretário do Programa de Pós-Graduação em Física, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e que depois de lida e aprovada, será assinada pelo presidente da banca examinadora e demais membros, pelo candidato e por testemunhas que quiserem. Maceió, onze de março de dois mil e dezenove.

Victor Xavier Brito
Ayala
Silva
Fonseca

Eduardo Jorge da Silva
Samuel Teixeira de Souza

Elaine Cristina
O. da Silva

Aos meus pais Elias e Aldenice, e ao meu irmão Júnior, com gratidão pelo amor, incentivo e apoio ao longo desta minha jornada acadêmica.

Agradecimentos

A Deus, pela presença constante em minha vida e por renovar as minhas forças a cada novo amanhecer para continuar buscando os meus sonhos.

Aos meus pais Elias e Aldenice, por todo amor e compreensão nos meus momentos de ausência, pelo apoio incondicional nos meus estudos. Todo o meu esforço é em prol de vocês!

Ao meu irmão Júnior, pelo amor, carinho e apoio de sempre.

Ao Professor Eduardo Fonseca, pela orientação e incentivo na pesquisa, pela paciência, amizade e confiança que me foi dada. Agradeço pelos grandes ensinamentos ao longo desses seis anos de orientação.

Ao Professor Samuel Souza, por todo aprendizado e orientação nas pesquisas desenvolvidas no laboratório. Sua ajuda foi imprescindível para a realização desta tese.

Aos colegas de grupo Artur e Givanildo, pela ajuda e trabalhos desenvolvidos no laboratório, e ao José Carlos, pelo desenvolvimento dos algoritmos utilizados nesta tese.

Ao Professor Emiliano Barreto, por ter aberto as portas do seu laboratório e pela disponibilização das células, e ao Flávio Martins, por ter doado um pouco do seu tempo para me ensinar sobre a cultura e preparação das células para as medidas Raman.

À Professora Salete Smaniotto e ao Marvin Paulo, pela disponibilização das células para as medidas de AFM. Agradeço pela confiança e colaboração.

À Professora Magna Moreira e à Morgana Araújo, pela disponibilização das células para as medidas Raman. Agradeço pela confiança e colaboração.

A todos os colegas do grupo de Óptica e Nanoscopia, em especial a nossa técnica de laboratório Ana, pela disponibilidade e grande ajuda no laboratório e nas pesquisas.

A todos os meus familiares, aos amigos de Pernambuco e aos que fiz em Alagoas, agradeço o apoio, o carinho e a torcida. Vocês foram muitos importantes nesse processo.

A todos os professores do Instituto de Física, pelos conhecimentos e contribuições na minha formação. Agradeço também a todos os técnicos e demais funcionários do Instituto.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

*Porque dEle, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém!
(Romanos 11:36)*

Resumo

Neste trabalho, a microscopia de força atômica e a espectroscopia Raman foram utilizadas para avaliar alterações biomecânicas e bioquímicas induzidas por fármacos em células biológicas. Primeiramente, um microscópio de força atômica foi usado para investigar os efeitos do tratamento com Semaforina 3A nas propriedades biomecânicas de timócitos, por meio das análises da morfologia, rugosidade da membrana e elasticidade celular. Os resultados indicaram que o tratamento com Semaforina 3A afetou diretamente tais propriedades, induzindo a formação de filopódios, aumentando a rigidez e a rugosidade da membrana celular devido ao rearranjo do citoesqueleto. No segundo estudo, com base nas alterações observadas nos espectros Raman, a resposta anti-inflamatória induzida por fármacos em células A549 foi avaliada através de uma análise comparativa das ações da dexametasona e do ácido *p*-cumárico. Os resultados deste estudo indicaram que ambos os fármacos foram eficientes no processo inflamatório. No entanto, uma análise conjunta da técnica Raman com métodos estatísticos multivariados, revelou diferentes mecanismos de ação dos fármacos, indicando o ácido *p*-cumárico como um composto terapêutico natural para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares. Adicionalmente, a técnica Raman também foi usada para investigar mecanismos de morte celular induzidos por flavonoides em macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis*. As alterações bioquímicas observadas nos espectros Raman foram associadas a marcadores de morte celular. Tais alterações evidenciaram os principais mecanismos moleculares induzidos pelos flavonoides no comportamento celular.

Palavras-chave: Microscopia de Força Atômica. Rugosidade. Elasticidade. Timócitos. Semaforina 3A. Espectroscopia Raman. Métodos Estatísticos Multivariados. Células A549. Dexametasona. Ácido *p*-cumárico. Processo Inflamatório. Macrófagos. Flavonoides. *Leishmania amazonensis*.

Abstract

In this work, atomic force microscopy and Raman spectroscopy were used to evaluate drug-induced biomechanical and biochemical changes in biological cells. First, an atomic force microscope was used to investigate the effects of treatment with Semaphorin 3A on the biomechanical properties of thymocytes, through the analysis of morphology, membrane roughness and cell elasticity. The results indicated that treatment with Semaphorin 3A directly affected these properties, inducing the formation of filopodia, increasing stiffness and roughness of the cell membrane due to rearrangement of the cytoskeleton. In the second study, based on the changes observed in the Raman spectra, the drug-induced anti-inflammatory response in A549 cells was evaluated through a comparative analysis of the actions of dexamethasone and *p*-coumaric acid. The results of this study indicated that both drugs were efficient in the inflammatory process. However, a joint analysis of the Raman technique with multivariate statistical methods revealed different action mechanisms of the drugs, indicating *p*-coumaric acid as a natural therapeutic compound for the treatment of inflammatory lung diseases. Additionally, the Raman technique was also used to investigate mechanisms of cell death induced by flavonoids in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. The biochemical changes observed in Raman spectra were associated with markers of cell death. Such alterations evidenced the major molecular mechanisms induced by flavonoids in cell behavior.

Keywords: Atomic Force Microscopy. Roughness. Elasticity. Thymocytes. Semaphorin 3A. Raman spectroscopy. Multivariate Statistical Methods. A549 cells. Dexamethasone. *p*-Coumaric acid. Inflammatory Process. Macrophages. Flavonoids. *Leishmania amazonensis*.

Lista de Figuras

Figura 1.1: Esquema ilustrativo do princípio de funcionamento do AFM. 18

Figura 1.2: Padrão de varredura ponta-amostra para a formação de imagens topográficas de AFM. Cada ponto da medida tem uma posição x , y e z bem definida. As linhas azuis sobrepostas à imagem correspondem aos movimentos de ida (traço), enquanto que as linhas vermelhas correspondem aos movimentos de volta (retraço). 19

Figura 1.3: Ilustração das forças de interação ponta-amostra. A região onde a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa é chamada região de não-contato, e a região onde a força interatômica é repulsiva é chamada região de contato. 21

Figura 1.4: Representação esquemática do modo de operação contato. 23

Figura 1.5: Representação esquemática do modo de operação não-contato. 24

Figura 1.6: Representação esquemática do modo de operação contato intermitente. 25

Figura 1.7: (a) Imagem de AFM ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$) da superfície de um queratinócito (célula do tecido epitelial), evidenciando as características morfológicas e a rugosidade da superfície. (b) Os perfis desenhados correspondem ao perfil de ondulação (linha preta) e ao perfil de rugosidade (linha cinza), que contém as informações relacionadas à rugosidade da membrana plasmática. 27

Figura 1.8: Curvas de força-distância medidas em um substrato de referência (vidro) e em uma amostra (célula). Essas curvas fornecem a relação entre a carga de força e o comprimento da indentação, calculado como a diferença entre as curvas. 29

Figura 1.9: Esquema da indentação de (a) uma esfera rígida e de (b) um cone rígido em uma superfície macia. 30

Figura 2.1: (a) Sistema de Microscopia de Varredura por Sonda (SPM) utilizado nas medições de AFM. (b) Detalhe da parte interna do SPM com destaque para as torres que controlam de modo independente cada ponteira, e a posição do porta-amostras posicionado sobre o *scanner* piezelétrico do AFM. 33

Figura 2.2: Imagens topográficas de AFM de timócitos (a) controle e (b) tratados com Sema3A; (c) e (d) Vista ampliada da região nuclear de ambas as superfícies celulares; (e) e (f) Perfis de altura tomados ao longo das linhas verdes em (a) e (b). Em cada um dos grupos foram analisadas mais de 30 células. 35

Figura 2.3: Histogramas das distribuições dos valores de rugosidade R_a e RMS calculados para os timócitos controle e tratados com Sema3A. Os ajustes da curva de distribuição normal são mostrados (curvas sólidas). 36

Figura 2.4: Curvas de força-distância geradas com AFM. Essas curvas foram medidas para um substrato de referência (vidro) e para os timócitos controle e tratados com Sema3A. A relação entre a carga de força e o comprimento de indentação foi calculada como a diferença entre cada uma destas curvas e a linha de referência. 38

Figura 2.5: *Box plots* dos módulos de Young de timócitos controle e tratados com Sema3A. O módulo de Young médio é dado pela linha horizontal dentro de cada caixa. 38

Figura 3.1: Espectro Raman não processado de células vivas de câncer de mama (linhagem MCF-7). A maioria das bandas Raman informativas ocorre no intervalo de 600-1800 cm^{-1} . .44

Figura 3.2: Esquema ilustrativo de um sistema típico de espectroscopia Raman, identificando seus principais componentes ópticos. 45

Figura 3.3: (a) Esquema de uma célula de levedura e (b) diferentes componentes da célula identificados por espectroscopia Raman sob excitação *laser* de 514,5 nm. 47

Figura 3.4: Exemplo de ajuste polinomial de um espectro celular (linhagem A549). A correção da linha de base, a normalização e a subtração do *background* de fluorescência foram realizadas nesse ajuste. 48

Figura 3.5: Decomposição da matriz de dados originais X em T (matriz de escores), P^T (matriz de pesos) e E (matriz de resíduos). 50

Figura 3.6: (a) Representação dos gráficos de (a) escores de $PC1 \times PC2$ e (b) pesos para o PC1 e o PC2. 50

Figura 3.7: Dendrograma resultante da análise de agrupamento utilizando a medida de distância euclidiana. 52

Figura 4.1: Secreção de IL-8 em células A549 estimuladas por extrato de fumaça de cigarro (EFC). (a) Células expostas ao EFC (2,5% e 5%). (b) Células pré-tratadas com dexametasona e depois expostas ao EFC (5%). (c) Células pré-tratadas com ácido *p*-cumárico e depois expostas ao EFC (5%). (d) EC_{50} para a dexametasona e o ácido *p*-cumárico na secreção de IL-8 induzida por EFC. As barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em comparação com os controles sem tratamento. 58

Figura 4.2: Espectro Raman dos seis grupos de células A549 expostas a diferentes tratamentos com fármacos e/ou estímulo com extrato de fumaça de cigarro (EFC). Os espectros Raman são as médias de 30 células para cada grupo na região de impressão digital (700-1800 cm^{-1}). As áreas sombreadas representam o desvio padrão das médias. 60

Figura 4.3: Análise de componentes principais (PCA). Gráficos de escores e gráficos de pesos para o PC1 para as células dos grupos: (a) controle e dex; (b) controle e *p*-cum; (c) dex e *p*-cum; (d) controle, dex e *p*-cum; (e) controle e EFC; e (f) controle, EFC, dex + EFC e *p*-cum + EFC. Os valores médios dos escores e os desvios padrão de cada grupo de amostra, comparados aos do grupo controle, estão indicados no lado esquerdo de cada gráfico. Os pesos para o PC1 mostram as características responsáveis pela diferenciação (ácidos nucleicos, proteínas e lipídios). 62

Figura 4.4: Análise de agrupamento hierárquico (HCA). Dendrogramas para as células dos grupos: (a) controle e dex; (b) controle e *p*-cum; (c) dex e *p*-cum; (d) controle, dex e *p*-cum; (e) controle e EFC; e (f) controle, EFC, dex + EFC e *p*-cum + EFC. 64

Figura 5.1: Espectros Raman de macrófagos infectados com *L. amazonensis* expostos a diferentes tratamentos. Os espectros Raman são as médias de 50 células para cada grupo na região de impressão digital (800-1800 cm^{-1}). (a) grupos controle e pentamidina, (b) grupos controle e (1), (c) grupos controle e (3), e (d) grupos (1) e (3). As linhas cinza representam o espectro da diferença computado entre os grupos de células. 69

Figura 5.2: Análise de componentes principais (PCA) de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Gráficos de escores do PCA para (a) grupos controle, pentamidina e (1), (b) grupos controle, pentamidina e (3), e (c) grupos controle, (1) e (3). 71

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFM	Microscópio de força atômica (<i>Atomic Force Microscope</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
COPD	Doença pulmonar obstrutiva crônica (<i>Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>)
CO ₂	Dióxido de Carbono
dex	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl Sulfoxide</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EFC	Extrato de Fumaça de Cigarro
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FBS	Soro bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
HCA	Análise de agrupamento hierárquico (<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>p</i>	Nível de significância estatística
<i>p</i> -cum	Ácido <i>p</i> -cumárico
PBS	Solução salina tamponada com Fosfato (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PC	Componente principal (<i>Principal Component</i>)
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PSD	Detector sensível à posição (<i>Position Sensitive Detector</i>)
R _a	Rugosidade média (<i>Roughness average</i>)
RMS	Rugosidade média quadrática (<i>Root Mean Square</i>)
rpm	rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
Sema3A	Semaforina 3A
SPM	Microscopia de varredura por sonda (<i>Scanning Probe Microscopy</i>)
STM	Microscópio de varredura por tunelamento (<i>Scanning Tunneling Microscope</i>)

Sumário

Introdução.	14
1. Microscopia de Força Atômica.	17
1.1 Introdução.	17
1.2 Princípio de funcionamento do AFM.	18
1.3 Forças de interação ponta-amostra.	20
1.4 Modos de operação.	22
1.5 AFM no estudo de células.	25
1.5.1 Morfologia e rugosidade celular.	26
1.5.2 Teoria da elasticidade celular.	28
2. Avaliação de alterações biomecânicas em timócitos tratados com Semaforina 3A.	31
2.1 Introdução.	31
2.2 Materiais e métodos.	32
2.2.1 Cultura celular e tratamento.	32
2.2.2 Medidas de AFM.	32
2.2.3 Análise estatística.	34
2.3 Resultados e Discussões.	34
2.3.1 Imagens topográficas e rugosidade de timócitos.	34
2.3.2 Análise do módulo de Young.	37
2.4 Conclusões.	39
3. Espectroscopia Raman.	40
3.1. Introdução.	40
3.2. Espalhamento Raman.	41
3.3. Modos vibracionais ativos no espectro Raman.	43
3.4. Instrumentação Raman.	45
3.5. Espectroscopia Raman no estudo de células.	46
3.5.1. Pré-processamento de espectros celulares.	47
3.5.2. Análise estatística multivariada.	48

4. Resposta anti-inflamatória induzida por fármacos em células A549 detectada por espectroscopia Raman.	53
4.1. Introdução.	53
4.2. Materiais e métodos.	54
4.2.1. Cultura celular.	54
4.2.2. Condições de cultura para estímulo e tratamentos.	54
4.2.3. Quantificação de IL-8 e análise estatística.	55
4.2.4. Aquisição dos espectros Raman.	55
4.2.5. Pré-processamento de dados e análise espectral.	56
4.3. Resultados e Discussões.	57
4.3.1. Dexametasona e ácido <i>p</i> -cumárico inibem a ativação de células A549 induzida por EFC.	57
4.3.2. Variabilidade espectral entre células A549 vivas.	59
4.3.3. Classificação espectral baseada no PCA e HCA.	60
4.4. Conclusões.	64
5. Investigação de mecanismos de morte celular induzidos por flavonoides em <i>Leishmania amazonensis</i> através da espectroscopia Raman.	66
5.1. Introdução.	66
5.2. Materiais e métodos.	67
5.2.1. Cultura celular, infecção e tratamento.	67
5.2.2. Aquisição dos espectros Raman.	67
5.2.3. Pré-processamento de dados e análise espectral.	68
5.3. Resultados e Discussões.	68
5.3.1. Espectros Raman de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	68
5.3.2. Classificação espectral baseada no PCA.	71
5.4. Conclusões.	72
Conclusões Finais e Perspectivas.	73
Referências.	75
Anexos.	87

Introdução

A análise estrutural de materiais teve um grande avanço nos últimos anos, associado ao desenvolvimento das técnicas de Microscopia de Varredura por Sonda (SPM)¹. No início dos anos 80, esse novo ramo da microscopia encantou o mundo com as primeiras imagens, no espaço real, de superfícies com resolução atômica². Desde então, a técnica de SPM vem sendo utilizada em várias áreas do conhecimento, proporcionando um extraordinário impulso na ciência e tecnologia.

Esta geração de novos microscópios surgiu como resultado do trabalho de Gerd Binnig e Heinrich Rohrer nos laboratórios da IBM, em Zurique, após inventarem, em 1981, o Microscópio de Varredura por Tunelamento (STM)³, pelo qual receberam o Prêmio Nobel de Física em 1986. No entanto, nenhum outro microscópio de varredura por sonda ganhou tanto destaque quanto o Microscópio de Força Atômica (AFM)⁴. Criado em 1986 por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber, o AFM transformou-se em uma técnica multifuncional apropriada para a caracterização da topografia e propriedades mecânicas em escala nanométrica, devido às inúmeras vantagens que possui: fornece imagem tridimensional da superfície da amostra com alta resolução; investiga não apenas materiais condutores, mas também todo tipo de material isolante; possibilita a análise em diversificados ambientes, no ar ou até mesmo em líquidos; exige preparação mínima da amostra ou qualquer tipo de revestimento que possa alterá-la ou danificá-la.

Em geral, os estudos que utilizam o AFM são em aplicações topográficas, que consistem em obter imagens da superfície das amostras para uma caracterização estrutural e dinâmica^{5; 6}, onde é possível investigar propriedades como rugosidade, dureza, porosidade e atrito, além do estudo de cargas superficiais e domínios elétricos e magnéticos⁷. As aplicações da microscopia de força atômica vão desde o estudo de polímeros, metais e semicondutores, nanopartículas e até mesmo átomos individuais^{8; 9; 10}. Devido a sua versatilidade e possibilidade de operação em meios aquosos, tornou-se uma ferramenta fundamental no estudo de materiais biológicos em condições fisiológicas, onde as amostras são mantidas em seu meio, sem perder suas propriedades¹¹. Através das imagens de AFM, é possível obter detalhes nanoestruturais e propriedades biomecânicas de amostras biológicas, possibilitando a compreensão dos fenômenos biofísicos envolvidos¹². Sua utilização no estudo desses

materiais tem sido vista como uma nova área de pesquisa denominada biologia de superfície¹³.

Cada vez mais está se tornando claro que as células são capazes de responder a uma grande variedade de sinais nanomecânicos que surgem no seu microambiente, mostrando uma rica interface entre as sinalizações físicas e as bioquímicas que ocorrem tanto nas células vivas saudáveis com nas doentes. Este fato evidencia que a resposta das células a perturbações físicas possui um papel fundamental nos processos biológicos. Para uma melhor compreensão desses processos, também é fundamental uma análise biomolecular detalhada, uma vez que as interações moleculares fornecem uma análise qualitativa e quantitativa da composição das amostras. Dentre as técnicas que permitem determinar as estruturas moleculares e as ligações químicas presentes na amostra, destaca-se a Espectroscopia Raman. Esta técnica é baseada no efeito Raman, que descreve o fenômeno de espalhamento inelástico da luz. Este efeito foi previsto teoricamente em 1923 por Adolf Smekal¹⁴, e observado experimentalmente pela primeira vez em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman¹⁵, pelo qual recebeu o Prêmio Nobel de Física em 1930.

A espectroscopia Raman apresenta inúmeras vantagens que superam às demais técnicas ópticas: devido a sua ultrasensibilidade, fornece informação molecular precisa; o curto tempo de aquisição das análises permite resultados em tempo real; sua utilização requer o mínimo ou nenhum preparo prévio das amostras; devido ao seu caráter não destrutivo e não invasivo, pode ser aplicada a amostras sólidas, líquidas e gasosas, dentre materiais orgânicos e inorgânicos. A alta precisão e sensibilidade na detecção de alterações bioquímicas e moleculares torna a técnica Raman adequada para o estudo de amostras complexas como biofluidos, tecidos e células^{16; 17; 18}. Ela tem se mostrado muito promissora para fins de diagnóstico óptico, principalmente devido à análise da região de impressão digital espectral ($800-1800\text{ cm}^{-1}$)¹⁹, onde se encontram as informações bioquímicas mais importantes, relacionadas a aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Essa composição complexa das células dá origem a espectros Raman igualmente complexos, com picos sobrepostos originados de vibrações moleculares em vários componentes celulares. Devido a essa complexidade e a grande quantidade de dados contidos nesses espectros, muitas vezes torna-se necessário o uso de métodos estatísticos multivariados que auxiliem na análise dos dados. Assim, a espectroscopia Raman pode ser usada em conjunto com tais métodos a fim de possibilitar uma melhor compreensão de eventos biológicos fundamentais *in vitro*.

Nesta tese, serão apresentados os conceitos físicos e a aplicabilidade das técnicas de microscopia de força atômica e espectroscopia Raman no estudo de amostras biológicas. De

fato, o principal objetivo é demonstrar o potencial destas técnicas na avaliação de alterações biomecânicas e bioquímicas induzidas por fármacos em células biológicas.

No capítulo 1, serão apresentados os aspectos teóricos da técnica de AFM, os princípios básicos de operação e funcionamento, as forças envolvidas na interação ponta-amostra, os modos de operação e a aplicabilidade desta técnica no estudo de células, destacando sua capacidade de medição de propriedades biomecânicas, tais como a rugosidade e a elasticidade celular. No capítulo 2, esta técnica é utilizada na avaliação de alterações biomecânicas em timócitos tratados com Semaforina 3A.

No capítulo 3, serão apresentados os aspectos teóricos da técnica Raman, como ocorre o espalhamento Raman, os modos vibracionais ativos e a aplicabilidade da técnica no estudo de células, destacando a análise conjunta com métodos estatísticos multivariados na interpretação dos dados espectrais. No capítulo 4, a técnica Raman é utilizada em conjunto com esses métodos para avaliar a resposta anti-inflamatória induzida por fármacos em células epiteliais (linhagem A549), através de uma análise comparativa das ações da dexametasona e do ácido *p*-cumárico. Já no capítulo 5, esta técnica é utilizada, também em combinação com métodos estatísticos, para investigar mecanismos de morte celular induzidos por flavonoides em macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Por fim, será apresentada uma conclusão geral a respeito dos resultados obtidos nos estudos desenvolvidos nesta tese e algumas perspectivas de trabalhos futuros. Seguem-se as referências bibliográficas e a produção científica decorrente desta tese.

1. Microscopia de Força Atômica

Neste capítulo serão apresentados os aspectos teóricos da técnica de AFM, os princípios básicos de operação e funcionamento, as forças envolvidas na interação ponta-amostra, os modos de operação e a aplicabilidade desta técnica no estudo de células, destacando sua capacidade de medição de propriedades biomecânicas, tais como a rugosidade e a elasticidade celular.

1.1 Introdução

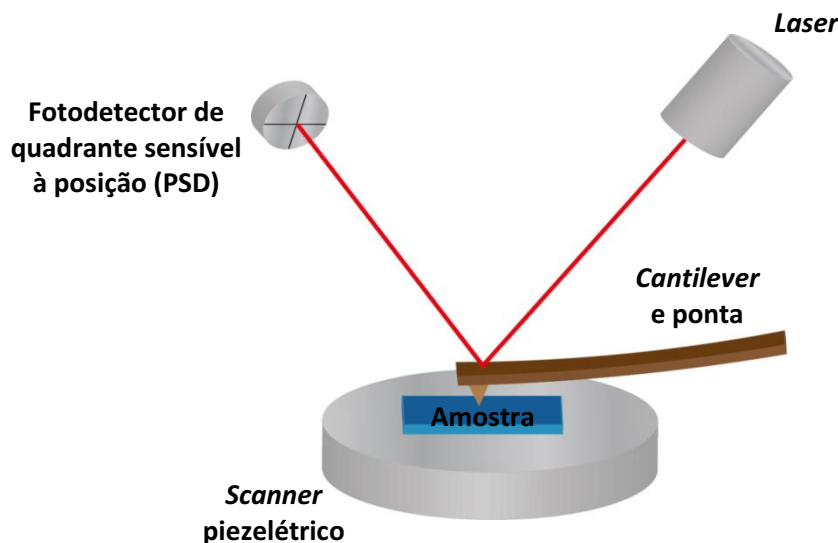
A caracterização morfológica e topográfica de micro e nanoestruturas de superfícies é de indiscutível relevância para diversos ramos de pesquisa. Neste contexto, a Microscopia de Varredura por Sonda assumiu grande importância por apresentar uma família de técnicas avançadas para análise de superfícies²⁰. O atual progresso desse tipo de microscopia para caracterização de materiais tem sido através da Microscopia de Força Atômica.

Desde a sua invenção em 1986, por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber⁴, o microscópio de força atômica tem promovido um grande impacto na ciência, de uma forma geral, devido a sua capacidade de gerar imagens tridimensionais de superfícies com resolução atômica, proporcionando o estudo da morfologia e de propriedades locais dos materiais analisados, como por exemplo, análise fractal, rugosidade e dureza. Assim, o AFM transformou-se em uma vasta plataforma de novas microscopias para obtenção de informações sobre propriedades elétricas (potencial, condutividade), magnéticas, mecânicas (adesão, dureza), térmicas (condutividade, transições) e químicas (composição, interações) de superfícies. A análise de superfícies com AFM possibilita o exame de uma variedade de materiais, condutores ou não, que vão desde átomos de carbono a protuberâncias nanométricas na superfície de células. Todas essas características fazem desse microscópio uma ferramenta extremamente útil para caracterização e produção de novos materiais.

1.2 Princípio de funcionamento do AFM

O princípio de funcionamento de um microscópio de força atômica baseia-se no uso de uma sonda que possui uma ponta extremamente afiada, que varre a superfície da amostra que se quer investigar. A sonda é montada sobre a extremidade livre de um *cantilever* flexível, que geralmente mede entre 100 e 500 μm de comprimento, e é colocada em contato ou muito próxima da superfície da amostra sob inspeção. Quando a ponta do AFM se aproxima da superfície da amostra, surgem forças de interação entre os primeiros átomos da ponta e os átomos ou moléculas que compõem a superfície da amostra. Ao longo da varredura, o *cantilever* sofre deflexões devido a essas forças, que podem ser atrativas ou repulsivas, desviando o *laser* que incide sobre ele, conforme ilustrado na Figura 1.1.

Figura 1.1: Esquema ilustrativo do princípio de funcionamento do AFM.

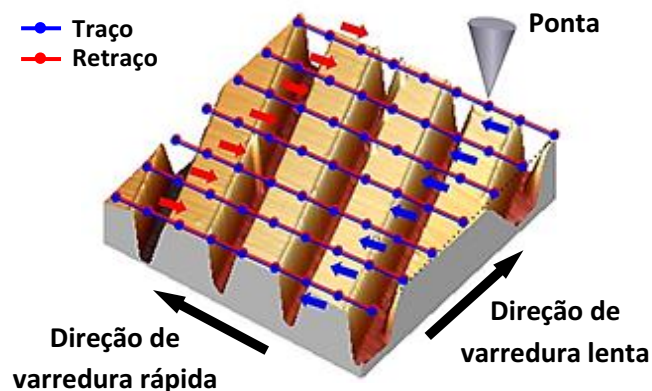


Fonte: Autora, 2018

O *laser* incide no *cantilever* e é refletido para um fotodetector (fotodiodo) de quadrante sensível à posição ou PSD (do inglês *Position Sensitive Detector*)²¹, que mede as deflexões do *cantilever* à medida que a ponta varre a amostra. Ao passo que o *cantilever* se movimenta, a posição do feixe de *laser* no fotodetector varia. Essas informações de desvio do *cantilever* são enviadas para os circuitos de realimentação, que ajustam a posição da amostra (e/ou da ponta) através de um *scanner* piezoeletrico. Todo este processo é controlado por um computador, que movimenta o *scanner*, armazena os dados e os converte em um mapa da topografia da superfície da amostra, por meio de *softwares* específicos para isso²².

A imagem formada através das medidas de AFM é tridimensional. Cada imagem é formada por y linhas com x pontos em cada linha, e cada ponto da imagem é determinado pelas coordenadas x , y e z , onde z é a altura. O processo de formação da imagem se dá da seguinte maneira: a amostra é analisada movendo-se a ponta sobre a sua superfície; a ponta move-se ao longo da primeira linha de varredura em pequenos passos, e a cada passo realiza uma medida, que é armazenada pelo sistema. Ao chegar ao final da linha, a ponta volta sobre ela e as informações do retorno da ponta também são armazenadas. A ponta dá um passo na direção perpendicular e então passa para a segunda linha de varredura, e assim sucessivamente, até o fim da área pré-estabelecida para análise. As linhas que correspondem aos movimentos de ida são geralmente chamadas de “traço”, enquanto que as linhas que correspondem aos movimentos de volta são geralmente chamadas de “retraço”. A imagem topográfica final é, então, reconstruída pelas informações das linhas varridas, conforme ilustrado na Figura 1.2.

Figura 1.2: Padrão de varredura ponta-amostra para a formação de imagens topográficas de AFM. Cada ponto da medida tem uma posição x , y e z bem definida. As linhas azuis sobrepostas à imagem correspondem aos movimentos de ida (traço), enquanto que as linhas vermelhas correspondem aos movimentos de volta (retraço).



Fonte: Retirada da ref.[²³]

A direção de varredura lenta corresponde à direção perpendicular em que a ponta avança, linha por linha; já a direção de varredura rápida corresponde à varredura ponto a ponto em uma determinada linha. O espaçamento entre cada ponto é chamado de tamanho do passo, e é determinado pelo tamanho da varredura e pelo número de pontos em cada linha.

Para alcançar resolução atômica em uma imagem de AFM, é fundamental que a ponta seja “atômica e afiada”, ou seja, a ponta deve terminar em um pequeno aglomerado de

átomos ou em um único átomo²⁴. Outros aspectos que podem determinar uma boa resolução são a geometria e o material que compõe a ponta, pois a escolha de uma ponta não apropriada para determinada análise, pode dar origem aos chamados artefatos de imagem, isto é, traços falsos que escondem a verdadeira morfologia da superfície da amostra²⁵.

1.3 Forças de interação ponta-amostra

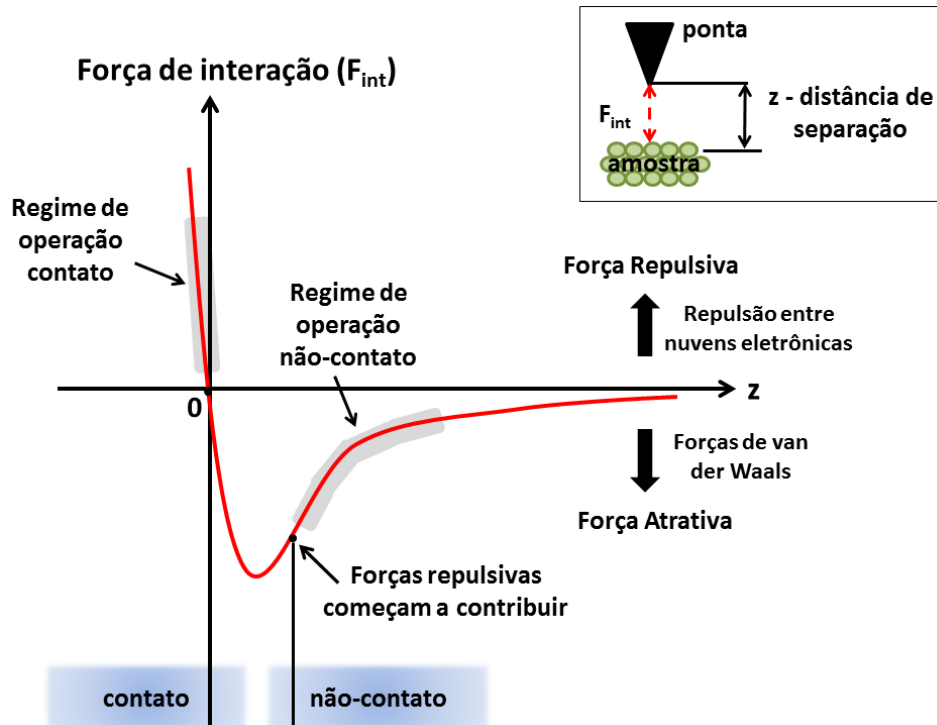
Ao longo da varredura, os átomos da ponta do AFM interagem com os átomos da superfície da amostra e, dependendo da distância ponta-amostra, as forças de interação podem ser atrativas ou repulsivas. A longas distâncias, praticamente não há qualquer interação. Porém, à medida que a ponta se aproxima da amostra, forças atrativas passam a atuar entre a ponta e a amostra. Conforme a ponta se aproxima, a força atrativa aumenta, até que a separação seja da ordem da separação interatômica ($z \approx 0,5$ nm). A partir deste ponto, forças repulsivas entre as nuvens eletrônicas das camadas de valência da ponta e da amostra passam a atuar, e a força resultante total passa a ser repulsiva. A Figura 1.3 mostra uma ilustração das forças de interação, como uma função da distância de separação z entre a ponta e a amostra.

O potencial de Lennard-Jones²⁶ está na origem das forças que determinam as interações entre a ponta e a superfície da amostra, e é descrito pela expressão:

$$U(z) = \frac{\alpha}{z^{12}} - \frac{\beta}{z^6} \quad (1.1)$$

onde z é a distância entre as moléculas ou átomos e α e β são constantes. O primeiro termo do lado direito da equação (1.1) é repulsivo, e resulta da repulsão eletrostática entre duas moléculas quando as suas nuvens eletrônicas se aproximam. Este termo domina o valor final do potencial a curtas distâncias. Já o segundo termo é atrativo e resulta de uma interação dipolo-dipolo, conhecida como interação de van der Waals. Este termo domina o valor final do potencial a longas distâncias²⁶. Assim, as forças de repulsão entre nuvens eletrônicas e as forças de van der Waals são as forças de interação ponta-amostra mais determinantes. No entanto, deve-se ressaltar que existem outros tipos de interação que podem ser consideradas, como forças magnéticas e atração gravitacional. Entretanto, dentro da região de interação ponta-amostra elas são muito fracas quando comparadas com as forças citadas anteriormente, sendo assim é possível desprezá-las.

Figura 1.3: Ilustração das forças de interação ponta-amostra. A região onde a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa é chamada região de não-contato, e a região onde a força interatômica é repulsiva é chamada região de contato.



Fonte: Autora, 2018

Forças de repulsão entre nuvens eletrônicas

As forças de repulsão entre nuvens eletrônicas constituem o termo repulsivo do potencial de Lennard-Jones. São forças de curto alcance e originam-se no princípio de exclusão de Pauli, o qual afirma que dois férmions idênticos não podem ocupar o mesmo estado quântico simultaneamente²⁷. Ou seja, a repulsão acontece quando os átomos da ponta e os átomos da amostra estão tão próximos que ocorre a interpenetração das suas nuvens eletrônicas e a consequente sobreposição de orbitais completamente preenchidos, causando uma repulsão entre essas nuvens, enfraquecendo a força atrativa. Desse modo, verifica-se um aumento da energia eletrostática total do sistema que origina uma contribuição repulsiva para a força de interação total.

Forças de van der Waals

As interações de van der Waals constituem o termo atrativo do potencial de Lennard-Jones. São forças de longo alcance, podendo ser sentidas a distâncias superiores a 10 nm. Elas surgem a partir da interação entre dipolos elétricos e são compostas por três contribuições distintas: forças de orientação, de indução e de dispersão. As forças de orientação resultam da interação entre duas moléculas polares com momentos de dipolo permanentes, enquanto que as forças de indução se devem à interação de uma molécula polar com uma molécula não polar. Já as forças de dispersão são originadas pela polarização instantânea devida às flutuações dos elétrons em torno do núcleo, e representam a contribuição mais relevante para a força de van der Waals total²⁸.

1.4 Modos de operação

Conforme o caráter atrativo ou repulsivo da interação entre a ponta e a superfície da amostra, pode-se definir alguns modos de operação na técnica de AFM. São eles:

- **Modo contato:** onde a interação ponta-amostra é repulsiva;
- **Modo não-contato:** onde a interação ponta-amostra é atrativa;
- **Modo contato intermitente:** onde o regime ora é atrativo, ora é repulsivo.

Modo contato

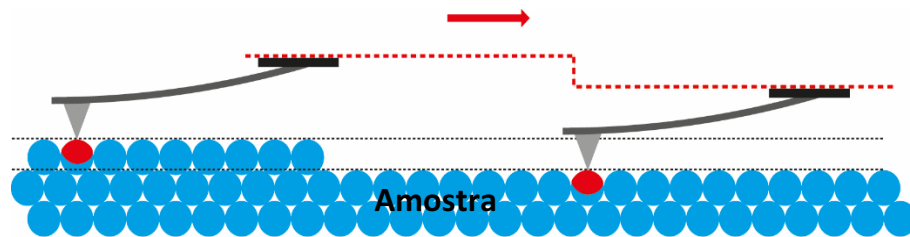
No modo de operação contato, o *cantilever* está sempre em contato com a superfície da amostra durante a varredura. A resultante das forças de interação ponta-amostra responsável pela deflexão do *cantilever* é dada pela expressão:

$$F = kz \quad (1.2)$$

onde k é a constante elástica do *cantilever* e z é a deflexão do *cantilever*. A interação é governada principalmente por forças repulsivas de curto alcance. Por atuar na região de forças repulsivas, a constante elástica do *cantilever* deve ser muito menor que as constantes elásticas

dos materiais que serão analisados, para que a sua deflexão acompanhe todas as deformações da superfície em análise e não danifique a amostra. O modo contato permite obter imagens topográficas com altíssima resolução, a nível atômico, porém, é recomendável usá-lo em amostras parcialmente duras, pois o atrito entre a ponta e a amostra pode danificar a superfície, caso ela seja macia, produzindo uma imagem distorcida. A Figura 1.4 ilustra o modo de operação contato.

Figura 1.4: Representação esquemática do modo de operação contato.



Fonte: Autora, 2018

Modo não-contato

No modo de operação não-contato, a ponta é mantida afastada da superfície (espaçamento da ordem de alguns nanômetros), de maneira que as principais forças de interação sejam as de longo alcance. O *cantilever* é forçado a vibrar com o auxílio de um elemento piezelétrico, com uma frequência ω_d próxima da sua frequência de ressonância ω_0 .

Por atuar na região de forças atrativas, o *cantilever* deve ser suficientemente rígido, com constante elástica de valor alto. O movimento do *cantilever* pode ser descrito pelo modelo do oscilador forçado seguindo a equação de movimento²⁹:

$$m\ddot{z} + \left(\frac{m\omega_0}{Q}\right)\dot{z} + m\omega_0 z = F_0 \cos(\omega_d t) \quad (1.3)$$

cuja solução estacionária é

$$z(t) = A \cos(\omega_d t + \phi) \quad (1.4)$$

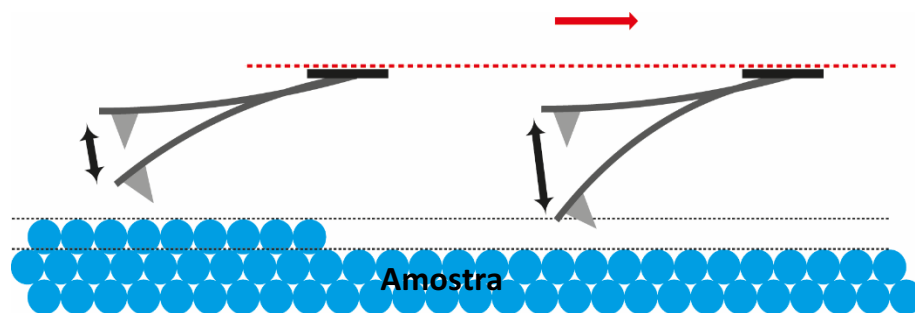
onde A é a amplitude da oscilação à frequência ω_d e ϕ é a diferença de fase entre a resposta do sistema e a excitação a que está sujeito. A amplitude e fase são dadas, respectivamente, pelas equações:

$$A = \frac{F_0/m}{\sqrt{(\omega_0^2 - \omega_d^2)^2 + \left(\frac{\omega_0 \omega_d}{Q}\right)^2}} \quad (1.5)$$

$$\phi = \tan^{-1} \left(\frac{\omega_0 \omega_d}{Q(\omega_0^2 - \omega_d^2)} \right) \quad (1.6)$$

de onde se observa que uma variação das forças e conseqüentemente da frequência de ressonância leva a uma variação quer da amplitude quer da fase de oscilação do *cantilever*. Diferentemente do modo contato, este modo apresenta a vantagem de não danificar a superfície da amostra, devido à ponta estar sempre afastada durante a varredura. Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral devido à instabilidade e resolução reduzida³⁰, sendo geralmente utilizado para a realização de imagens de amostras maleáveis ou elásticas. A Figura 1.5 ilustra o modo de operação não-contato.

Figura 1.5: Representação esquemática do modo de operação não-contato.



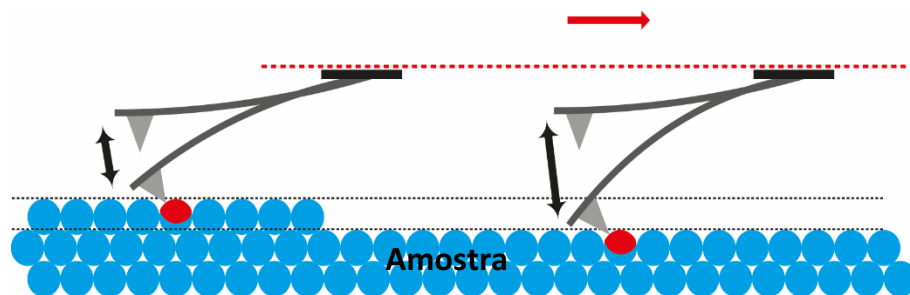
Fonte: Autora, 2018

Modo contato intermitente

No modo de operação contato intermitente, a ponta oscila sobre a superfície da amostra, tocando-a periodicamente. O *cantilever* é forçado a oscilar com uma frequência

próxima da sua frequência de ressonância, por isso a necessidade de uma constante elástica de valor alto, assim como no modo não-contato. A amplitude de vibração é mantida constante e sempre que a ponta toca na amostra, a amplitude sofre um desvio que é detectado e serve de sinal de realimentação. A descrição matemática apresentada para o modo não-contato também pode ser utilizada para este modo. A Figura 1.6 ilustra o modo de operação contato intermitente.

Figura 1.6: Representação esquemática do modo de operação contato intermitente.



Fonte: Autora, 2018

O modo de contato intermitente reúne vantagens dos dois modos anteriores: como há contato físico entre a ponta e a amostra, consegue-se imagens com alta resolução (~ 1 nm), e devido a movimentação ser feita com a ponta no ar, as forças de atrito entre a ponta e a superfície da amostra são significativamente reduzidas, eliminando os problemas de deformação da amostra presentes no modo contato. Desse modo, a resolução das imagens topográficas, em particular de amostras maleáveis, é melhorada^{30; 31}.

1.5 AFM no estudo de células

Propriedades nanomecânicas e forças em nanoescala que surgem no ambiente celular vêm tendo um impacto notável sobre a fisiologia e a função de células vivas e organismos³²; ³³. Nesse ambiente, as células são dotadas de vários mecanismos para detectar propriedades físicas e forças mecânicas^{34; 35}. Estas sinalizações físicas induzem uma variedade de respostas biológicas, as quais desempenham um papel crucial *in vivo*, sobretudo na regulação dinâmica

da célula. Nesse cenário, um crescente interesse biológico nas propriedades mecânicas de células enfatiza a importância da aplicação do AFM nesses estudos.

Originalmente, o AFM foi desenvolvido para a obtenção de imagens topográficas de superfícies de diferentes amostras; no entanto, foi rapidamente aplicado para a medição de detalhes nanoestruturais e propriedades biomecânicas de amostras biológicas, em especial de células^{36; 37}, devido principalmente à sua capacidade de operação em diversas condições ambientes (meios líquidos, gasosos e em vácuo) permitindo, por exemplo, o estudo em tempo real de fenômenos dinâmicos de amostras vivas em seu ambiente biológico³⁸.

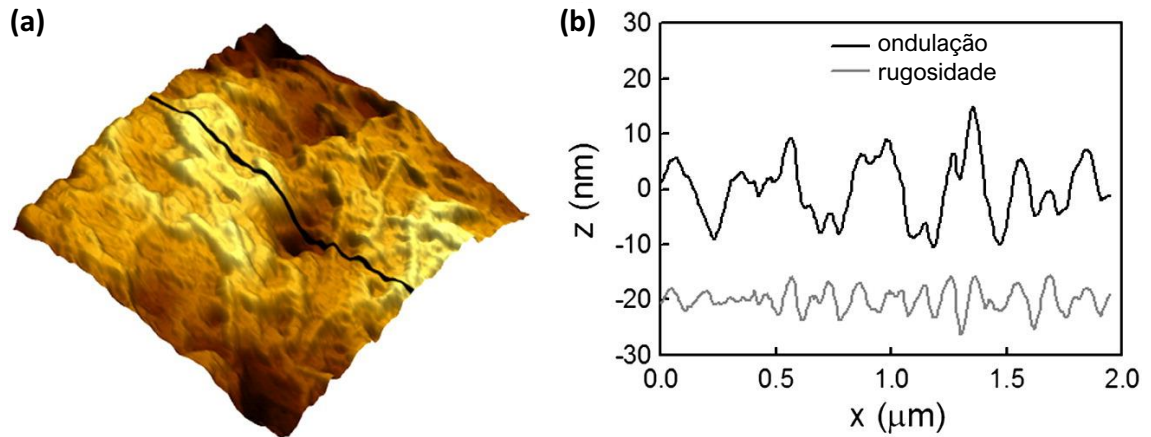
As propriedades biomecânicas das células são cruciais para uma série de processos biológicos, tais como desenvolvimento celular³⁹, divisão⁴⁰, migração^{41; 42; 43} e diferenciação⁴⁴. Além disso, estudos sobre tais propriedades das células têm proporcionado informações fundamentais sobre suas estruturas e funções biológicas⁴⁵. Por meio do AFM, é possível detectar variações nas propriedades mecânicas e morfológicas das células, como a rugosidade e o módulo de elasticidade^{34; 46}. Tais propriedades são características fundamentais que podem ser usadas, por exemplo, para inferir o estado fisiológico e/ou doente de células^{47; 48}, e até mesmo indicar a presença de parasitas⁴⁹.

1.5.1 Morfologia e rugosidade celular

O AFM tem se mostrado uma ferramenta apropriada para a investigação da topografia da superfície de membranas biológicas, pois possibilita a reconstrução exata dos aspectos morfológicos tridimensionais da superfície das amostras⁵⁰. Esse microscópio fornece imagens da superfície celular com uma resolução lateral de alguns nanômetros e uma sensibilidade vertical de 1Å sem danificar a estrutura das células^{51; 52}, e tem sido utilizado, por exemplo, para obtenção de imagens de alta resolução em proteínas da membrana de bactérias e na aplicação em células vivas, revelando novas estruturas celulares e suas funções^{53; 54}.

Além da morfologia, as imagens de AFM permitem investigar propriedades da superfície celular, tais como a rugosidade, que pode ser definida como o conjunto de irregularidades formado por saliências e reentrâncias (com pequena amplitude) de uma superfície. A Figura 1.7 mostra uma imagem de AFM da superfície de uma célula, evidenciando as características morfológicas da superfície e a rugosidade da membrana.

Figura 1.7: (a) Imagem de AFM ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$) da superfície de um queratinócito (célula do tecido epitelial), evidenciando as características morfológicas e a rugosidade da superfície. (b) Os perfis desenhados correspondem ao perfil de ondulação (linha preta) e ao perfil de rugosidade (linha cinza), que contém as informações relacionadas à rugosidade da membrana plasmática.



Fonte: Adaptada da ref.[48]

A rugosidade pode ser estimada, por exemplo, através dos seguintes parâmetros: rugosidade média e rugosidade média quadrática. A rugosidade média (R_a) é definida como a média absoluta das alturas das irregularidades ao longo do perfil. Matematicamente, ela pode ser expressa da seguinte forma:

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |z_i - \bar{z}| \quad (1.7)$$

onde N é o número de pontos da amostra, z_i é a altura de cada ponto da amostra e \bar{z} é a altura média dos pontos da amostra. Esse parâmetro fornece uma boa descrição geral dos valores da altura das irregularidades. Já a rugosidade média quadrática (RMS) é definida como a raiz quadrada da média dos quadrados das alturas das irregularidades ao longo do perfil. Matematicamente, temos:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (z_i - \bar{z})^2}{N}} \quad (1.8)$$

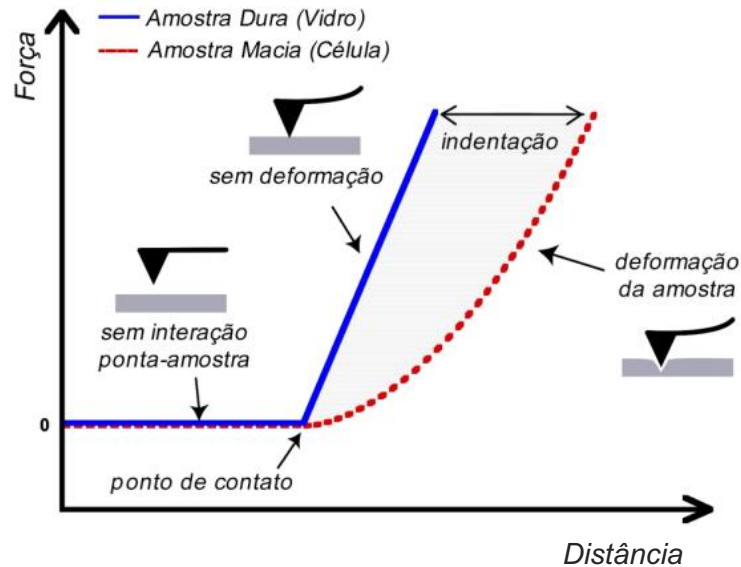
Esse parâmetro descreve a rugosidade usando um método estatístico, pois representa o desvio-padrão da distribuição das alturas da superfície. Os valores de R_a e RMS podem ser considerados como parâmetros confiáveis relacionados à rugosidade superficial das membranas⁵⁵. A rugosidade da membrana celular é um importante parâmetro citológico, pois está envolvida em vários mecanismos celulares^{56; 57} e, conseqüentemente, é um indicador sensível do estado de saúde da célula.

1.5.2 Teoria da elasticidade celular

Além de medidas topográficas, o AFM também pode ser usado para medir forças entre a ponta e a superfície das células, elucidando propriedades mecânicas locais como a elasticidade. As propriedades elásticas das células podem ser alteradas, por exemplo, por mudanças organizacionais ou moleculares ocorridas no seu interior. O módulo elástico (ou módulo de Young) é uma propriedade mecânica que mede a rigidez de um material⁵⁸. Essa propriedade tem sido usada como um indicador de elasticidade celular e tem permitido, por exemplo, a detecção de células cancerosas, abrindo a perspectiva de usar este parâmetro em estudos clínicos como um biomarcador no diagnóstico precoce do câncer^{59; 60}.

As medidas de elasticidade são baseadas na indentação de células aderidas a um substrato. A técnica consiste em penetrar a ponta do AFM na superfície da amostra, registrando a força e a profundidade de penetração (distância) simultaneamente. Esse processo resulta em uma deflexão do *cantilever*, e essa força sentida pela ponta do AFM, após se aproximar e retraindo a partir de um ponto sobre a superfície da amostra, apresenta-se sob a forma de curvas força-distância⁶¹, como mostra a Figura 1.8. A elasticidade celular é determinada com base nessas curvas, as quais levam ao comprimento de indentação, obtido a partir da diferença entre as deflexões do *cantilever* em superfícies de amostras duras e macias. Ao indentar uma amostra dura, tal como o vidro, a deflexão do *cantilever* reflete a posição da amostra, e é representada por uma curva de inclinação linear, geralmente usada como referência. No entanto, em amostras macias como as células, as deflexões do *cantilever* são muito menores devido à indentação. Sendo assim, a curva de força resultante possui um caráter não linear.

Figura 1.8: Curvas de força-distância medidas em um substrato de referência (vidro) e em uma amostra (célula). Essas curvas fornecem a relação entre a carga de força e o comprimento da indentação, calculado como a diferença entre as curvas.



Fonte: Retirada da ref.[23]

Em geral, o valor do módulo de Young de células é obtido a partir do modelo da teoria da indentação elástica de Hertz⁶². Nesse modelo, se a ponta do AFM é considerada como sendo uma esfera de raio R , então a força no *cantilever* é dada por:

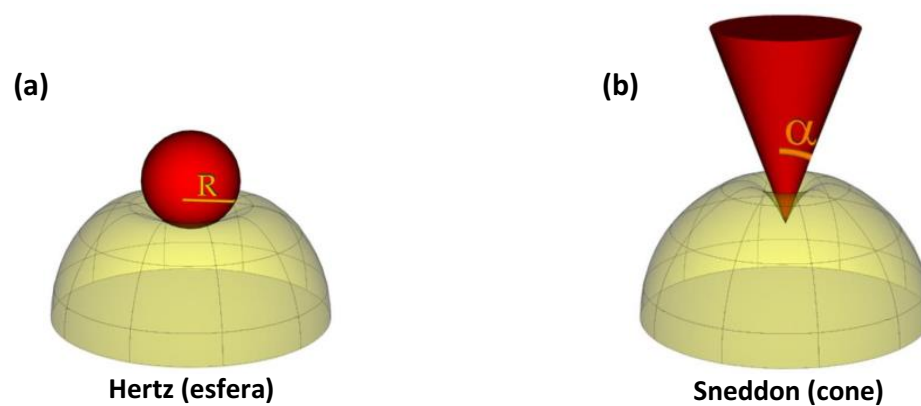
$$F(\delta) = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} \sqrt{R} \delta^{3/2} \quad (1.9)$$

onde E é o módulo de Young, ν é a razão de Poisson⁶³ da amostra e δ é o comprimento de indentação. A razão de Poisson mede a deformação lateral de um material homogêneo e isotrópico em relação à sua deformação longitudinal. Para amostras incompressíveis, como as células, essa razão é geralmente considerada como $\nu = 0,5$. Quando a ponta do AFM é considerada como sendo um cone, o modelo de Hertz modificado por Sneddon⁶⁴ é usado para caracterizar as curvas de força e obter a indentação elástica das células. Nesse modelo, a força no *cantilever* é dada por:

$$F(\delta) = \frac{2 E \tan \alpha}{\pi (1 - \nu^2)} \delta^{3/2} \quad (1.10)$$

onde α é o ângulo de meio cone da ponta do AFM. O esquema das indentações elásticas modeladas por esses modelos é ilustrado na Figura 1.9. O modelo de Hertz é válido para indentações significativamente menores do que o raio da esfera (Figura 1.9(a)), enquanto que para o modelo derivado por Sneddon, o comprimento da indentação deve ser na faixa de algumas centenas de nanômetros (Figura 1.9(b)). A análise das curvas de força-distância e a aplicabilidade destes modelos são descritas com grande detalhe em vários trabalhos^{45; 59; 65}.

Figura 1.9: Esquema da indentação de (a) uma esfera rígida e de (b) um cone rígido em uma superfície macia.



Fonte: Retirada da ref.[²³]

2. Avaliação de alterações biomecânicas em timócitos tratados com Semaforina 3A

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais das medidas utilizando o AFM para investigação dos efeitos do tratamento com Semaforina 3A em timócitos *in vitro*. Os resultados indicam que parâmetros como a morfologia, a rugosidade e o módulo elástico dos timócitos foram afetados pelo tratamento, demonstrando, assim, o potencial do AFM no estudo de propriedades biomecânicas de células.

2.1 Introdução

Diversas substâncias são capazes de perturbar a arquitetura do citoesqueleto, resultando em mudanças nas propriedades mecânicas das células, que podem afetar o seu comportamento⁶⁶. Por exemplo, as semaforinas são proteínas que podem alterar a organização do citoesqueleto de filamentos de actina e a rede de microtúbulos, ambos envolvidos na migração celular e na comunicação célula-célula⁶⁷. Elas fazem parte de uma família de proteínas secretadas associadas à membrana e são expressas na maioria dos tecidos^{68; 69}. Com base em suas características estruturais, são divididas em sete classes, sendo as semaforinas de classe 3 (Sema3) um grupo de proteínas solúveis que estão envolvidas na adesão e migração celular⁷⁰, e possuem características desejáveis do ponto de vista terapêutico⁷¹. Um dos membros dessa classe, a Semaforina 3A (Sema3A), foi demonstrada estar envolvida na orientação neuronal e também estar associada com distúrbios imunológicos⁷². Essa proteína regula a função celular e é expressa pela maioria das células imunológicas.

Os timócitos são células produzidas no timo, um órgão linfóide primário responsável pelos componentes celulares do sistema imunológico. Dentro do timo, os timócitos entram em um processo de seleção e maturação, sendo capazes de se diferenciar em outras células do sangue, os linfócitos T ou células T⁷³. Essas células são importantes para o sistema imunológico pois desempenham funções imunes em condições patológicas do organismo. Nesse cenário, o AFM foi utilizado para investigar os efeitos do tratamento com Sema3A nas propriedades biomecânicas de timócitos *in vitro*. Para isso, além da morfologia, foram

avaliadas a rugosidade da membrana e a elasticidade das células. Os resultados obtidos evidenciam o potencial da técnica para estudos de propriedades biofísicas em biologia celular.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Cultura celular e tratamento

Os timócitos frescos foram obtidos de camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 4 e 6 semanas. Após a eutanásia, os timos dos animais foram removidos assepticamente e macerados para liberar os timócitos. Estas células foram mantidas a 4°C em meio completo até serem usadas nos experimentos [meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS, 2 mM de glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina (todos da Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)]. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal de Alagoas (Protocolo 14/2015). Este tipo de célula foi escolhido devido à sua disponibilidade e abundância em vários organismos, além de seu importante papel na manutenção da homeostase^{74; 75}.

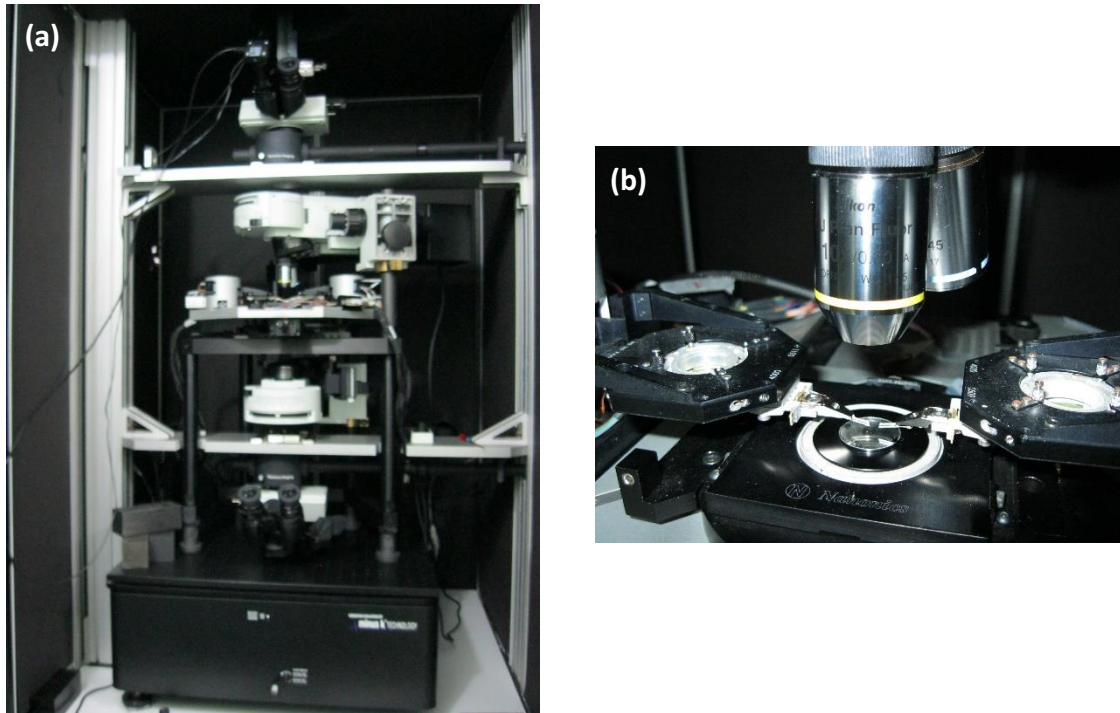
Os timócitos (5×10^6) foram cultivados em lamínulas de vidro revestidas com 0,1% de BSA diluída em PBS durante uma hora a 37°C. As lamínulas foram inseridas em uma placa de 24 poços, e os timócitos foram expostos à Sema3A por 30 minutos. Em seguida, essas células foram fixadas com uma solução de glutaraldeído a 0,5%. A Sema3A recombinante de camundongo (R&D Systems, Lille, França) foi utilizada em uma concentração de 100 ng/mL para tratar os timócitos⁷² em um meio composto de 2% de FBS/RPMI-1640 a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

2.2.2 Medidas de AFM

As imagens de AFM da morfologia e as medidas de elasticidade dos timócitos foram obtidas utilizando um microscópio de força atômica Multiview 1000™ (Nanonics, Israel) acoplado a um microscópio óptico BXFM (Olympus, Japão), como mostrado na Figura 2.1. Esta combinação permitiu o posicionamento lateral da ponta de AFM sobre a região nuclear da célula com precisão de escala sub-micrométrica. O sistema de AFM foi isolado

acusticamente e mecanicamente para reduzir qualquer interferência de ruídos ambiente durante as medições.

Figura 2.1: (a) Sistema de Microscopia de Varredura por Sonda (SPM) utilizado nas medições de AFM. (b) Detalhe da parte interna do SPM com destaque para as torres que controlam de modo independente cada ponteira, e a posição do porta-amostras posicionado sobre o *scanner* piezelétrico do AFM.



Fonte: Autora, 2019

A topografia celular foi imageada (256×256 pixels) no modo de contato intermitente com uma taxa de varredura de 0,3-1 Hz. Foram utilizadas mais de 30 células tratadas ou não com Sema3A. A rugosidade das membranas das células foi estimada com base nas imagens de AFM utilizando o *software* WSxM⁷⁶, obtendo os parâmetros de R_a e RMS da rugosidade de cada amostra.

Todos os experimentos de curva força-distância foram realizados na região nuclear das células. É importante observar que as medidas realizadas em torno do núcleo, onde as células são mais espessas, são menos propensas a artefatos devido à dureza do substrato^{77; 78}. Os experimentos AFM foram realizados usando uma ponta de varredura com um raio típico de curvatura < 20 nm em um *cantilever* de 320 μm de comprimento, com constante de mola < 1 N/m e uma frequência nominal de 35 kHz. A constante de mola do *cantilever* foi calibrada

ajustando-se o espectro de potência a um oscilador harmônico simples⁷⁹, e uma força de indentação máxima para o *cantilever* foi ajustada em 20 nN. Essas medidas foram realizadas movendo-se a amostra em direção à ponta do *cantilever* com uma velocidade constante de 5 $\mu\text{m/s}$. Mais de 80 curvas foram adquiridas para cada amostra, e todos os experimentos foram realizados com a mesma ponta. O modelo de Hertz modificado por Sneddon foi utilizado para caracterizar as curvas de força-distância para obter a indentação elástica das células, visto que as pontas utilizadas nos experimentos possuíam uma forma cônica. Ajustando esse modelo aos dados, foi possível calcular o módulo de Young médio das amostras.

2.2.3 Análise estatística

Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Para mostrar que todos os dados são normalmente distribuídos, o teste Kolmogorov-Smirnov foi realizado e a significância estatística das diferenças no módulo de elasticidade entre os dois grupos de células foi avaliada usando o teste *t* de Student com 95% de nível de confiança ($p < 0,05$). O teste Kolmogorov-Smirnov é um dos principais testes de normalidade que possibilitam testar se um conjunto de dados segue ou não uma distribuição normal, dentro de um nível de significância adotado.

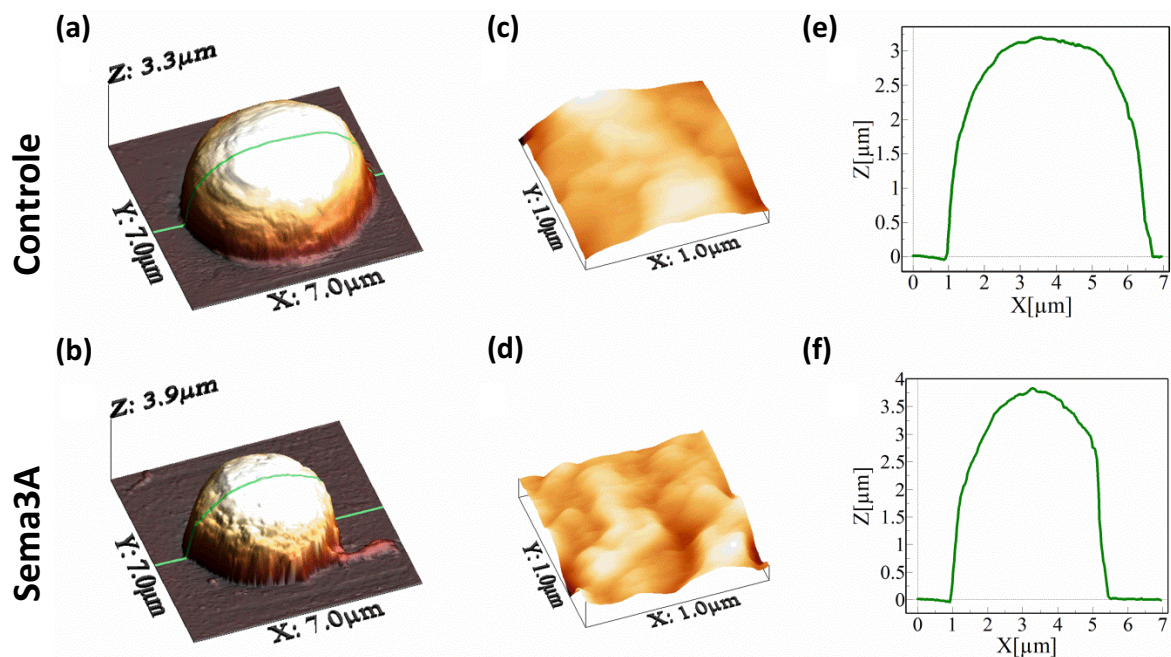
2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Imagens topográficas e rugosidade de timócitos

Inicialmente, o AFM foi utilizado para observar a morfologia dos timócitos e avaliar as possíveis alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com Sema3A nessas células. A morfologia de timócitos, incluindo características da membrana celular, é observada nas imagens de AFM mostradas na Figura 2.2. Com base nessas imagens, foi observado que os timócitos sem tratamento (controle), Figura 2.2(a), exibiram uma forma arredondada com uma superfície lisa, enquanto que os timócitos tratados com Sema3A exibiram uma forma alongada, uma superfície mais áspera e a presença de estruturas ramificadas em direção ao substrato, perpendiculares às bordas da célula, denominadas filopódios (Figura 2.2(b)). Os

filopódios são protuberâncias da membrana plasmática, frequentemente referidas como sendo “semelhantes a dedos”. Eles são formados por 10 ou mais filamentos paralelos de actina bem compactados, com suas extremidades voltadas para a membrana plasmática. Essas estruturas são importantes para muitos processos celulares essenciais, tais como adesão celular, migração, angiogênese e a formação do contato célula-célula⁸⁰. Com base nas imagens de AFM, foi observado que as células tratadas com Sema3A apresentaram maior número de filopódios em comparação com as células controle, indicando que a Sema3A não só promoveu alterações na morfologia dos timócitos, como também induziu a formação dos filopódios.

Figura 2.2: Imagens topográficas de AFM de timócitos (a) controle e (b) tratados com Sema3A; (c) e (d) Vista ampliada da região nuclear de ambas as superfícies celulares; (e) e (f) Perfis de altura tomados ao longo das linhas verdes em (a) e (b). Em cada um dos grupos foram analisadas mais de 30 células.



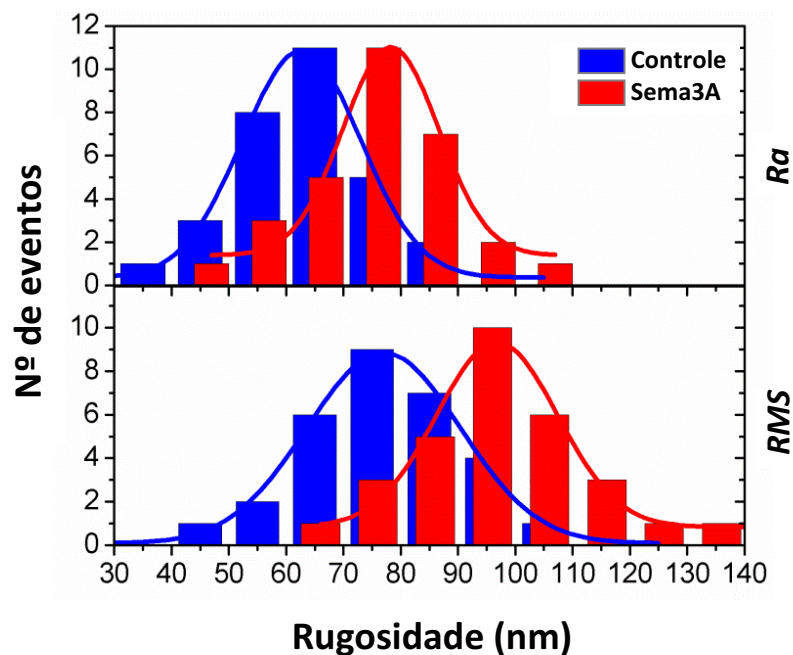
Fonte: Autora, 2018

As Figuras 2.2(c) e 2.2(d) mostram uma vista ampliada da região nuclear da superfície dos timócitos controle e dos timócitos tratados com Sema3A, respectivamente. Um perfil topográfico para medição da altura e comprimento das células é mostrado na Figura 2.2(e) para os timócitos controle e na Figura 2.2(f) para os timócitos tratados com Sema3A. Em

geral, os timócitos tratados com Sema3A exibiram perfis de altura mais altos em comparação aos perfis exibidos pelos timócitos sem tratamento.

A análise de rugosidade da membrana é uma outra forma de identificar os efeitos do tratamento com Sema3A nos timócitos. Essa análise é baseada no cálculo da distribuição de altura da membrana plasmática nas imagens de AFM de timócitos tratados ou não com Sema3A. A Figura 2.3 mostra o histograma da distribuição das medidas de rugosidade para os timócitos. Os valores de R_a e RMS da rugosidade média para os timócitos foram obtidos a partir de um ajuste de distribuição normal do histograma total composto por todos os valores determinados para todas as células.

Figura 2.3: Histogramas das distribuições dos valores de rugosidade R_a e RMS calculados para os timócitos controle e tratados com Sema3A. Os ajustes da curva de distribuição normal são mostrados (curvas sólidas).



Fonte: Autora, 2018

Para células sem tratamento (controle), o valor de R_a foi de $64,4 \pm 11,5$ nm e o valor de RMS foi de $78,5 \pm 11,4$ nm. Para células tratadas com Sema3A, os valores R_a e RMS aumentaram para $76,3 \pm 13,7$ nm e $93,0 \pm 14,1$ nm, respectivamente. Portanto, com base na análise de rugosidade, verificou-se que as células tratadas com Sema3A apresentaram valores R_a e RMS maiores (maior rugosidade) do que as células controle. O tratamento com Sema3A

aumentou a rugosidade das membranas dos timócitos em aproximadamente 18% os valores de R_a e RMS em comparação com os timócitos controle.

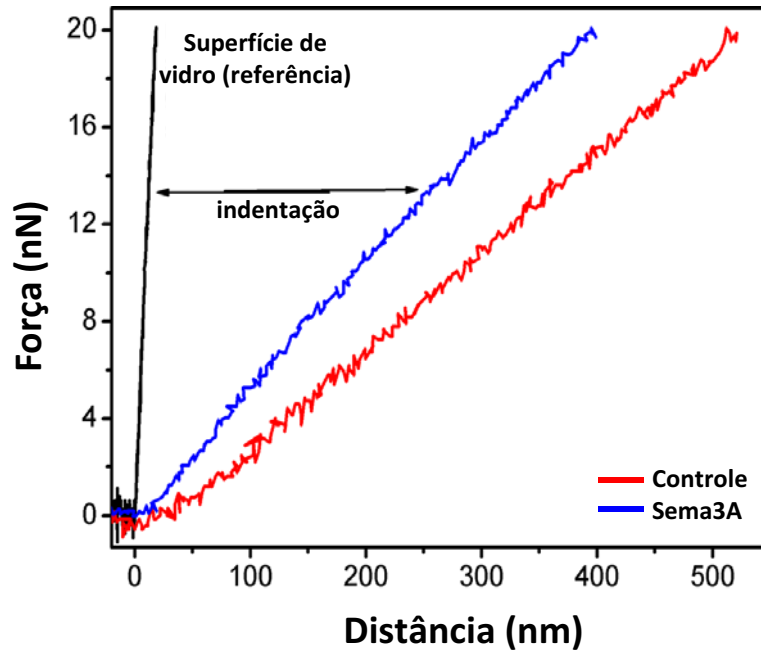
A rugosidade da superfície é um parâmetro quantitativo importante para caracterizar e/ou comparar superfícies, e pode ser usado para examinar a morfologia de membranas biológicas, uma vez que é um parâmetro morfológico em escala nanométrica⁸¹. Com relação a isso, numerosos estudos relacionam alterações na rugosidade da membrana com funções biológicas nas células, tais como a adesão e a apoptose^{82; 83; 84}. Intuitivamente, a topografia da membrana deve ser sensível às mudanças nos fatores físicos ou químicos no microambiente. Isso é importante, por exemplo, na modulação do comportamento celular no contexto do organismo como um todo, ou durante uma resposta imune.

2.3.2 Análise do módulo de Young

Medidas de nanoindentação AFM foram realizadas para investigar as influências do tratamento com Sema3A no módulo de Young das células. Através dessas medidas é possível revelar características biofísicas do citoesqueleto e da membrana em nanoescala. Antes da realização das indentações nas células, uma curva de força foi tomada no substrato de vidro e gravada como referência. As curvas de força obtidas, durante o experimento, no substrato de vidro e nas células são mostradas na Figura 2.4. É importante observar que a identificação do ponto de contato é uma característica crucial para a determinação do comprimento de indentação, e nesse caso, ele foi definido como o ponto em que a inclinação da curva de força é aproximadamente zero.

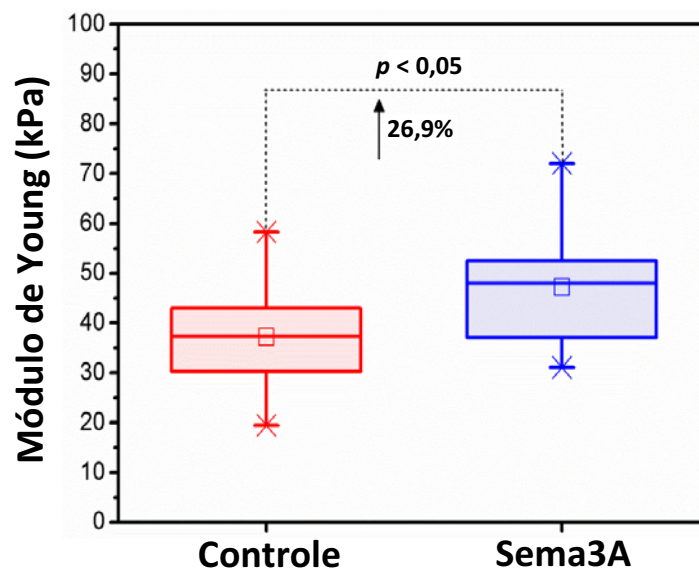
O modelo de Hertz modificado por Sneddon foi ajustado às curvas de força-distância obtidas durante o experimento. Como resultado, as células controle exibiram um módulo de Young de $37,2 \pm 9,5$ kPa. Em contraste, o módulo de Young médio das células tratadas com Sema3A foi de $47,2 \pm 11,3$ kPa, revelando um aumento de 26,9% no módulo de elasticidade médio em comparação com as células controle, como mostra a Figura 2.5. A Sema3A, portanto, aumentou a rigidez dos timócitos após 30 minutos de exposição.

Figura 2.4: Curvas de força-distância geradas com AFM. Essas curvas foram medidas para um substrato de referência (vidro) e para os timócitos controle e tratados com Sema3A. A relação entre a carga de força e o comprimento de indentação foi calculada como a diferença entre cada uma destas curvas e a linha de referência.



Fonte: Autora, 2018

Figura 2.5: Box plots dos módulos de Young de timócitos controle e tratados com Sema3A. O módulo de Young médio é dado pela linha horizontal dentro de cada caixa.



Fonte: Autora, 2018

A elasticidade é uma propriedade mecânica vital de células que tem sido amplamente estudada nos últimos anos, especialmente devido à sua correlação com a motilidade das células. O aumento da motilidade celular geralmente é resultado da menor elasticidade, o que favorece a deformação das células durante a migração ou invasão⁸⁵. Esses parâmetros não fornecem informações apenas sobre a membrana celular, mas também fornecem dados sobre outros componentes subcelulares e da membrana, tais como organelas, citoesqueleto e o núcleo. Entre estes, há um consenso de que o citoesqueleto é crucial na determinação da elasticidade e motilidade celular⁸⁶. Assim, a elasticidade aumentada observada nos timócitos tratados com Sema3A, pode surgir como resultado da reorganização do citoesqueleto, uma vez que as células dependem principalmente do citoesqueleto para manter sua morfologia e funções básicas⁸⁷.

2.4 Conclusões

Neste estudo, foi possível investigar os efeitos do tratamento com Sema3A nas propriedades biomecânicas de timócitos *in vitro* através da microscopia de força atômica. Ao examinar a morfologia e propriedades mecânicas como a rugosidade e a elasticidade celular, verificou-se que tais características celulares foram moduladas pelo tratamento com Sema3A. Os resultados obtidos indicaram um aumento na rugosidade e também na elasticidade dos timócitos desencadeada pela Sema3A. Estes resultados de AFM são pertinentes porque relacionam a elasticidade e a rugosidade das membranas celulares com alterações do citoesqueleto, uma vez que estudos anteriores mostraram que propriedades mecânicas estão associadas ao citoesqueleto^{88; 89; 90}. Sendo assim, o estudo de propriedades biomecânicas de células através do AFM pode proporcionar informações fundamentais sobre suas estruturas e funções biológicas.

3. Espectroscopia Raman

Neste capítulo serão apresentados os aspectos teóricos da técnica Raman, a natureza do espalhamento Raman, os modos vibracionais ativos e a aplicabilidade desta técnica no estudo de células, destacando a sua análise conjunta com métodos estatísticos multivariados na interpretação dos dados espectrais.

3.1 Introdução

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica vibracional que tem despontado na literatura como ferramenta de análise de componentes moleculares de diferentes materiais, fornecendo análise quantitativa e qualitativa dos tipos moleculares presentes na amostra⁹¹. Esta técnica apresenta como principal característica espectros com picos em posições correspondentes às vibrações das ligações das moléculas⁹².

O efeito Raman foi observado experimentalmente pela primeira vez em 1928, pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman¹⁵. Ele realizou experimentos utilizando a luz do sol para excitar o material estudado e uma rede de difração para selecionar a fonte de excitação monocromática, e observou que a frequência da radiação incidente era diferente da frequência da radiação espalhada, e que ela correspondia exatamente à frequência vibracional dos átomos do material¹⁵. Assim, o que é medido na espectroscopia Raman é essa diferença de frequência que corresponde à diferença de energia entre dois estados vibracionais.

O grande interesse pela espectroscopia Raman como técnica de caracterização de materiais ocorreu principalmente a partir da década de 1960 com o advento do *laser*, pois inicialmente os espectros Raman eram obtidos utilizando-se fontes não coerentes de luz, como a radiação solar⁹³. Foi a partir daí que a técnica Raman foi empregada como uma ferramenta analítica e começou a ser largamente utilizada na identificação e caracterização de materiais. O seu potencial é descrito no estudo da estrutura vibracional ou molecular de semicondutores e tecidos biológicos, em aplicações médicas, na detecção de diferenças espectrais de tecidos benignos e malignos, no estudo das propriedades estruturais de nanotubos de carbono, entre outros^{94; 95; 96; 97}.

3.2 Espalhamento Raman

Quando uma onda eletromagnética interage com um determinado meio material, as órbitas eletrônicas das moléculas que o constituem são perturbadas periodicamente com a mesma frequência do campo elétrico da radiação incidente. Esta perturbação da nuvem eletrônica leva à separação das cargas dentro das moléculas, resultando em um momento de dipolo induzido. O produto da interação entre o momento de dipolo induzido e a radiação eletromagnética tem como resultado o espalhamento da luz incidente. O processo de espalhamento da luz tem importância fundamental na fundamentação teórica da técnica de espectroscopia Raman.

Durante o processo de espalhamento, a maioria da luz espalhada tem a mesma frequência da luz incidente; nesse caso, temos o processo conhecido como espalhamento elástico da luz ou espalhamento *Rayleigh*. No entanto, uma parcela muito pequena da luz (1 em 10^7 fótons) é espalhada com frequências diferentes, processo este conhecido como espalhamento inelástico da luz. O espalhamento Raman é um exemplo de espalhamento inelástico, e pode ser descrito classicamente através da dependência do momento de dipolo elétrico \vec{P} induzido na molécula pelo campo elétrico \vec{E} da radiação incidente devido a um modo de vibração Q . Assim, o momento de dipolo induzido pode ser representado por:

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (3.1)$$

onde α é a polarizabilidade eletrônica da molécula. Podemos considerar a polarizabilidade como uma medida da facilidade de deformação da nuvem eletrônica da molécula na presença de um campo elétrico⁹⁸. Em geral, α depende da coordenada generalizada Q de um determinado modo normal de vibração, e pode ser descrita por um desenvolvimento em série de Taylor em termos dessa coordenada:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q + \dots \quad (3.2)$$

onde a derivada com relação a Q é tomada na posição de equilíbrio dos átomos. Como as oscilações provocadas pelo campo eletromagnético nos átomos são pequenas, os termos de ordem mais alta na equação (3.2) podem ser desprezados. Sendo ω a frequência do modo

vibracional harmônico dos átomos e ω_0 a frequência da luz incidente, \vec{E} e Q podem ser descritos da seguinte forma:

$$Q = Q_0 \cos \omega t \quad \vec{E} = \vec{E}_0 \cos \omega_0 t \quad (3.3)$$

onde Q_0 é o deslocamento máximo dos átomos ao redor de suas posições de equilíbrio, e \vec{E}_0 é a amplitude do campo elétrico. Sendo assim, na presença da radiação eletromagnética, a polarizabilidade terá o seu valor modulado pela frequência da radiação, bem como pelas frequências das vibrações moleculares. Então, substituindo as equações (3.2) e (3.3) na equação (3.1), obtém-se:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos \omega_0 t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q_0 \vec{E}_0 \cos \omega_0 t \cos \omega t \quad (3.4)$$

Usando a relação $2 \cos a \cos b = \cos(a + b) + \cos(a - b)$, a equação (3.4) pode ser reescrita como:

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos \omega_0 t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 Q_0 \vec{E}_0 [\cos(\omega_0 - \omega)t + \cos(\omega_0 + \omega)t] \quad (3.5)$$

Assim, a partir da interação da radiação incidente com o momento de dipolo induzido, aparecem três frequências diferentes como resultado do espalhamento da radiação: o primeiro termo da equação (3.5) contém apenas a frequência da radiação incidente ω_0 , e está relacionado ao espalhamento *Rayleigh*; o segundo termo da equação representa a radiação espalhada com frequência $(\omega_0 - \omega)$, e está relacionado ao espalhamento Raman *Stokes*; já o terceiro termo da equação, que representa a radiação espalhada com frequência $(\omega_0 + \omega)$, está relacionado ao espalhamento Raman *anti-Stokes*. Através da equação (3.5), nota-se que a condição necessária para que aconteça o espalhamento Raman é que:

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 \neq 0 \quad (3.6)$$

ou seja, deve haver uma variação da polarizabilidade como resultado dos deslocamentos vibracionais dos átomos correspondentes a um modo vibracional particular ao redor de suas posições de equilíbrio.

3.3 Modos vibracionais ativos no espectro Raman

Para que um modo de vibração molecular seja Raman ativo, é necessário que durante a interação da radiação incidente com a molécula ocorra uma mudança no momento de dipolo induzido pelo campo elétrico incidente, resultando em uma variação da polarizabilidade da molécula. Assim, levando em conta as vibrações moleculares, os movimentos nucleares irão induzir flutuações na polarizabilidade com frequências que correspondem aos vários modos normais de vibração. Comparando-se os espectros de moléculas diferentes, porém com a mesma simetria, observa-se que os modos mais intensos serão aqueles pertencentes a moléculas que possuem valores elevados da polarizabilidade eletrônica molecular.

De uma forma geral, dois tipos de vibrações estão associados às ligações moleculares:

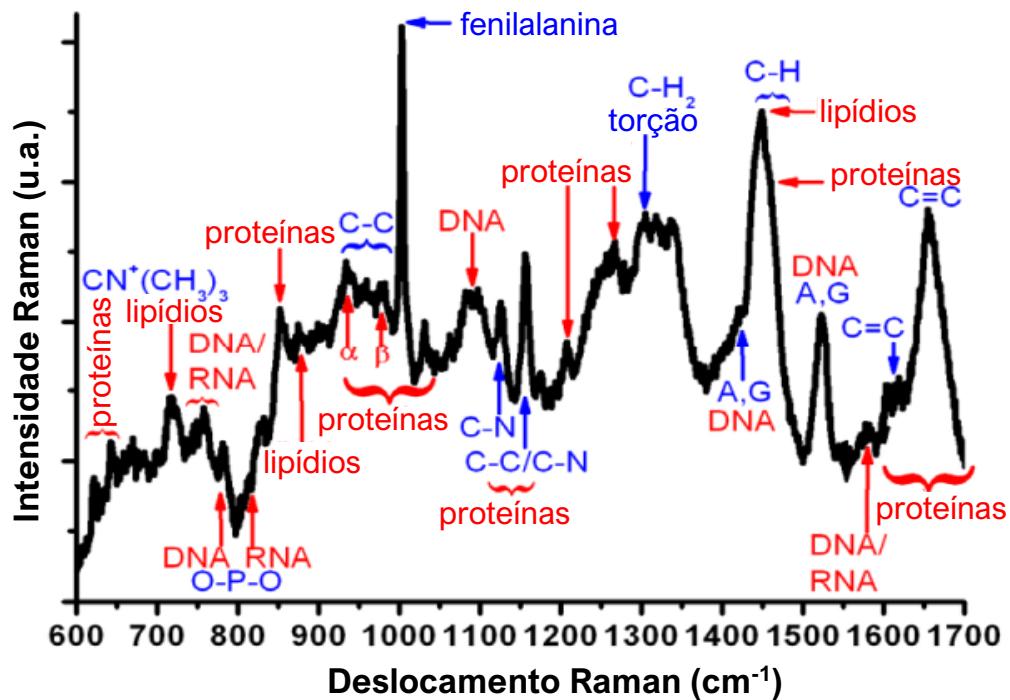
- estiramento “*stretching*” ou deformação axial, uma periódica extensão e contração da ligação que pode ser simétrica ou assimétrica⁹⁹;
- flexão “*bending*” ou deformação angular que pode ser simétrica no plano (tesoura, “*scissoring*” ou dobramento angular), simétrica fora do plano (sacudida, “*wagging*”), assimétrica no plano (balanço, “*rocking*”) e assimétrica fora do plano (torção, “*twisting*”)⁹⁹.

Os espectros Raman fornecem informações em nível molecular da composição bioquímica da amostra em análise, e por isso, são considerados como a “impressão digital” das moléculas^{94; 100}. Essas informações são provenientes das alterações vibracionais que ocorrem durante o processo de espalhamento Raman e são localizadas nas ligações químicas das amostras. Como cada amostra possui seu próprio conjunto vibracional molecular, o espectro Raman consiste de uma série de bandas, que correspondem exatamente aos modos vibracionais característicos das moléculas presentes na amostra¹⁰¹.

As posições das bandas no espectro, comumente chamadas de deslocamento Raman, representam a mudança de frequência da luz espalhada em relação à frequência da luz incidente, e são geralmente medidas em números de onda (cm^{-1}), enquanto que as intensidades das bandas são medidas em unidades de contagem arbitrária. A Figura 3.1 ilustra

o espectro vibracional Raman de uma célula de câncer de mama (linhagem MCF-7). As marcações identificam os principais biocomponentes e grupos funcionais encontrados no espectro de uma célula.

Figura 3.1: Espectro Raman não processado de células vivas de câncer de mama (linhagem MCF-7). A maioria das bandas Raman informativas ocorre no intervalo de 600-1800 cm^{-1} .



Fonte: Adaptada da ref.[102]

As bandas encontradas nos espectros Raman são proporcionais às concentrações das moléculas na amostra, e a avaliação dessas bandas fornece uma análise quantitativa e qualitativa da composição molecular da amostra. A intensidade do espalhamento Raman é proporcional ao número de moléculas que produzem esse espalhamento. Como resultado, essa intensidade pode ser utilizada para medir quanto de um material está presente na amostra (análise quantitativa). Além disso, a forma do espectro Raman pode ser utilizada para determinar que tipos de vibrações moleculares existem na amostra (análise qualitativa). Assim, através do espectro é possível obter os tipos moleculares mais significativos na amostra analisada.

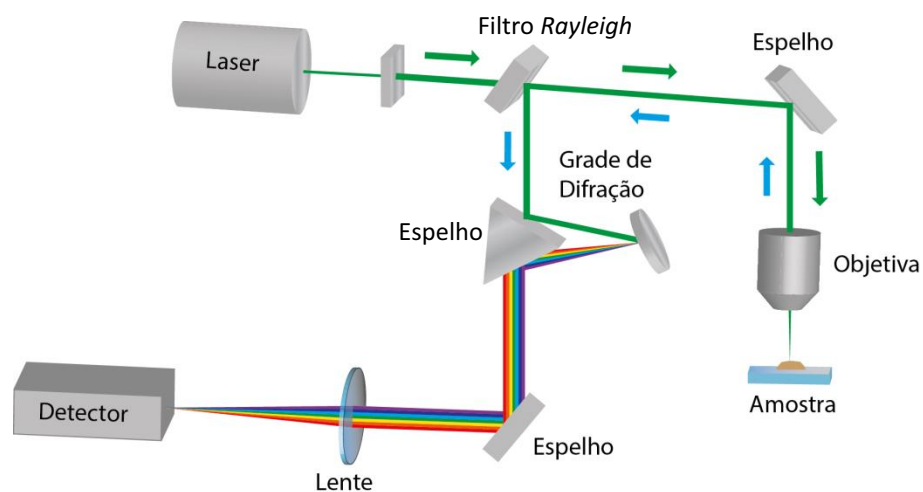
A quantidade e a qualidade das informações que podem ser extraídas de um espectro dependem de alguns fatores, tais como, as características da fonte de radiação utilizada para

excitar as amostras, a forma de coleta do sinal proveniente da amostra após a interação, a resolução temporal ou espectral do espectrômetro utilizado, além das propriedades físicas e coeficientes de espalhamento da amostra em análise¹⁰³.

3.4 Instrumentação Raman

Os espectros Raman são obtidos irradiando-se uma amostra com uma fonte *laser* potente de radiação no visível ou no infravermelho próximo. Essa fonte é usada para excitar a amostra e o sinal proveniente dessa excitação (sinal retroespalhado) é coletado por uma lente objetiva e direcionado a um espectrômetro por meio de um sistema óptico convencional de lentes e espelhos, como ilustra a Figura 3.2. A luz espalhada coletada é filtrada para remover o sinal *Rayleigh* e transmitir apenas o sinal Raman. Os filtros retêm apenas o comprimento de onda do *laser*, permitindo as medidas de Raman *Stokes* e Raman *anti-Stokes*. Um sistema interno de grades de difração dispersa o sinal Raman, que é direcionado e captado por um detector que converte a intensidade da luz em sinais elétricos. Um sistema de interface, com um computador usado para aquisição e armazenamento dos dados, registra esses sinais elétricos sob a forma de espectros.

Figura 3.2: Esquema ilustrativo de um sistema típico de espectroscopia Raman, identificando seus principais componentes ópticos.



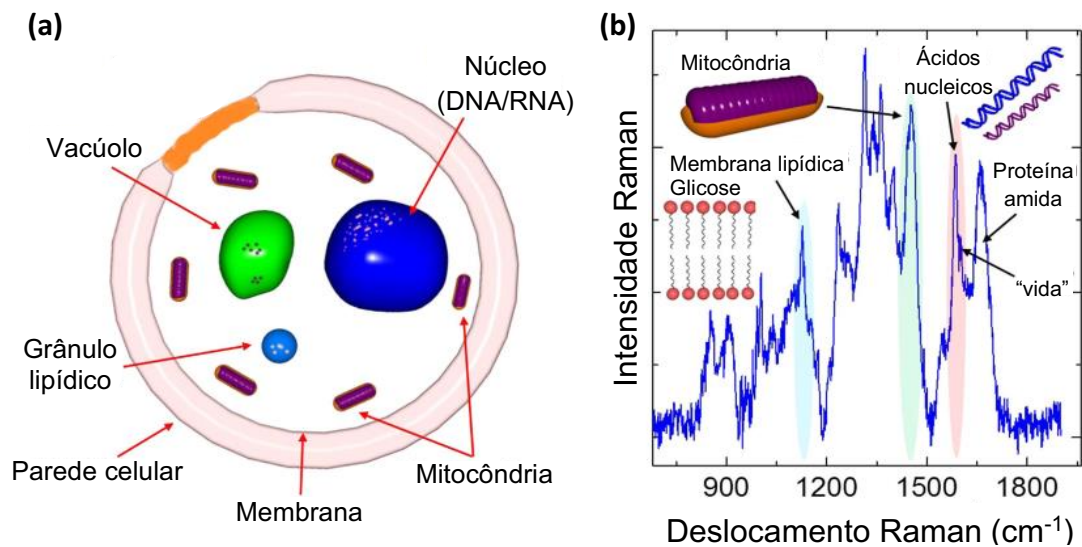
3.5 Espectroscopia Raman no estudo de células

A espectroscopia Raman é uma técnica que permite a aquisição de informações bioquímicas e estruturais de forma rápida, não invasiva, livre de marcações e com alta resolução espacial, se destacando como uma ferramenta importante no estudo de amostras biológicas. Através dela, é possível detectar marcadores bioquímicos nativos de sistemas biológicos complexos, como biofluidos, células e tecidos^{104; 105}. Por meio das análises Raman é possível quantificar alterações bioquímicas no nível celular através da detecção de variações relacionadas aos componentes biomoleculares das células. Essas alterações, que podem ser a causa ou o efeito de doenças, podem levar a mudanças significativas nos espectros Raman, caracterizadas pelo aumento ou diminuição de picos específicos. Além disso, as células são indivíduos independentes que em idênticas condições de cultura não produzem e acumulam biomoléculas da mesma forma. Sendo assim, essas variações também serão observadas nos espectros Raman, e são naturais de qualquer sistema biológico.

O espectro Raman de uma célula é formado por um grande número de moléculas biológicas. A contribuição relativa de cada molécula depende da sua abundância relativa e da sensibilidade do sistema de detecção. Isso explica a natureza quantitativa da informação que a espectroscopia Raman pode fornecer para caracterizar diferentes tipos de tecidos, ou diferenciar células malignas de células benignas^{101; 106}. A região de “impressão digital” de amostras biológicas (entre 500 e 2000 cm^{-1}) é a região do espectro Raman que se correlaciona com as vibrações moleculares dos principais componentes celulares: ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e lipídios, conforme ilustra a Figura 3.3.

Muitas vezes, a identificação e quantificação de componentes em amostras biológicas é dificultada devido à natureza complexa das amostras, pois os espectros celulares consistem em um grande número de biomoléculas e, na maioria das vezes, isso torna a análise muito complexa. Além disso, as diferenças de uma amostra para outra em diferentes condições patológicas são muito pequenas e difíceis de observar nos espectros brutos. Por isso, é fundamental que os dados sejam pré-processados e analisados através de métodos estatísticos para se obter as informações espectrais mais significativas. Essas ferramentas auxiliam na análise dos dados, especialmente nos casos em que grandes quantidades de dados são geradas, como na espectroscopia Raman.

Figura 3.3: (a) Esquema de uma célula de levedura e (b) diferentes componentes da célula identificados por espectroscopia Raman sob excitação *laser* de 514,5 nm.

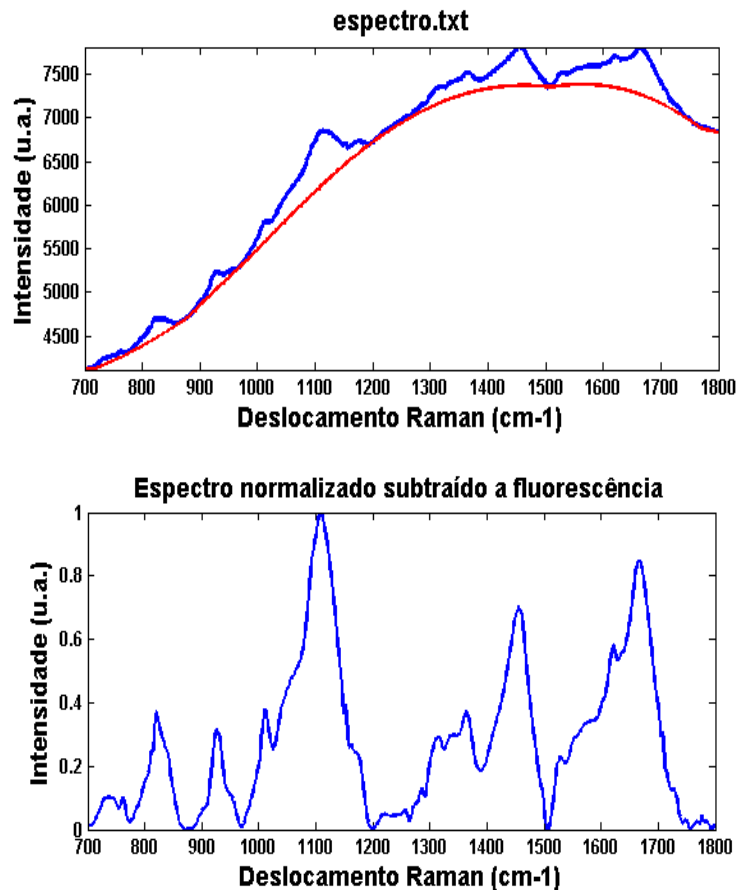


Fonte: Adaptada da ref.[¹⁰⁷]

3.5.1 Pré-processamento de espectros celulares

Um fator muito importante nas aplicações da espectroscopia Raman em amostras biológicas é a correta escolha do comprimento de onda de excitação. A maioria das biomoléculas possui transições dos níveis eletrônicos em comprimentos de onda na região do ultravioleta e visível. O uso de *lasers* nesses comprimentos de onda produz um forte sinal de fluorescência dessas biomoléculas que acaba predominando sobre o sinal Raman, dificultando a análise espectral¹⁰⁸. Como essas moléculas não apresentam transições eletrônicas para excitação no infravermelho próximo, a fluorescência é praticamente inexistente nessa região, sendo a opção por *lasers* com comprimento de onda entre 700 e 900 nm preferível. No entanto, o problema da fluorescência usando-se *lasers* visíveis para a excitação Raman pode ser resolvido através do uso de algoritmos que realizam a subtração do *background* de fluorescência contido nos espectros Raman de amostras biológicas. Ao fazer isso, os espectros de fundo são suprimidos e as informações úteis sobre a composição bioquímica da amostra são aprimoradas, como mostra a Figura 3.4.

Figura 3.4: Exemplo de ajuste polinomial de um espectro celular (linhagem A549). A correção da linha de base, a normalização e a subtração do *background* de fluorescência foram realizadas nesse ajuste.



Fonte: Autora, 2018

3.5.2 Análise estatística multivariada

A interpretação dos resultados de um conjunto de dados espectrais envolve a análise de uma infinidade de variáveis. As análises estatísticas multivariadas destacam-se como ferramentas importantes para o tratamento de dados multidimensionais^{109; 110}, como os que formam os espectros Raman. Através dessas análises, é possível identificar similaridades ou diferenças entre grupos de amostras, evidenciando características importantes dos dados para futura classificação.

As análises existentes podem ser de diversas naturezas, cada uma com sua fundamentação teórica e sua aplicabilidade. Desse modo, a escolha do método é justificada

basicamente pelo que se pretende investigar através do conjunto de dados; no entanto, uma análise conjunta de duas ou mais técnicas pode revelar melhores respostas para a análise¹¹¹. Os métodos atualmente mais conhecidos e difundidos são a análise de componentes principais e a análise de agrupamento hierárquico.

Análise de componentes principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais ou PCA (do inglês *Principal Components Analysis*) é um método estatístico geralmente utilizado para reduzir o número de variáveis necessárias para representar a variância em um conjunto de dados espectrais¹⁰⁹. Essa redução é obtida através da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (PCs), que são combinações lineares das variáveis originais. As componentes principais devem representar a maior parte da informação presente nas variáveis originais, de forma a explicar o máximo possível da variância total dos dados com o menor número possível de componentes. Elas são obtidas em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a primeira componente principal (PC1) é traçada no sentido da maior variação do conjunto de dados; a segunda componente principal (PC2) é traçada ortogonalmente à primeira, com o intuito de descrever a maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante¹¹².

Do ponto de vista matemático, a análise PCA pode ser descrita como a decomposição da matriz de dados originais, representada por X , contendo n linhas (amostras) e m colunas (variáveis), em duas matrizes: uma matriz de escores (*scores*), representada por T , e uma matriz ortogonal de pesos (*loadings*) representada por P^T , onde $X = T \cdot P^T$. Os escores representam as projeções das amostras na direção dos componentes principais, enquanto que os pesos são os cossenos dos ângulos formados entre as variáveis originais e os PCs, e representam o quanto cada variável original contribui para um determinado PC. Uma matriz contendo o que não foi modelado pelo PCA, denominada matriz de resíduos, é representada por E , conforme ilustra a Figura 3.5.

A interpretação dos dados gerados no PCA é facilitada por meio da análise gráfica. Geralmente, a grande fração da variância total dos dados é descrita nos primeiros componentes principais, sendo possível visualizar os dados pelo gráfico dos escores de um componente contra o outro, onde os valores dos escores representam o poder de explicação da

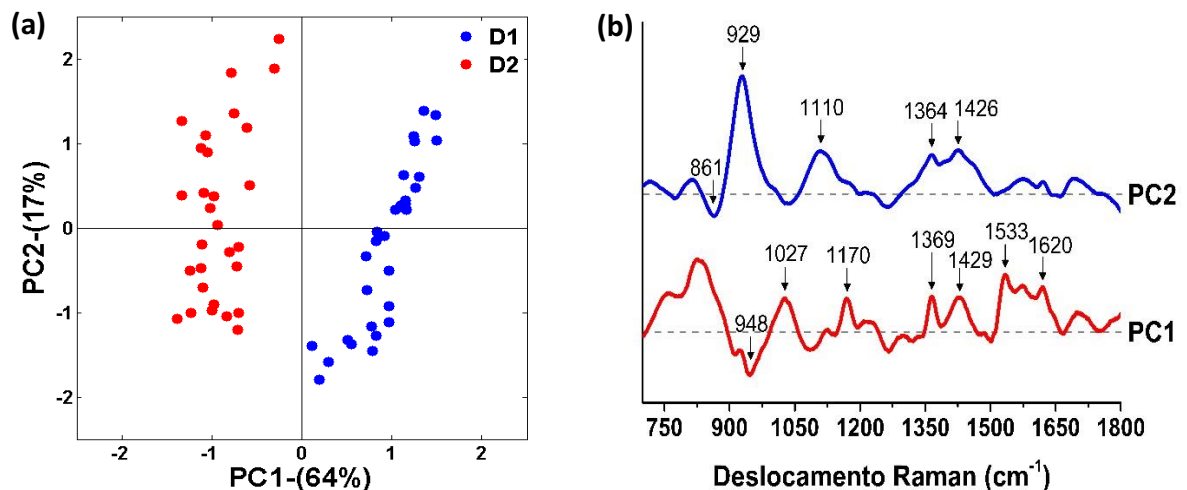
variância de cada componente principal. Já a análise dos pesos de um PC pode fornecer informações sobre a origem da variabilidade dentro do conjunto de dados, proveniente de variações nos componentes moleculares que contribuem para os espectros. Esses gráficos são mostrados na Figura 3.6.

Figura 3.5: Decomposição da matriz de dados originais X em T (matriz de escores), P^T (matriz de pesos) e E (matriz de resíduos).

$$\begin{array}{c} m \\ \boxed{X} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} A \\ \boxed{T} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{P^T} \\ A \end{array} + \begin{array}{c} m \\ \boxed{E} \\ n \end{array}$$

Fonte: Autora, 2019

Figura 3.6: (a) Representação dos gráficos de (a) escores de $PC1 \times PC2$ e (b) pesos para o $PC1$ e o $PC2$.



Fonte: Autora, 2018

No gráfico de escores (Figura 3.6(a)), o eixo das abscissas representa a primeira componente principal (PC1) enquanto que o eixo das ordenadas representa a segunda componente principal (PC2). Para a interpretação do gráfico, observa-se a distribuição das amostras em relação à proximidade entre elas e a distribuição ao longo dos eixos PC1 e PC2,

ou seja, o quadrante em que as amostras se encontram não é considerado na análise, e sim a distribuição das amostras no gráfico como um todo. Desse modo, as amostras mais próximas entre si são consideradas como amostras mais semelhantes, devido aos seus perfis mais inter-relacionados. A avaliação do gráfico de pesos, (Figura 3.6(b)), permite entender quais variáveis mais contribuem para o agrupamento observado no gráfico dos escores. Seus picos positivos e negativos correspondem, respectivamente, a contribuições aumentadas ou diminuídas de componentes moleculares específicos dos espectros Raman.

Análise de agrupamento hierárquico (HCA)

A Análise de Agrupamento Hierárquico ou HCA (do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) é uma técnica de análise multivariada que agrupa os dados de um conjunto de acordo com as suas semelhanças. Nesse método, as variáveis são agrupadas em *clusters*, de modo que as variáveis pertencentes a um mesmo *cluster* são similares entre si com relação a um conjunto de características escolhidas, e as variáveis agrupadas em *clusters* diferentes devem ser heterogêneas (ou dissimilares) em relação a essas mesmas características¹¹³.

Os critérios de classificação dos algoritmos usados no HCA baseiam-se em medidas de proximidade entre as amostras a serem agrupadas, normalmente expressas como uma função da distância entre os dados. Dentre essas medidas, a distância euclidiana é a mais comumente utilizada para medir a similaridade ou dissimilaridade entre duas amostras¹¹². O índice de similaridade, S_{ij} , entre duas amostras i e j , é dado pela seguinte equação:

$$S_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{max}} \quad (3.7)$$

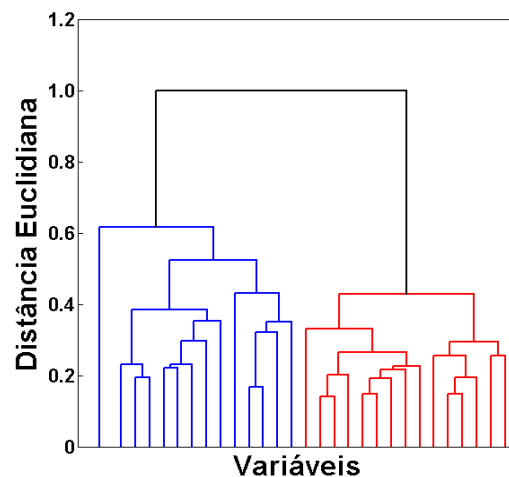
onde d_{ij} é a distância euclidiana entre as amostras e d_{max} é a maior distância encontrada entre todas as amostras do conjunto. A distância euclidiana é definida pela raiz quadrada do somatório dos quadrados das diferenças entre os valores das coordenadas das amostras i e j para todas as variáveis k , onde $k = 1, 2, \dots, p$,

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2} \quad (3.8)$$

onde x_{ik} representa o valor da medida da amostra i para a variável k , x_{jk} representa o valor da medida da amostra j para a variável k , e p representa todos os pontos de dados registrados dentro da região espectral usada para o agrupamento.

O gráfico gerado por essa análise de agrupamento denomina-se dendrograma, e pode ser visualizado na Figura 3.7. O dendrograma é um tipo específico de diagrama que relaciona o nível de similaridade (eixo das ordenadas) e as amostras na ordem de agrupamento (eixo das abscissas). Os agrupamentos levam a estruturas que se assemelham a ramos de uma árvore, onde as amostras são agrupadas aos pares. Portanto, os dendrogramas representam a similaridade entre pares de amostras ou grupos de amostras, numa escala que vai de um (identidade) a zero (nenhuma similaridade). Um índice alto indica uma distância pequena entre dois agrupamentos e, portanto, uma alta similaridade.

Figura 3.7: Dendrograma resultante da análise de agrupamento utilizando a medida de distância euclidiana.



Fonte: Autora, 2018

4. Resposta anti-inflamatória induzida por fármacos em células A549 detectada por espectroscopia Raman

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais das medidas utilizando a técnica Raman para avaliação da resposta anti-inflamatória induzida por fármacos em células epiteliais (linhagem A549), através de uma análise comparativa das ações da dexametasona e do ácido *p*-cumárico. Esses resultados enfatizam o potencial da técnica em estudos para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares.

4.1 Introdução

A dexametasona, um glicocorticoide, é o fármaco padrão para estudos que investigam processos inflamatórios de diversas naturezas^{114; 115}. Os glicocorticoides são frequentemente a terapia de primeira escolha usada como tratamento efetivo no controle de doença inflamatória crônica, incluindo asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (ou COPD, do inglês *chronic obstructive pulmonary disease*). Embora a corticoterapia seja muito eficaz na supressão da inflamação das vias aéreas, seu uso em longo prazo está associado ao risco real de efeitos adversos, como diabetes, obesidade, osteoporose, entre outros¹¹⁶. Além disso, a exposição ativa ou passiva à fumaça do cigarro é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da COPD¹¹⁷. Assim, tendo em vista as consequências negativas do tratamento em longo prazo com os glicocorticoides, se faz necessário identificar terapias alternativas que permitam reduzir a dose ou mesmo substituir o seu uso nesta condição patológica. Nesse contexto, os compostos fenólicos tem se destacado por exibirem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e por possuírem efeitos promissores contra o câncer^{118; 119}, sendo uma possível alternativa terapêutica em substituição aos glicocorticoides. O ácido *p*-cumárico, que é um ácido fenólico natural, tem demonstrado várias dessas propriedades^{120; 121}, e tem sido considerado um forte candidato terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares¹²².

Nesse cenário, a técnica Raman foi utilizada para avaliação da resposta anti-inflamatória induzida por fármacos em células epiteliais de pulmão humano (linhagem A549), ativadas por extrato de fumaça de cigarro. Para isso, foi realizada uma análise comparativa entre a ação *in vitro* da dexametasona e do ácido *p*-cumárico. Os resultados obtidos evidenciam o potencial da técnica para estudos do tratamento de doenças inflamatórias pulmonares.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Cultura celular

A linhagem celular A549 de adenocarcinoma de pulmão humano foi cultivada em meio RPMI-1640 contendo 10% de FBS, com 1% de L-glutamina, 1% de penicilina e 0,01% de estreptomicina, e mantida em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. As culturas foram monitoradas diariamente para avaliar a quantidade de confluência e a ausência de contaminantes. Ao atingirem a confluência (pelo menos 90%), as células (2×10^5) foram descoladas utilizando uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% e semeadas em placa de 24 poços. Após a incubação durante a noite, o meio RPMI-1640 foi substituído por meio isento de soro e as células foram expostas aos diferentes tratamentos e/ou estímulo.

4.2.2 Condições de cultura para estímulo e tratamentos

Para induzir uma situação experimental de ativação de células epiteliais das vias aéreas, simulando os efeitos da fumaça, foi preparado um extrato de fumaça de cigarro (EFC) utilizando o protocolo descrito por Victoni e colaboradores¹²³, com ligeira modificação. Resumidamente, dois cigarros comerciais com os filtros removidos (Marlboro, Philip Morris, Inc., Richmond, VA, EUA) foram borbulhados através de 20 mL de meio RPMI-1640 e a solução resultante foi então filtrada através de um filtro de poro de 0,22 µm. Em seguida, foi adicionado LPS (0,1 mg/mL) resultando em uma solução 100% EFC.

As células A549 aderidas a placas de 24 poços (2×10^5 células/poço) foram mantidas em meio RPMI-1640 isento de soro e tratadas com dexametasona (0,25; 2,5 e 25 µM), ou

ácido *p*-cumárico (10; 20 e 100 μ M) durante 1 hora, e depois estimuladas com extrato de fumaça de cigarro (2,5; 5; 25 e 50%) durante 24 horas. As células cultivadas em meio RPMI-1640 foram utilizadas como controle. Os critérios de seleção das doses foram baseados nos resultados de um experimento piloto. Todos os experimentos foram realizados quando a confluência da cultura celular atingiu 90% em um sistema de cultura de células assíncronas¹²⁴.

4.2.3 Quantificação de IL-8 e análise estatística

Como descrito na seção anterior, as células A549 foram plaqueadas e depois expostas a diferentes concentrações de dexametasona, ácido *p*-cumárico ou solução de EFC por 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados e centrifugados a 14.000g durante 10 minutos para remover os restos celulares. Para avaliar o grau da inflamação nas células, os níveis de interleucina (IL)-8 foram medidos usando kits ELISA (BD eBiosciences) de acordo com o protocolo do fabricante. A interleucina (IL)-8 é uma citocina que está associada ao aumento do processo inflamatório (biomarcador inflamatório).

Os dados estatísticos dos efeitos da dexametasona e do ácido *p*-cumárico na secreção de IL-8 foram expressos como a média \pm erro padrão e analisados quanto a diferenças significativas usando análise de variância seguida pelo teste de comparação *post-hoc* do tipo *Tukey*. As determinações de EC₅₀ foram realizadas usando o *software* Prisma (versão 7.0) da Graphpad Software Inc. (San Diego, CA, EUA). Esta análise fornece uma comparação quantitativa inicial dos efeitos dos fármacos.

4.2.4 Aquisição dos espectros Raman

Os espectros Raman foram obtidos usando um espectrômetro XploRA (Horiba) acoplado a um microscópio Olympus, e equipado com um *laser* de 532 nm que foi focalizado na região nuclear das células através de uma objetiva de imersão em óleo de 60 \times (NA = 1,40). A mesma lente objetiva foi usada para coletar a luz espalhada Raman após a interação com a amostra, em uma geometria de retroespalhamento. A calibração da frequência foi definida tendo como referência a banda vibracional de 520 cm^{-1} de uma amostra padrão de silício. Nas mesmas condições, foram medidos os espectros de 30 células para cada grupo na faixa

espectral de 700-1800 cm^{-1} . A fim de minimizar o aquecimento das amostras induzido pelo *laser*, foi utilizada uma irradiação de baixa potência na superfície das células, em torno de 5 mW, e as aquisições foram feitas utilizando 60 acumulações em 1 segundo, totalizando 60 segundos de exposição por amostra. A grade de difração utilizada no espectrômetro possuía 1200 linhas/mm, o que resultou em uma resolução espectral de 1,5 cm^{-1} . Para as medições, as lamínulas com as células foram lavadas com PBS e colocadas em uma placa de Petri de vidro contendo essa solução. Todos os experimentos foram realizados com células vivas.

4.2.5 Pré-processamento de dados e análise espectral

Após a obtenção dos espectros, foi realizada a subtração da fluorescência dos espectros utilizando o método “*adaptive minmax*”¹²⁵. Este método escolhe automaticamente uma ordem polinomial para corrigir os espectros de fundo (*background*), evitando assim a intervenção do usuário e permitindo um melhor ajuste da linha de base. Cada espectro foi normalizado com sua intensidade máxima e a região espectral escolhida para análise corresponde aos modos de impressão digital vibracional de amostras biológicas (700-1800 cm^{-1}). Em seguida, os espectros Raman processados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) e à análise de agrupamento hierárquico (HCA). Os gráficos de escores do PCA foram construídos com a primeira e a segunda componentes principais, visto que essas componentes são as que mais explicam a porcentagem da variância total dos dados. Para identificar as características Raman significativas usadas na diferenciação dos grupos celulares, foram construídos os gráficos de pesos para o PC1. Posteriormente, o HCA foi aplicado aos resultados do PCA para separar os dados em grupos estatisticamente semelhantes, por meio de um algoritmo de discriminação baseado na distância Euclidiana. Esses métodos foram realizados utilizando algoritmos desenvolvidos no Matlab® (Mathworks Inc., EUA).

4.3 Resultados e Discussões

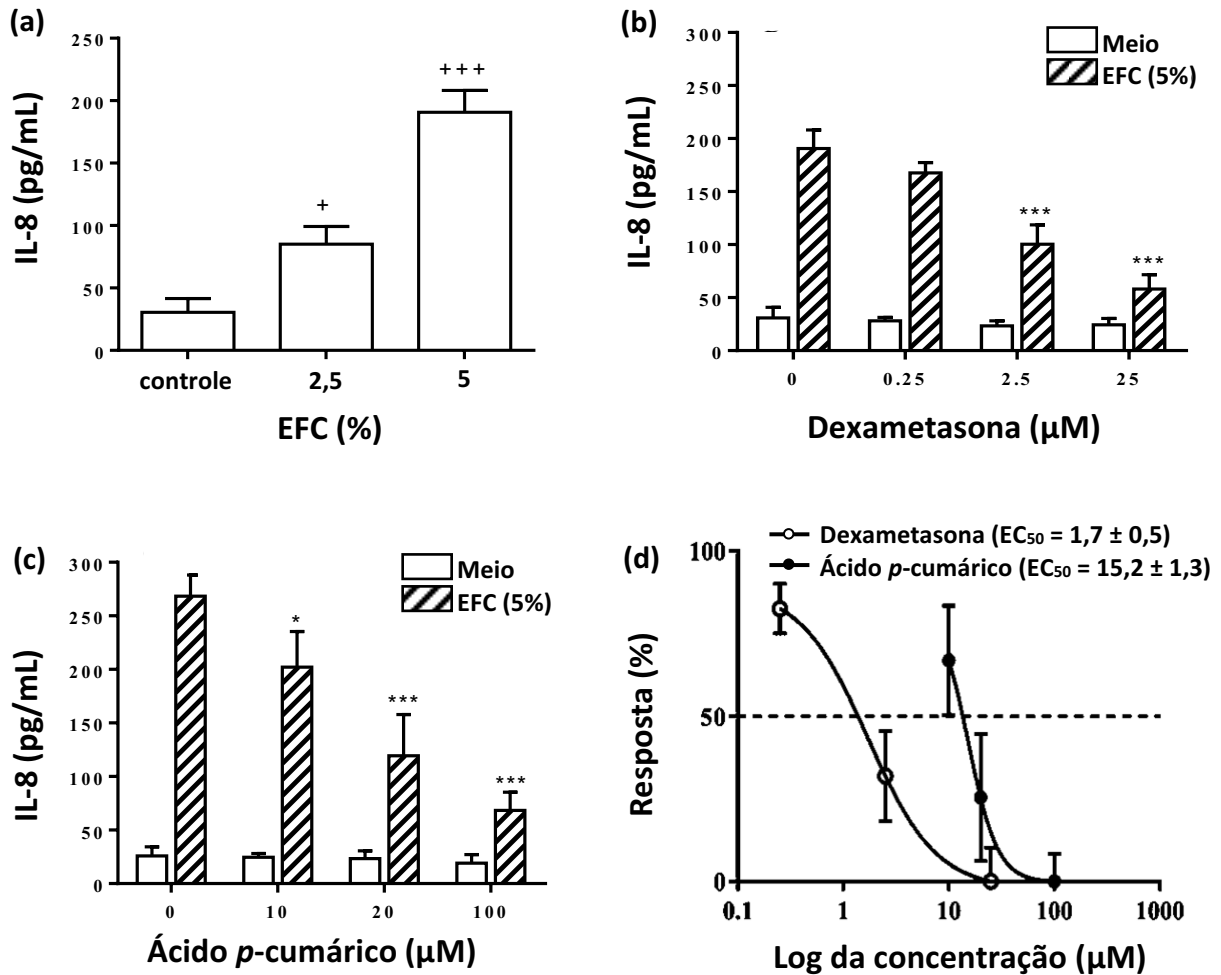
4.3.1 Dexametasona e ácido *p*-cumárico inibem a ativação de células A549 induzida por EFC

A Figura 4.1(a) mostra que baixos níveis da proteína IL-8 ($< 30 \text{ pg mL}^{-1}$) foram detectados no meio condicionado de células cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (controle). As células estimuladas com EFC a 2,5% e 5% por 24 horas mostraram no sobrenadante, níveis mais elevados de IL-8 representando 2,8 e 6,2 vezes os valores do controle, respectivamente. Com este resultado, o efeito do pré-tratamento com dexametasona ou ácido *p*-cumárico foi avaliado nas células A549 estimuladas com EFC a 5%. Essa concentração de EFC não afeta a viabilidade celular e, portanto, os efeitos dose-dependente dos fármacos na secreção de IL-8 pelas células A549 após 24 horas podem ser determinados em relação ao grupo controle.

As Figuras 4.1(b) e 4.1(c) mostram que a estimulação com EFC resultou em um aumento substancial na produção de IL-8 em comparação com as células não estimuladas (meio). Em células tratadas com dexametasona a 2,5 e 25 μM , a produção de IL-8 foi reduzida em 48% e 69%, respectivamente (Figura 4.1(b)). Em células tratadas com ácido *p*-cumárico a 10, 20 e 100 μM , a produção de IL-8 foi significativamente reduzida em 24%, 55% e 74%, respectivamente (Figura 4.1(c)). Com base nesses resultados, foram utilizadas as concentrações de 2,5 μM de dexametasona e de 20 μM de ácido *p*-cumárico nos estudos espectroscópicos em células A549 estimuladas com EFC.

Com o objetivo de fornecer uma comparação quantitativa inicial dos efeitos dos fármacos, foram calculados os valores de EC_{50} . O EC_{50} indica a concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo, e normalmente é usado como uma medida da potência de um fármaco. Como demonstrado na Figura 4.1(d), a dexametasona (EC_{50} de $1,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$) inibe a secreção de IL-8 induzida por EFC com um EC_{50} aproximadamente 10 vezes menor do que o ácido *p*-cumárico (EC_{50} de $15,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$). Esses resultados indicam que a dexametasona é um fármaco mais potente, no entanto, tanto o ácido *p*-cumárico quanto a dexametasona foram eficazes na redução de IL-8 nas células A549.

Figura 4.1: Secreção de IL-8 em células A549 estimuladas por extrato de fumaça de cigarro (EFC). (a) Células expostas ao EFC (2,5% e 5%). (b) Células pré-tratadas com dexametasona e depois expostas ao EFC (5%). (c) Células pré-tratadas com ácido *p*-cumárico e depois expostas ao EFC (5%). (d) EC_{50} para a dexametasona e o ácido *p*-cumárico na secreção de IL-8 induzida por EFC. As barras representam a média \pm desvio padrão de três experimentos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em comparação com os controles sem tratamento.



Fonte: Autora, 2018

Embora os resultados dos ensaios biológicos sejam bastante importantes, sem dúvida seria interessante destacar qualquer diferença entre os fármacos. Nesse cenário, a espectroscopia Raman pode oferecer um novo ingrediente para elucidar as mudanças biológicas induzidas pelos fármacos nas células A549.

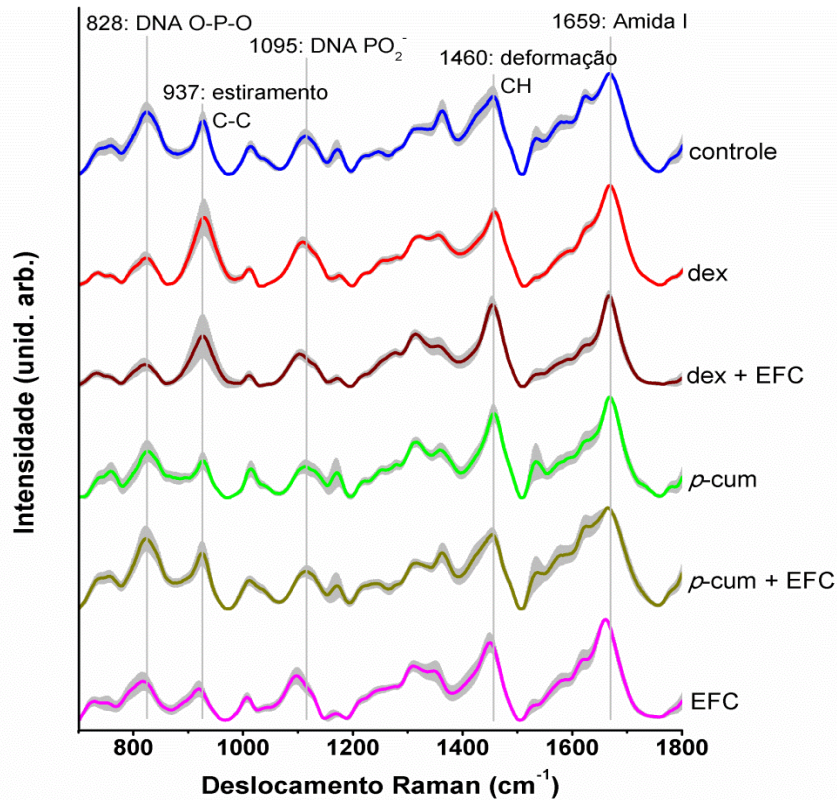
4.3.2 Variabilidade espectral entre células A549 vivas

A análise dos espectros Raman permitiu a avaliação das respostas induzidas pelos fármacos nas células A549, através da identificação das diferenças espectrais mais significativas entre os grupos celulares. Os espectros Raman das células foram divididos em seis grupos: (i) células tratadas apenas com meio RPMI-1640 (controle); (ii) células estimuladas com EFC (EFC); (iii) células tratadas com dexametasona (dex); (iv) células tratadas com dexametasona e estimuladas com EFC (dex + EFC); (v) células tratadas com ácido *p*-cumárico (*p*-cum); e (vi) células tratadas com ácido *p*-cumárico e estimuladas com EFC (*p*-cum + EFC).

A Figura 4.2 mostra os espectros Raman médios dos seis grupos de células após o pré-processamento, com os respectivos desvios padrão sobrepostos (região sombreada). Os espectros Raman de células A549 consistem principalmente de picos correspondentes a vibrações moleculares de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos, e as atribuições de bandas Raman utilizadas na interpretação das características espectrais foram realizadas com base na literatura publicada^{126; 127}. As principais mudanças observadas nos espectros das células A549 estão nas bandas Raman correspondentes ao estiramento da espinha dorsal de DNA O–P–O em 828 cm^{-1} , estiramento C–C em 937 cm^{-1} relacionado a proteínas, ligações peptídicas C–N de proteínas em 1128 cm^{-1} , vibrações de deformação C–H em 1460 cm^{-1} e vibrações na banda da amida I centrada em 1659 cm^{-1} . Os espectros Raman também mostraram picos na região espectral de $1209\text{--}1367\text{ cm}^{-1}$. Esta região é uma parte complexa dos espectros, pois muitas frequências vibracionais correspondentes a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos se sobrepõem.

A banda centrada em 828 cm^{-1} correspondente ao DNA O–P–O apresentou uma diminuição considerável nas células dos grupos dex e dex + EFC, enquanto nas células dos grupos *p*-cum e *p*-cum + EFC praticamente não apresentou alteração em comparação com as células controle. Já o pico em 937 cm^{-1} , relacionado a proteínas, apresentou um aumento significativo nas células dos grupos dex e dex + EFC, em comparação às células controle. As diferenças na banda da amida I centrada em 1659 cm^{-1} indicam que há variações na quantidade de proteínas e lipídios entre as células, uma vez que nesta faixa espectral muitas frequências vibracionais correspondentes a essas macromoléculas se sobrepõem. Também foi observado nessa região que os espectros das células dos grupos dex e dex + EFC sofreram um estreitamento em relação ao espectro das células controle, enquanto que as células dos grupos *p*-cum e *p*-cum + EFC apresentaram um perfil espectral semelhante ao das células controle.

Figura 4.2: Espectro Raman dos seis grupos de células A549 expostas a diferentes tratamentos com fármacos e/ou estímulo com extrato de fumaça de cigarro (EFC). Os espectros Raman são as médias de 30 células para cada grupo na região de impressão digital (700-1800 cm^{-1}). As áreas sombreadas representam o desvio padrão das médias.



Fonte: Autora, 2018

Apesar das alterações observadas, os espectros médios assemelham-se uns aos outros e não há grandes variações de grupo para grupo, embora alguns picos mostrem pequenas diferenças de intensidade. No entanto, mesmo pequenas diferenças nos espectros Raman podem ser suficientes para diferenciar grupos distintos de células submetidas a algum tipo de tratamento. Isso é possível através do uso conjunto da espectroscopia Raman com métodos estatísticos multivariados.

4.3.3 Classificação espectral baseada no PCA e HCA

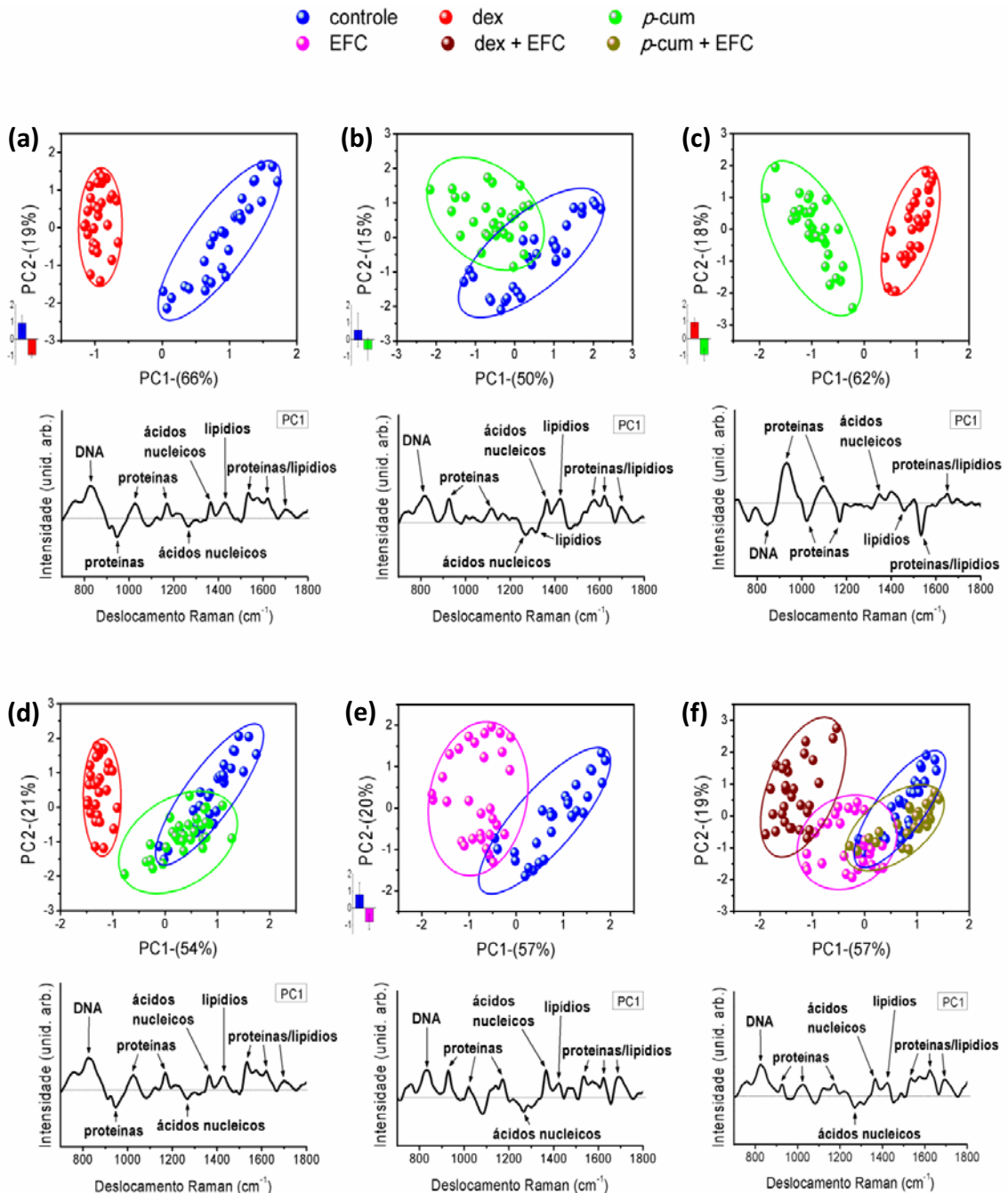
Neste estudo, o PCA e o HCA foram utilizados para fazer a diferenciação entre os grupos celulares e provar que os tratamentos de fato afetaram a composição bioquímica celular. Essas análises permitiram a interpretação dos dados espectrais e a classificação dos

diferentes grupos celulares. A análise PCA foi realizada nos espectros de células pré-processadas, e os escores para os dois primeiros PCs (PC1 e PC2) foram analisados com um teste de variância para duas amostras para determinar diferenças significativas nas médias dos escores entre os diferentes grupos celulares. Gráficos bidimensionais foram construídos com combinações de conjuntos de escores dos dois primeiros PCs, bem como os gráficos correspondentes aos pesos para o PC1.

Conforme ilustrado na Figura 4.3(a), as células do grupo controle (pontos azuis) podem ser facilmente distinguidas das células do grupo dex (pontos vermelhos) pelos dois primeiros PCs, indicando diferenças espectrais significativas entre os grupos. O principal discriminante foi o escore do PC1, onde o grupo dex apresentou escores negativos e o grupo controle, escores positivos. Neste caso, os dois primeiros PCs, representando 85% da variância, mostraram diferenças significativas entre os dois grupos ($p < 0,05$) por um teste de variância para duas amostras. Uma comparação análoga entre o grupo controle e o grupo *p*-cum (pontos verdes) é apresentada na Figura 4.3(b). Os dois primeiros PCs usados nesta comparação representaram 65% da variância entre os espectros Raman obtidos desses dois grupos de células. A análise mostrou uma dispersão das amostras, com uma pequena porção dos dois grupos de células sobrepostas, indicando que, embora houvesse diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos, muitos espectros foram semelhantes. Esses resultados mostraram que há uma maior similaridade entre as células tratadas com ácido *p*-cumárico e as células controle, o que sugere que o tratamento com ácido *p*-cumárico causa menos alterações na estrutura celular em comparação com o tratamento com dexametasona.

Os escores dos PCs apresentados na Figura 4.3(c) mostram excelente separação dos grupos dex e *p*-cum, evidenciando diferenças espectrais significativas entre eles e sugerindo diferentes mecanismos de ação dos fármacos. As três análises anteriores são corroboradas com o gráfico PCA para os três grupos celulares, ilustrado na Figura 4.3(d). Nessa análise, os dois primeiros PCs explicaram 75% da variância do conjunto de dados original, com PC1 descrevendo 54% e PC2 descrevendo 21% da variância total. A comparação direta entre o grupo controle e o grupo EFC (pontos magentas) é apresentada na Figura 4.3(e). Nessa análise, a variância atribuída aos dois primeiros PCs foi de 77% entre os espectros Raman dos dois grupos de células. O estímulo com a fumaça levou as células a um perfil de ativação (produção de IL-8), garantindo as diferenças espectrais entre os grupos. Finalmente, todos os grupos de células estimuladas com fumaça foram comparados simultaneamente com o grupo controle para determinar a resolução obtida usando os dois primeiros PCs, o que representou 76% da variância total dos dados (Figura 4.3(f)).

Figura 4.3: Análise de componentes principais (PCA). Gráficos de escores e gráficos de pesos para o PC1 para as células dos grupos: (a) controle e dex; (b) controle e *p*-cum; (c) dex e *p*-cum; (d) controle, dex e *p*-cum; (e) controle e EFC; e (f) controle, EFC, dex + EFC e *p*-cum + EFC. Os valores médios dos escores e os desvios padrão de cada grupo de amostra, comparados aos do grupo controle, estão indicados no lado esquerdo de cada gráfico. Os pesos para o PC1 mostram as características responsáveis pela diferenciação (ácidos nucleicos, proteínas e lipídios).



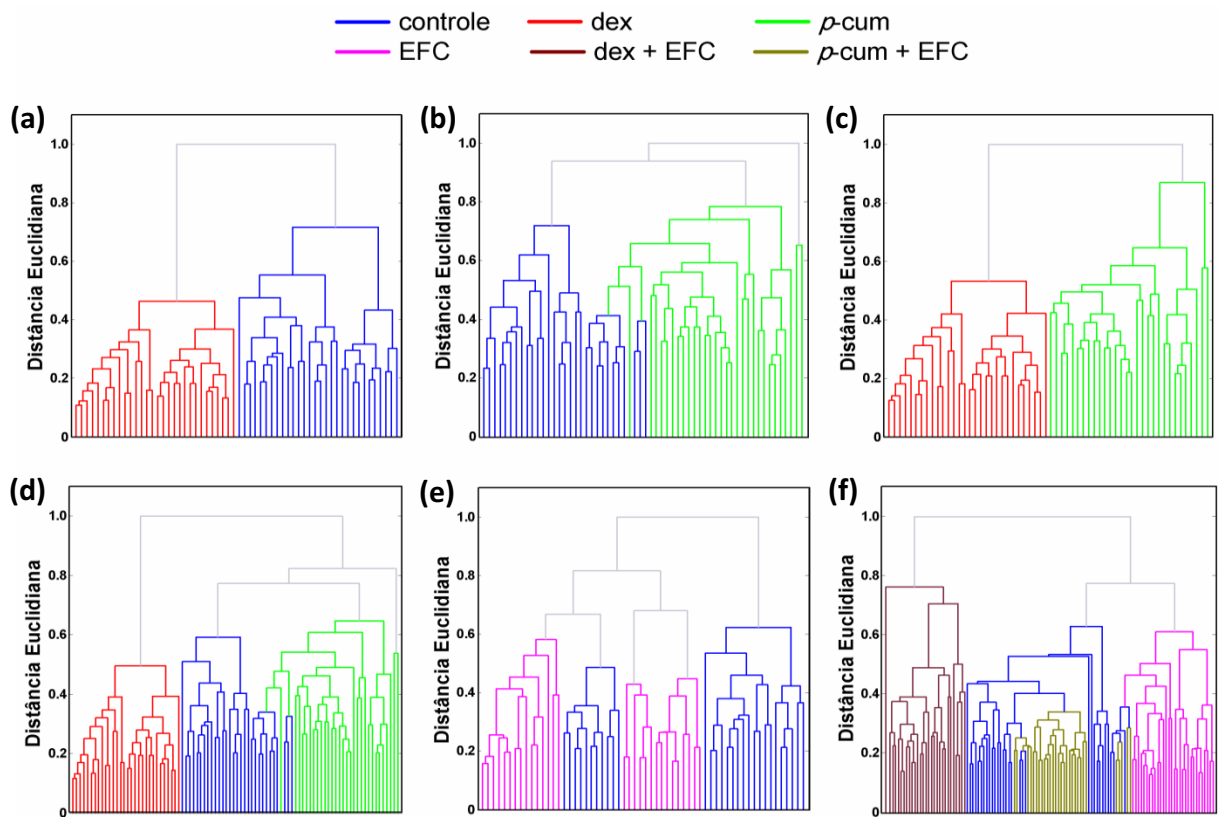
Os pesos para os PCs são representativos das diferenças bioquímicas entre os grupos de células, e contribuem para a diferenciação dos espectros no gráfico dos escores dos PCs. Os pesos são compostos por diferentes picos, tanto positivos como negativos, que correspondem a contribuições aumentadas ou diminuídas de componentes moleculares específicos dos espectros Raman. Na Figura 4.3(a), os pesos para o PC1 indicaram correlação positiva das bandas Raman em 828, 1027, 1168, 1364, 1460, 1533, 1659 e 1699 cm^{-1} , e correlação negativa das bandas em 937 e 1263 cm^{-1} para células do grupo dex quando comparadas às células do grupo controle. Para as células dos grupos controle e *p*-cum, os pesos para o PC1 indicaram correlação positiva das bandas em 828, 937, 1168, 1364, 1460, 1533, 1659 e 1699 cm^{-1} , enquanto que apresentou correlação negativa das bandas em 1263 e 1314 cm^{-1} (Figura 4.3(b)). Em comparação com as células do grupo *p*-cum, bandas negativas em 828, 1027, 1168, 1460 e 1533 cm^{-1} , e bandas positivas em 937, 1364 e 1659 cm^{-1} foram identificados nos espectros das células do grupo dex com base nos pesos para o PC1 (Figura 4.3(c)). Essas bandas estão de acordo com os espectros Raman medidos (Figura 4.2), e possuem os maiores pesos para a diferenciação entre os tratamentos com dexametasona e ácido *p*-cumárico, evidenciando novamente o fato de que os fármacos possuem diferentes mecanismos de ação. As mesmas análises foram realizadas para os grupos expostos ao EFC.

O HCA também foi utilizado para discriminação dos seis grupos de células. Os resultados são apresentados na forma de dendrogramas, que agrupam as amostras em *clusters* de acordo com suas similaridades. Observando os resultados dos gráficos PC1 \times PC2 obtidos anteriormente, foi possível verificar que alguns grupos de células se encontravam sobrepostos. Essa informação está estritamente relacionada aos agrupamentos formados pelo HCA, uma vez que quanto menor for essa sobreposição, melhor será o agrupamento, ou seja, as amostras que de fato apresentam similaridade serão reunidas em um mesmo *cluster*. Conforme ilustrado na Figura 4.4(a), o HCA resultou em dois *clusters* principais: o primeiro refere-se ao grupo dex e o segundo ao grupo controle. Os *clusters* mostraram uma clara distinção entre os dois grupos.

A Figura 4.4(b) mostra o dendrograma para os grupos controle e *p*-cum. Embora os grupos estejam separados em dois *clusters* principais distintos, há algumas ramificações correspondentes às células controle que estão dentro do aglomerado formado pelas células tratadas com ácido *p*-cumárico, indicando que essas amostras têm características semelhantes, como sugerido pelo PCA. O dendrograma para os grupos dex e *p*-cum (Figura 4.4(c)) mostrou uma clara distinção entre os dois *clusters*. Na Figura 4.4(d), a análise revelou a separação das amostras em três *clusters* principais: o primeiro refere-se ao grupo dex, o segundo ao grupo

controle e o terceiro ao grupo *p*-cum. Esta análise corroborou os resultados obtidos nas Figuras 4.4(a) e 4.4(b). Os grupos de células estimuladas com fumaça também foram analisados pelo HCA. A Figura 4.4(e) mostra o dendrograma obtido para o grupo de células controle e o grupo EFC. Na Figura 4.4(f), todos os grupos de células estimuladas com fumaça são mostrados juntos com o grupo controle.

Figura 4.4: Análise de agrupamento hierárquico (HCA). Dendrogramas para as células dos grupos: (a) controle e dex; (b) controle e *p*-cum; (c) dex e *p*-cum; (d) controle, dex e *p*-cum; (e) controle e EFC; e (f) controle, EFC, dex + EFC e *p*-cum + EFC.



Fonte: Autora, 2018

4.4 Conclusões

Neste estudo, foi possível caracterizar substâncias utilizadas no tratamento de processos inflamatórios através da espectroscopia Raman. Para isso, foi realizada uma análise comparativa das ações *in vitro* da dexametasona e do ácido *p*-cumárico em células A549. Os ensaios biológicos revelaram que o pré-tratamento com dexametasona ou ácido *p*-cumárico

reduziu a produção de IL-8 nas células epiteliais, mostrando que ambos os fármacos foram eficazes no tratamento da inflamação. No entanto, a análise dos espectros Raman mostrou que as células tratadas com ácido *p*-cumárico (estimuladas ou não com EFC) apresentaram um perfil espectral similar às células controle, enquanto que nas células tratadas com dexametasona (estimuladas ou não com EFC), as mudanças espectrais foram mais acentuadas em relação às células controle.

Os resultados do PCA e do HCA mostraram uma clara distinção entre as células tratadas com ácido *p*-cumárico e as células tratadas com dexametasona, evidenciando que estes grupos celulares possuem características espectrais distintas, e sugerindo que os mecanismos de ação dos fármacos ocorrem por vias diferentes, ou seja, cada fármaco modifica a célula de maneira diferente. A análise dos pesos para o PC1 revelou informações sobre a origem da variabilidade dentro dos grupos celulares, derivada de variações nos componentes moleculares que contribuem para os espectros. A variância revelada concordou muito bem com as bandas selecionadas nos espectros Raman, uma vez que os pesos podem ser usados para tal comparação¹²⁸.

Tomados em conjunto, estes resultados demonstraram que o ácido *p*-cumárico possui efeito anti-inflamatório significativo sobre as células epiteliais ativadas por EFC, o que pode ser útil no tratamento da inflamação das vias aéreas na COPD, como uma alternativa ao uso de corticosteroides.

5. Investigação de mecanismos de morte celular induzidos por flavonoides em *Leishmania amazonensis* através da espectroscopia Raman

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais das medidas utilizando a técnica Raman para investigação de mecanismos de morte celular induzidos por flavonoides em macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados obtidos contribuem com informações moleculares úteis que podem ser aplicadas ao desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da leishmaniose.

5.1 Introdução

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que afetam os seres humanos. É considerada uma doença negligenciada com grande impacto nos indivíduos mais pobres, especialmente em países subdesenvolvidos^{129; 130}. Apesar de ser uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, o tratamento atualmente disponível para a leishmaniose é restrito a alguns medicamentos de primeira escolha, como a pentamidina e a anfotericina B. Os principais problemas associados aos tratamentos convencionais são a resistência intrínseca ou adquirida pelo protozoário e a alta incidência de efeitos adversos e toxicidade¹³¹. Nesse sentido, a identificação de novos fármacos e compostos é de interesse para pesquisadores de todo o mundo.

Os produtos naturais são fontes potenciais de novos agentes para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, especialmente aquelas causadas por parasitas protozoários¹³². Incluído na biodiversidade brasileira, o gênero *Solanum* é o mais representativo da família *Solanaceae* com 1400 espécies¹³³, e é caracterizado pela produção de uma variedade de glicoalcaloides^{134; 135} e alta ocorrência de flavonoides^{136; 137}. Algumas espécies de *Solanum* têm sido relatadas em atividades anti-inflamatória, leishmanicida, tripanossomal e anticâncer^{138; 139; 140; 141; 142}. Nesse contexto, a técnica Raman foi utilizada para investigação de mecanismos de morte celular induzidos por flavonoides isolados de *Solanum*

paludosum em macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados obtidos evidenciam que a técnica pode contribuir com informações moleculares úteis para caracterização dos flavonoides, o que poderia ser aplicável ao desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da leishmaniose.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Cultura celular, infecção e tratamento

Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos Swiss (pesando de 20-25 g) através de lavagem peritoneal com 10 mL de PBS frio (137 mM de NaCl, 8 mM de Na₂HPO₄, 2,7 mM de KCl, 1,5 mM de KH₂PO₄, pH de 7,0). As células do exsudado peritoneal foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos e o sedimento foi ressuspensão em meio de cultura. Em seguida, as células foram contadas e semeadas em lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro) em placas de 24 poços e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ durante 12 horas para adesão.

As células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* usando uma proporção de 1:10 a 37 °C durante a noite em experimentos isolados. As promastigotas não internalizadas foram removidas por lavagem com PBS (três vezes). Os macrófagos infectados foram tratados com pentamidina (fármaco de referência) e com flavonoides isolados de *Solanum paludosum*, todos na concentração de 10 µM, previamente diluídos em meio RPMI-1640 com 0,1% de DMSO (veículo controle). As células foram mantidas a 37 °C em 5% de CO₂ por 48 horas, e então fixadas com glutaraldeído a 4% por 5 minutos.

5.2.2 Aquisição dos espectros Raman

Os espectros Raman foram obtidos usando o mesmo equipamento do estudo anterior. Uma lente objetiva de 100× (NA = 0,9) foi usada para focalização das células (região nuclear). Espectros de 50 células para cada um dos grupos foram medidos na faixa espectral de 800-1800 cm⁻¹. As aquisições foram feitas utilizando 15 acumulações em 1 segundo,

totalizando 15 segundos de exposição por amostra. Todos os experimentos foram realizados com células fixadas.

5.2.3 Pré-processamento de dados e análise espectral

A subtração da fluorescência dos espectros foi realizada por meio de um algoritmo desenvolvido no *software* Matlab® (Mathworks Inc., EUA). Esse algoritmo também foi utilizado para o ajuste da linha de base e normalização dos espectros, que foi feita pela área total do espectro. A região espectral escolhida para análise corresponde aos modos de impressão digital vibracional de amostras biológicas (800-1800 cm^{-1}). Em seguida, os espectros Raman processados foram submetidos à análise de componentes principais (PCA). Os gráficos de escores do PCA foram construídos com a primeira e a segunda componentes principais. Essa análise foi realizada utilizando um algoritmo desenvolvido no Matlab® (Mathworks Inc., EUA).

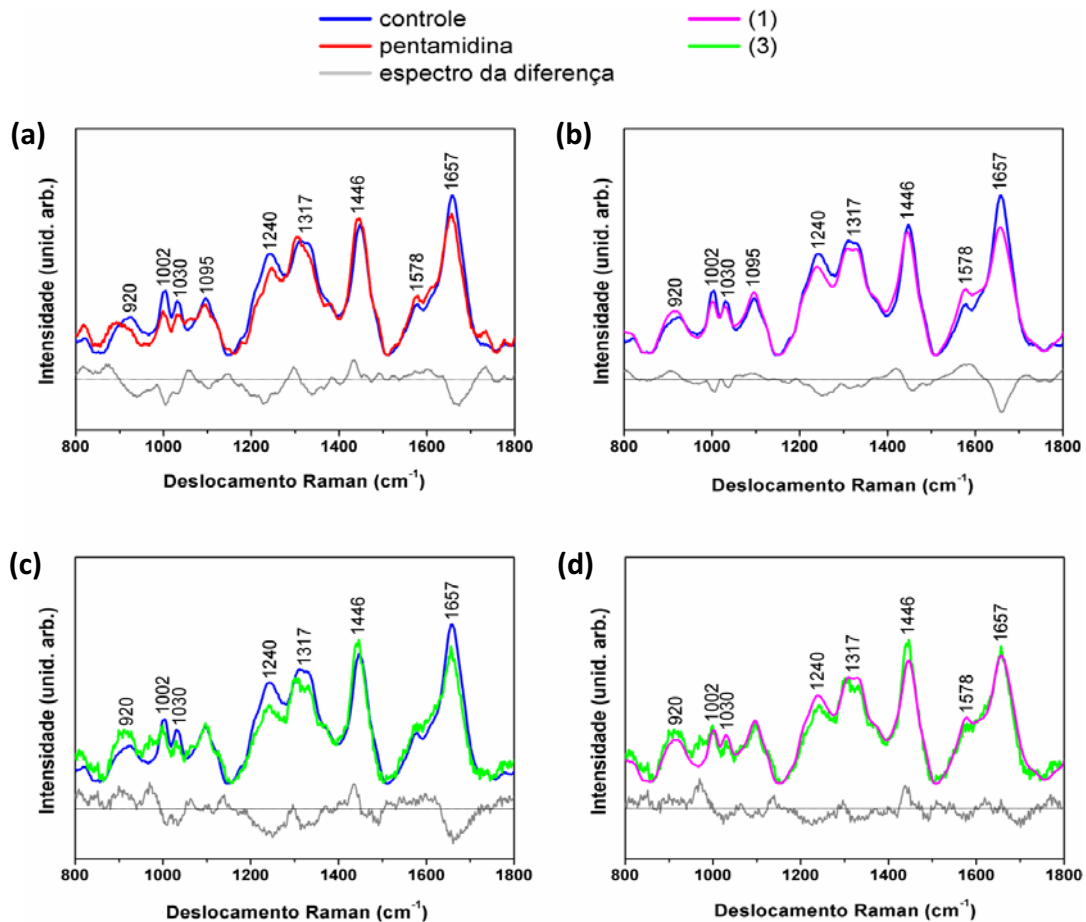
5.3 Resultados e Discussões

5.3.1 Espectros Raman de macrófagos infectados com *L. amazonensis*

A análise dos espectros Raman permitiu a avaliação das respostas induzidas pelos flavonoides em macrófagos, através da identificação das diferenças espectrais mais importantes entre os grupos celulares. Os espectros Raman das células foram divididos em quatro grupos: (i) células em meio RPMI-1640 com DMSO (controle); (ii) células tratadas com pentamidina; (iii) células tratadas com o flavonoide (1); e (iv) células tratadas com o flavonoide (3). A classificação dada aos flavonoides se deve ao fato de que os cinco compostos principais de *S. paludosum* foram isolados e testados quanto à atividade leishmanicida e citotoxicidade. Os flavonoides caracterizados como 3,7,8,4'-tetra-*O*-metilgossipetina (1) e 3,7-di-*O*-metilkanferol (3), foram selecionados para o tratamento dos macrófagos infectados com promastigotas de *L. amazonensis* utilizados nas análises Raman por apresentarem atividade leishmanicida proeminente e não causarem efeitos tóxicos para a célula hospedeira.

As principais bandas observadas nos espectros das células estão nas regiões correspondentes ao estiramento C–C do anel de prolina em 920 cm^{-1} , picos de fenilalanina em 1002 e 1030 cm^{-1} , estiramento simétrico do grupo fosfodioxido de DNA PO_2^- em 1095 cm^{-1} , banda centrada em 1240 cm^{-1} relacionada ao RNA, vibrações das bases adenina e guanina do DNA em 1317 e 1578 cm^{-1} , banda em 1446 cm^{-1} correspondente às vibrações de deformação C–H, e vibrações na banda da amida I centrada em 1657 cm^{-1} . As atribuições das bandas Raman utilizadas na interpretação das características espectrais foram realizadas com base na literatura publicada⁹⁴. As regiões espectrais com as variações mais significativas foram apontadas com base na diferença espectral calculada entre os grupos de células, e são mostradas na Figura 5.1.

Figura 5.1: Espectros Raman de macrófagos infectados com *L. amazonensis* expostos a diferentes tratamentos. Os espectros Raman são as médias de 50 células para cada grupo na região de impressão digital ($800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$). (a) grupos controle e pentamidina, (b) grupos controle e (1), (c) grupos controle e (3), e (d) grupos (1) e (3). As linhas cinza representam o espectro da diferença computado entre os grupos de células.



A análise dos espectros das células dos grupos controle e pentamidina, Figura 5.1(a), revela alterações em praticamente todas as bandas analisadas. Os picos em 920, 1002, 1030, 1446 e 1657 cm^{-1} são relacionados a proteínas, enquanto que os picos em 1095, 1240, 1317 e 1578 cm^{-1} correspondem a ácidos nucleicos. Essas alterações indicam que há variações na quantidade de proteínas e ácidos nucleicos entre as células. Como a pentamidina é uma diamidina aromática, a redução das vibrações de prolina induzidas pelo tratamento pode estar relacionada às alterações induzidas pelo fármaco nas vias das poliaminas¹⁴³. Além disso, a pentamidina reduziu os picos da fenilalanina e da amida I, indicando alterações conformacionais das proteínas^{126; 144; 145}. Também é observada uma diminuição da intensidade dos picos em 1095 e 1240 cm^{-1} , indicando desintegração do DNA/RNA relacionado à morte celular^{126; 145}.

As diferenças entre os espectros Raman das células dos grupos controle e (1) podem ser visualizadas na Figura 5.1(b). As células do grupo (1) apresentaram uma quantidade menor de proteínas, conforme indicado pelos picos menos intensos em 1002, 1030, 1446 e 1657 cm^{-1} . Esse resultado pode indicar desnaturação e alterações conformacionais em proteínas relacionadas à morte celular¹⁴⁴. Embora o pico em 1578 cm^{-1} tenha aumentado ligeiramente, a quantidade de ácidos nucleicos nas células do grupo (1) parece ser menor em relação às células controle, como indicado pelos picos menos intensos em 1240 e 1317 cm^{-1} . A diminuição destes picos indica um aumento no catabolismo do RNA e consequente redução da síntese proteica.

Variações espectrais importantes também foram observadas no espectro de diferença das células dos grupos controle e (3), como pode ser observado na Figura 5.1(c). Entre as regiões com as maiores variações espectrais estão as bandas em 920, 1002, 1030, 1446 e 1657 cm^{-1} , correspondentes a proteínas, e as bandas em 1240 e 1317 cm^{-1} , relacionadas aos ácidos nucleicos. A diminuição da intensidade nas bandas correspondentes a proteínas no espectro das células do grupo (3), pode indicar desnaturação e alterações conformacionais em proteínas relacionadas à morte celular¹⁴⁴. Os espectros dessas células também mostraram uma diminuição significativa na intensidade dos picos correspondentes aos ácidos nucleicos, sugerindo uma redução no DNA e um aumento no catabolismo do RNA.

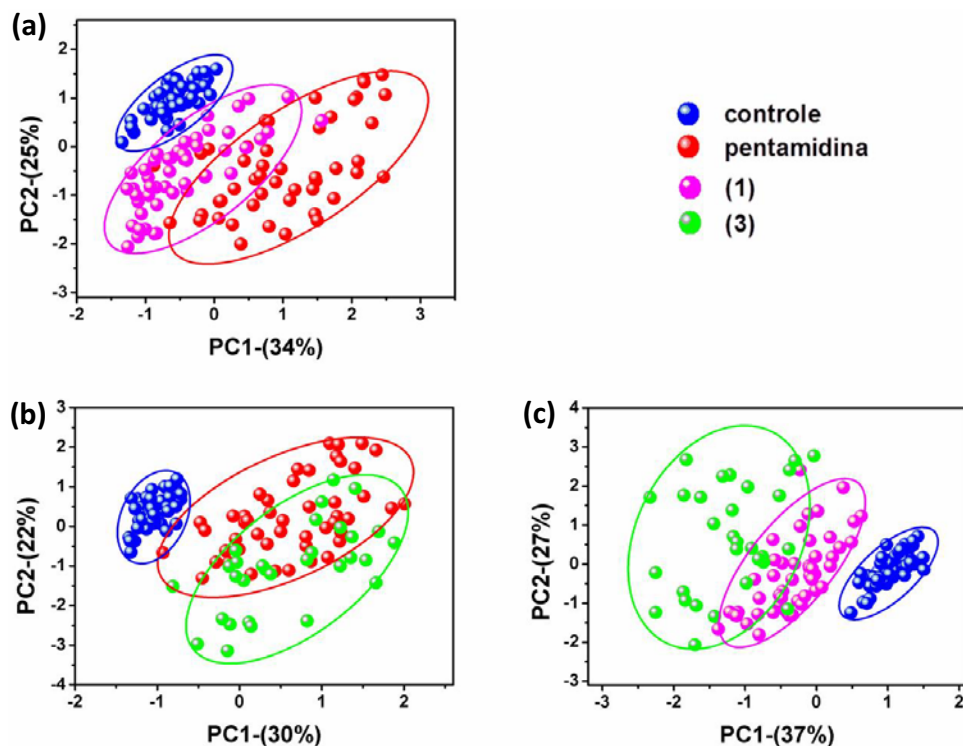
Por fim, foi realizada uma análise comparativa entre as células dos grupos (1) e (3), como mostra a Figura 5.1(d). As variações espectrais mais significativas ocorreram nas seguintes regiões: 920, 1030, 1446 e 1657 cm^{-1} (correspondentes a proteínas), e 1240, 1317 e 1578 cm^{-1} (correspondentes aos ácidos nucleicos). A diminuição na intensidade dos picos

correspondentes aos ácidos nucleicos nas células do grupo (3) reitera a análise feita na Figura 5.1(c) e pode ser indicativa de morte celular.

5.3.2 Classificação espectral baseada no PCA

Neste estudo, o PCA foi utilizado para classificação dos grupos celulares e interpretação dos dados espectrais. A distribuição das células dos grupos controle (pontos azuis), pentamidina (pontos vermelhos) e (1) (pontos rosas) é observada na Figura 5.2(a). As células foram classificadas com base nos dois primeiros PCs, que explicaram 59% da variância total. De acordo com a distribuição apresentada, a grande dispersão das células do grupo pentamidina indica espectros bastantes distintos uns dos outros. Há uma pequena região de sobreposição das amostras sob tratamento, indicando que embora existam diferenças significativas entre os grupos, muitos espectros são semelhantes.

Figura 5.2: Análise de componentes principais (PCA) de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Gráficos de escores do PCA para (a) grupos controle, pentamidina e (1), (b) grupos controle, pentamidina e (3), e (c) grupos controle, (1) e (3).



Uma comparação análoga é apresentada na Figura 5.2(b) entre as células dos grupos controle, pentamidina e (3) (pontos verdes). Os dois primeiros PCs explicaram 52% da variância total dos dados, com PC1 descrevendo 30% e PC2 descrevendo 22%. Nesta análise, também se observou que ambos os tratamentos causaram uma grande dispersão das amostras, evidenciando espectros bastante diferentes dentro de cada um dos grupos.

O gráfico de escores dos PCs apresentado na Figura 5.2(c) mostra a distribuição das células dos grupos controle, (1) e (3). Os dois primeiros PCs usados nessa comparação foram responsáveis por 64% da variância total. A distribuição apresentada evidenciou as diferenças espectrais entre os grupos expostos aos tratamentos, sugerindo que os flavonoides possuem diferentes mecanismos de ação. O agrupamento das amostras em três *clusters* indica que as diferenças sistemáticas entre os espectros Raman podem ser reveladas facilmente pelo PCA.

5.4 Conclusões

Neste estudo, a espectroscopia Raman foi utilizada para investigar mecanismos de morte celular induzidos por flavonoides em macrófagos infectados com promastigotas de *Leishmania amazonensis*. As análises Raman mostraram que o tratamento com o fármaco padrão pentamidina produziu mudanças significativas em praticamente todo o espectro celular quando comparado ao grupo controle. Já os espectros das células tratadas com os flavonoides (1) e (3) apresentaram alterações nas mesmas regiões espectrais, no entanto, as células tratadas com o flavonoide (3) mostraram mudanças mais dramáticas em seu espectro Raman, quando este é comparado com o espectro das células controle.

Para destacar ainda mais as diferenças entre os tratamentos, foi realizada a análise PCA dos espectros Raman. De modo geral, essa análise mostrou que o tratamento com o flavonoide (1) causou menos alterações na estrutura celular em comparação aos tratamentos com a pentamidina e o flavonoide (3), uma vez que os espectros dessas células apresentaram uma distribuição dispersa no gráfico de escores, evidenciando espectros bastante distintos dentro desses grupos celulares. Embora o tratamento com os flavonoides induza a morte celular, a análise PCA sugeriu que os mecanismos de ação dos flavonoides ocorrem por vias diferentes, ou seja, cada flavonoide modifica a célula de maneira diferente, corroborando os resultados das análises Raman.

Conclusões Finais e Perspectivas

Neste trabalho, a microscopia de força atômica e a espectroscopia Raman foram utilizadas para avaliar alterações biomecânicas e bioquímicas induzidas por fármacos em células biológicas. Inicialmente, foi possível avaliar os efeitos do tratamento com Sema3A nas propriedades biomecânicas de timócitos, por meio das análises da morfologia, rugosidade da membrana e elasticidade celular usando a microscopia de força atômica. O tratamento com Sema3A induziu a formação de filopódios nos timócitos, aumentou a rigidez e a rugosidade da membrana celular, e promoveu o rearranjo do citoesqueleto. Levando em conta o contexto desta célula em seu microambiente no organismo, essas informações são relevantes para compreender a ação da Sema3A em outros modelos celulares.

A espectroscopia Raman mostrou ser uma ferramenta bem-sucedida na avaliação da resposta anti-inflamatória induzida por fármacos em células A549. Uma análise conjunta desta técnica com métodos estatísticos multivariados mostrou que mesmo sendo igualmente eficientes no processo inflamatório, a dexametasona e o ácido *p*-cumárico possuem diferentes mecanismos de ação. Os resultados fornecem uma compreensão inicial do mecanismo anti-inflamatório do ácido *p*-cumárico, um composto natural que pode ser uma possível alternativa terapêutica em substituição aos glicocorticoides no tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Além disso, também foi possível investigar mecanismos de morte celular induzidos por flavonoides em *Leishmania amazonensis* através das análises dos espectros Raman. As mudanças bioquímicas observadas nos espectros foram usadas como marcadores de morte celular, e evidenciam os principais mecanismos moleculares induzidos pelos flavonoides no comportamento celular. Tomados em conjunto, esses resultados enfatizam o potencial da técnica Raman na triagem de novos compostos que podem ser utilizados em substituição a medicamentos padrão, que usados em longo prazo estão associados ao risco real de efeitos adversos.

Como perspectivas de trabalhos futuros, citam-se:

- Avaliação dos efeitos do tratamento com uvaol nas propriedades biomecânicas de células trofoblásticas expostas a *Streptococcus* do Grupo B utilizando AFM (trabalho em fase de conclusão);

- Análise das alterações bioquímicas induzidas pelo tratamento com uvaol em células trofoblásticas expostas a *Streptococcus* do Grupo B através da técnica Raman (trabalho em andamento);
- Avaliação da eficácia de fármacos para o tratamento de células de câncer cerebral através da espectroscopia Raman (trabalho em andamento);
- Desenvolvimento de metodologias que permitam investigar a dinâmica de rastreamento de nanoestruturas dentro das células para ampliar o entendimento sobre o mecanismo de ação dos fármacos;

Referências

- ¹ WICKRAMASINGHE, H. K. Scanned-probe microscopes. **Scientific American**, v. 261, n. 4, p. 98-105, 1989. ISSN 0036-8733.
- ² BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning Tunneling Microscopy. **Helvetica Physica Acta**, v. 55, n. 6, p. 726-735, 1982.
- ³ BINNIG, G.; ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence. **reviews of modern physics**, v. 59, n. 3, p. 615, 1987.
- ⁴ BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical review letters**, v. 56, n. 9, p. 930, 1986.
- ⁵ CARO, J. et al. Nanomechanical properties of surfaces of molecular organic thin films. **Synthetic metals**, v. 1, n. 121, p. 1417-1418, 2001. ISSN 0379-6779.
- ⁶ BENÍTEZ, J. et al. Molecular packing changes of octadecylamine monolayers on mica induced by pressure and humidity. **Langmuir**, v. 19, n. 3, p. 762-765, 2003. ISSN 0743-7463.
- ⁷ CORDOVA, G.; LEE, B. Y.; LEONENKO, Z. Magnetic Force Microscopy for Nanoparticle Characterization. **arXiv preprint arXiv:1704.08289**, 2017.
- ⁸ OLIVER, R. A. Advances in AFM for the electrical characterization of semiconductors. **Reports on Progress in Physics**, v. 71, n. 7, 2008. ISSN 0034-4885.
- ⁹ CUSTANCE, O.; PEREZ, R.; MORITA, S. Atomic force microscopy as a tool for atom manipulation. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. 12, p. 803, 2009. ISSN 1748-3395.
- ¹⁰ DUBREUIL, F. et al. Polyelectrolyte capsules modified with YF3 nanoparticles: an AFM study. **Macromolecular rapid communications**, v. 25, n. 11, p. 1078-1081, 2004. ISSN 1022-1336.
- ¹¹ ALESSANDRINI, A.; FACCI, P. AFM: a versatile tool in biophysics. **Measurement science and technology**, v. 16, n. 6, p. R65, 2005. ISSN 0957-0233.
- ¹² ALLEN, S. et al. **Measuring and visualizing single molecular interactions in biology**: Portland Press Limited 2003.

- ¹³ HANSMA, H. G. Surface biology of DNA by atomic force microscopy. **Annual review of physical chemistry**, v. 52, n. 1, p. 71-92, 2001. ISSN 0066-426X.
- ¹⁴ SMEKAL, A. Zur quantentheorie der dispersion. **Naturwissenschaften**, v. 11, n. 43, p. 873-875, 1923. ISSN 0028-1042.
- ¹⁵ RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new type of secondary radiation. **Nature**, v. 121, n. 3048, p. 501-502, 1928. ISSN 1476-4687.
- ¹⁶ KELLER, M. D.; KANTER, E. M.; MAHADEVAN-JANSEN, A. Raman spectroscopy for cancer diagnosis. **SPECTROSCOPY-SPRINGFIELD THEN EUGENE THEN DULUTH-**, v. 21, n. 11, p. 33, 2006. ISSN 0887-6703.
- ¹⁷ CALS, F. L. et al. Method development: Raman spectroscopy-based histopathology of oral mucosa. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 44, n. 7, p. 963-972, 2013. ISSN 0377-0486.
- ¹⁸ KONG, K. et al. Raman spectroscopy for medical diagnostics—From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. **Advanced drug delivery reviews**, v. 89, p. 121-134, 2015. ISSN 0169-409X.
- ¹⁹ MANOHARAN, R.; WANG, Y.; FELD, M. S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 52, n. 2, p. 215-249, 1996. ISSN 1386-1425.
- ²⁰ MAGONOV, S. N.; WHANGBO, M.-H.; WEISS, W. Surface Analysis with STM and AFM. **Angewandte Chemie-German Edition**, v. 109, n. 12, p. 1415-1416, 1997. ISSN 0044-8249.
- ²¹ MEYER, E. Atomic force microscopy. **Progress in surface science**, v. 41, n. 1, p. 3-49, 1992. ISSN 0079-6816.
- ²² BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface science reports**, v. 59, n. 1-6, p. 1-152, 2005. ISSN 0167-5729.
- ²³ SOUZA, S. T. D. Microscopias de varredura por sondas aplicadas ao estudo de amostras biológicas, vítreas e cerâmicas. 2014.
- ²⁴ HOWLAND, R.; BENATAR, L. **A Practical Guide: To Scanning Probe Microscopy**. Park scientific instruments, 1996.
- ²⁵ ZANETTE, S. et al. Theoretical and experimental investigation of the force–distance relation for an atomic force microscope with a pyramidal tip. **Surface science**, v. 453, n. 1-3, p. 75-82, 2000. ISSN 0039-6028.

- 26 KITTEL, C. Introduction to solid state physics, John Wiley & Sons. **Inc., New York**, 2005.
- 27 FEYNMAN, R. P.; LEIGHTON, R. B.; SANDS, M. The feynman lectures on physics; vol. i. **American Journal of Physics**, v. 33, n. 9, p. 750-752, 1965. ISSN 0002-9505.
- 28 ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. Academic press, 2011. ISBN 0123919339.
- 29 ALBRECHT, T. et al. Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity. **Journal of Applied Physics**, v. 69, n. 2, p. 668-673, 1991. ISSN 0021-8979.
- 30 CHEN, X. et al. Interpretation of tapping mode atomic force microscopy data using amplitude-phase-distance measurements. **Ultramicroscopy**, v. 75, n. 3, p. 171-181, 1998. ISSN 0304-3991.
- 31 ZHONG, Q. et al. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. **Surface Science Letters**, v. 290, n. 1-2, p. L688-L692, 1993. ISSN 0167-2584.
- 32 GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003. ISSN 1474-1741.
- 33 JANMEY, P. A. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. **Physiological reviews**, v. 78, n. 3, p. 763-781, 1998. ISSN 1522-1210.
- 34 ROTSCH, C. et al. AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. **Cell biology international**, v. 21, n. 11, p. 685-696, 1997. ISSN 1065-6995.
- 35 KREIDER, T. et al. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 4, p. 448-453, 2007. ISSN 0952-7915.
- 36 HÄBERLE, W.; HÖRBER, J.; BINNIG, G. Force microscopy on living cells. **Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena**, v. 9, n. 2, p. 1210-1213, 1991. ISSN 1071-1023.
- 37 BUTT, H.-J. et al. Imaging cells with the atomic force microscope. **Journal of structural biology**, v. 105, n. 1-3, p. 54-61, 1990. ISSN 1047-8477.
- 38 WEISENHORN, A. et al. Forces in atomic force microscopy in air and water. **Applied Physics Letters**, v. 54, n. 26, p. 2651-2653, 1989. ISSN 0003-6951.

- 39 PALUCH, E.; HEISENBERG, C.-P. Biology and physics of cell shape changes in development. **Current Biology**, v. 19, n. 17, p. R790-R799, 2009. ISSN 0960-9822.
- 40 EGGERT, U. S.; MITCHISON, T. J.; FIELD, C. M. Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 75, p. 543-566, 2006. ISSN 0066-4154.
- 41 GUCK, J. et al. Critical review: cellular mechanobiology and amoeboid migration. **Integrative biology**, v. 2, n. 11-12, p. 575-583, 2010. ISSN 1757-9708.
- 42 LÄMMERMANN, T.; SIXT, M. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 5, p. 636-644, 2009. ISSN 0955-0674.
- 43 GARDEL, M. L. et al. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 26, p. 315-333, 2010. ISSN 1081-0706.
- 44 DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. **Science**, v. 324, n. 5935, p. 1673-1677, 2009. ISSN 0036-8075.
- 45 SOUZA, S. T. et al. Macrophage adhesion on fibronectin evokes an increase in the elastic property of the cell membrane and cytoskeleton: an atomic force microscopy study. **European Biophysics Journal**, v. 43, n. 12, p. 573-579, 2014. ISSN 0175-7571.
- 46 SVALDO-LANERO, T. et al. Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells. **Ultramicroscopy**, v. 107, n. 10-11, p. 913-921, 2007. ISSN 0304-3991.
- 47 LEE, G. Y.; LIM, C. T. Biomechanics approaches to studying human diseases. **Trends in biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 111-118, 2007. ISSN 0167-7799.
- 48 ANTONIO, P. D. et al. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1818, n. 12, p. 3141-3148, 2012. ISSN 0005-2736.
- 49 GARCIA, C. R. et al. Imaging Plasmodium falciparum-Infected Ghost and Parasite by Atomic Force Microscopy. **Journal of structural biology**, v. 119, n. 2, p. 92-98, 1997. ISSN 1047-8477.
- 50 NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. **Cerâmica**, v. 44, n. 290, p. 4223-4231, 1998.
- 51 MULLER, D. J. AFM: a nanotool in membrane biology. **Biochemistry**, v. 47, n. 31, p. 7986-7998, 2008. ISSN 0006-2960.

- 52 SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. **Biophysical chemistry**, v. 107, n. 2, p. 133-149, 2004. ISSN 0301-4622.
- 53 SCHEURING, S. et al. Sampling the conformational space of membrane protein surfaces with the AFM. **European biophysics journal**, v. 31, n. 3, p. 172-178, 2002. ISSN 0175-7571.
- 54 JEREMIC, A. et al. Reconstituted fusion pore. **Biophysical journal**, v. 85, n. 3, p. 2035-2043, 2003. ISSN 0006-3495.
- 55 KAKABOURA, A. et al. Evaluation of surface characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 1, p. 155-163, 2007. ISSN 0957-4530.
- 56 KEREN, K. et al. Mechanism of shape determination in motile cells. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 475, 2008. ISSN 1476-4687.
- 57 KROBATH, H. et al. Lateral diffusion of receptor-ligand bonds in membrane adhesion zones: Effect of thermal membrane roughness. **EPL (Europhysics Letters)**, v. 78, n. 3, p. 38003, 2007. ISSN 0295-5075.
- 58 ASKELAND, D. R. et al. The science and engineering of materials. 2003.
- 59 LEKKA, M. et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 518, n. 2, p. 151-156, 2012. ISSN 0003-9861.
- 60 LEKKA, M. Discrimination between normal and cancerous cells using AFM. **Bionanoscience**, v. 6, n. 1, p. 65-80, 2016. ISSN 2191-1630.
- 61 CAPPELLA, B. et al. Force-distance curves by AFM. A powerful technique for studying surface interactions. **IEEE engineering in medicine and biology magazine: the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society**, v. 16, n. 2, p. 58-65, 1997. ISSN 0739-5175.
- 62 HERTZ, H. Uber den kontakt elastischer korper. **J. Reine Angew. Mathematik**, v. 92, n. 156, p. 245-260, 1881.
- 63 RADMACHER, M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. **Methods in cell biology**, v. 68, p. 67-90, 2002. ISSN 0091-679X.
- 64 SNEDDON, I. N. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. **International journal of engineering science**, v. 3, n. 1, p. 47-57, 1965. ISSN 0020-7225.

- ⁶⁵ MAHAFFY, R. et al. Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy. **Biophysical journal**, v. 86, n. 3, p. 1777-1793, 2004. ISSN 0006-3495.
- ⁶⁶ MOEENDARBARY, E.; HARRIS, A. R. Cell mechanics: principles, practices, and prospects. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 6, n. 5, p. 371-388, 2014. ISSN 1939-5094.
- ⁶⁷ YAZDANI, U.; TERMAN, J. R. The semaphorins. **Genome biology**, v. 7, n. 3, p. 211, 2006. ISSN 1474-760X.
- ⁶⁸ WORZFELD, T.; OFFERMANN, S. Semaphorins and plexins as therapeutic targets. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 8, p. 603, 2014. ISSN 1474-1784.
- ⁶⁹ ZHOU, Y.; GUNPUT, R.-A. F.; PASTERKAMP, R. J. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. **Trends in biochemical sciences**, v. 33, n. 4, p. 161-170, 2008. ISSN 0968-0004.
- ⁷⁰ MENDES-DA-CRUZ, D. A. et al. Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1153, n. 1, p. 20-28, 2009. ISSN 0077-8923.
- ⁷¹ NASARRE, P.; GEMMILL, R. M.; DRABKIN, H. A. The emerging role of class-3 semaphorins and their neuropilin receptors in oncology. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 1663, 2014.
- ⁷² LEPELLETIER, Y. et al. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 13, p. 5545-5550, 2007. ISSN 0027-8424.
- ⁷³ PETRIE, H. T.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 649-679, 2007. ISSN 0732-0582.
- ⁷⁴ GRAY, D.; CHIDGEY, A.; BOYD, R. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 260, n. 1-2, p. 15-28, 2002. ISSN 0022-1759.
- ⁷⁵ PEARSE, G. Normal structure, function and histology of the thymus. **Toxicologic pathology**, v. 34, n. 5, p. 504-514, 2006. ISSN 0192-6233.

- 76 HORCAS, I. et al. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Review of scientific instruments**, v. 78, n. 1, p. 013705, 2007. ISSN 0034-6748.
- 77 CODAN, B. et al. Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: an investigation of cell elasticity changes due to fixation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 6, p. 3303-3308, 2013. ISSN 0928-4931.
- 78 SIRGHI, L. et al. Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. **European Biophysics Journal**, v. 37, n. 6, p. 935-945, 2008. ISSN 0175-7571.
- 79 BURNHAM, N. et al. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2002. ISSN 0957-4484.
- 80 ARJONEN, A.; KAUKONEN, R.; IVASKA, J. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. **Cell adhesion & migration**, v. 5, n. 5, p. 421-430, 2011. ISSN 1933-6918.
- 81 GIRASOLE, M. et al. Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 5, p. 1268-1276, 2007. ISSN 0005-2736.
- 82 WU, Y. et al. Membrane surface nanostructures and adhesion property of T lymphocytes exploited by AFM. **Nanoscale research letters**, v. 4, n. 8, p. 942, 2009. ISSN 1556-276X.
- 83 STEVENS, M. J. et al. Oxide-dependent adhesion of the jurkat Line of T Lymphocytes. **Langmuir**, v. 25, n. 11, p. 6270-6278, 2009. ISSN 0743-7463.
- 84 JIN, H. et al. Apoptosis Induction of K 562 Cells by Lymphocytes: An AFM Study. **Scanning: The Journal of Scanning Microscopies**, v. 35, n. 1, p. 7-11, 2013. ISSN 0161-0457.
- 85 LUO, Q. et al. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 9, p. 1953-1960, 2016. ISSN 0304-4165.
- 86 VICENTE-MANZANARES, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 2, p. 110, 2004. ISSN 1474-1741.
- 87 HUANG, X. et al. The influence of aminophylline on the nanostructure and nanomechanics of T lymphocytes: an AFM study. **Nanoscale research letters**, v. 9, n. 1, p. 518, 2014. ISSN 1556-276X.

- 88 CURRY, N. et al. Correlative STED and atomic force microscopy on live astrocytes reveals plasticity of cytoskeletal structure and membrane physical properties during polarized migration. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 104, 2017. ISSN 1662-5102.
- 89 SCHAEFER, A. et al. Actin-binding proteins differentially regulate endothelial cell stiffness, ICAM-1 function and neutrophil transmigration. **J Cell Sci**, v. 127, n. 20, p. 4470-4482, 2014. ISSN 0021-9533.
- 90 ALLINGHAM, J.; KLENCHIN, V.; RAYMENT, I. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 18, p. 2119-2134, 2006. ISSN 1420-682X.
- 91 WILLARD, H. H. et al. Instrumental methods of analysis. 1988.
- 92 SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. Unesp, 1996. ISBN 8571391114.
- 93 MAIMAN, T. Stimulated Optical Radiation in Ruby. **Nature**, v. 187, p. 493-494, 1960. ISSN 0028-0836.
- 94 MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, n. 5, p. 493-541, 2007. ISSN 0570-4928.
- 95 ABRAMCZYK, H.; KOPEĆ, M. Applications of Raman scattering in biomedicine, telecommunication and thermometry. **Measurement Automation Monitoring**, v. 63, 2017. ISSN 2450-2855.
- 96 HUANG, Z. et al. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. **International journal of cancer**, v. 107, n. 6, p. 1047-1052, 2003. ISSN 0020-7136.
- 97 DRESSELHAUS, M. S. et al. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. **Physics reports**, v. 409, n. 2, p. 47-99, 2005. ISSN 0370-1573.
- 98 SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. Princípios de Análise Instrumental, 2002. **Boockman**, v. 60, p. 295-312,
- 99 FREEMAN, S. K. Applications of laser Raman spectroscopy. 1974.
- 100 FENN, M. B. et al. Raman spectroscopy for clinical oncology. **Advances in Optical Technologies**, v. 2011, 2011. ISSN 1687-6393.

- 101 HANLON, E. et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Physics in Medicine & Biology**, v. 45, n. 2, p. R1, 2000. ISSN 0031-9155.
- 102 DOWNES, A.; ELFICK, A. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. **Sensors**, v. 10, n. 3, p. 1871-1889, 2010.
- 103 AFSETH, N. K.; WOLD, J. P.; SEGTMAN, V. H. The potential of Raman spectroscopy for characterisation of the fatty acid unsaturation of salmon. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, n. 1, p. 85-92, 2006. ISSN 0003-2670.
- 104 PAPPAS, D.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D. Raman spectroscopy in bioanalysis. **Talanta**, v. 51, n. 1, p. 131-144, 2000. ISSN 0039-9140.
- 105 NOTINGHER, I. et al. Application of FTIR and Raman spectroscopy to characterisation of bioactive materials and living cells. **Journal of Spectroscopy**, v. 17, n. 2-3, p. 275-288, 2003. ISSN 0712-4813.
- 106 NAUMANN, D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 36, n. 2-3, p. 239-298, 2001. ISSN 0570-4928.
- 107 MIKOLIUNAITE, L. et al. The substrate matters in the Raman spectroscopy analysis of cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 13150, 2015. ISSN 2045-2322.
- 108 BUTLER, H. J. et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. **Nature protocols**, v. 11, n. 4, p. 664, 2016. ISSN 1750-2799.
- 109 FERREIRA, M. et al. Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999. ISSN 0100-4042.
- 110 WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M. Chemometrics, present and future success. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 44, n. 1-2, p. 3-14, 1998. ISSN 0169-7439.
- 111 RENCHER, A. C. **Methods of multivariate analysis**. John Wiley & Sons, 2003. ISBN 0471461725.
- 112 VICINI, L.; SOUZA, A. M. Análise multivariada da teoria à prática. **Santa Maria: UFSM, CCNE**, 2005.
- 113 HAIR, J. F. et al. **Análise multivariada de dados**. Bookman Editora, 2009. ISBN 8577805344.

- 114 BUXANT, F. et al. Preexposure of MCF-7 breast cancer cell line to dexamethasone alters the cytotoxic effect of paclitaxel but not 5-fluorouracil or epirubicin chemotherapy. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 9, p. 171, 2017.
- 115 KIM, Y. S. et al. Dexamethasone Inhibits TRAIL-and Anti-cancer Drugs-induced Cell Death in A549 Cells through Inducing NF- κ B-independent cIAP2 Expression. **Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association**, v. 36, n. 5, p. 330, 2004.
- 116 BONAY, M.; BANCAL, C.; CRESTANI, B. The risk/benefit of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. **Expert opinion on drug safety**, v. 4, n. 2, p. 251-271, 2005. ISSN 1474-0338.
- 117 MASKEY-WARZĘCHOWSKA, M. et al. Acute Response to Cigarette Smoking Assessed in Exhaled Breath Condensate in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Healthy Smokers. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 944, p. 73-80, 2017. ISSN 0065-2598.
- 118 FERGUSON, L. R.; ZHU, S. T.; HARRIS, P. J. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. **Molecular nutrition & food research**, v. 49, n. 6, p. 585-593, 2005. ISSN 1613-4125.
- 119 KILANI-JAZIRI, S. et al. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and p-coumaric phenolic acids: a structure–activity relationship study. **Drug and chemical toxicology**, v. 40, n. 4, p. 416-424, 2017. ISSN 0148-0545.
- 120 LOU, Z. et al. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 550-554, 2012. ISSN 0956-7135.
- 121 NEOG, M. K. et al. p-Coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the rheumatoid arthritis rat model. **BioFactors**, v. 43, n. 5, p. 698-717, 2017. ISSN 1872-8081.
- 122 KIM, W.; LIM, D.; KIM, J. p-Coumaric Acid, a Major Active Compound of Bambusae Caulis in Taeniam, Suppresses Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation. **The American journal of Chinese medicine**, v. 46, n. 02, p. 407-421, 2018. ISSN 0192-415X.
- 123 VICTONI, T. et al. Roflumilast N-oxide prevents cytokine secretion induced by cigarette smoke combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 inhibition in airway epithelial cells. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e85243, 2014. ISSN 1932-6203.
- 124 MATTHEWS, Q. et al. Variability in Raman spectra of single human tumor cells cultured in vitro: correlation with cell cycle and culture confluency. **Applied spectroscopy**, v. 64, n. 8, p. 871-887, 2010. ISSN 0003-7028.

- 125 CAO, A. et al. A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence. **Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering**, v. 38, n. 9, p. 1199-1205, 2007. ISSN 0377-0486.
- 126 NOTINGHER, I. et al. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 72, n. 4, p. 230-240, 2003. ISSN 0006-3525.
- 127 NAWAZ, H. et al. Raman micro spectroscopy study of the interaction of vincristine with A549 cells supported by expression analysis of bcl-2 protein. **Analyst**, v. 138, n. 20, p. 6177-6184, 2013.
- 128 BONNIER, F.; BYRNE, H. Understanding the molecular information contained in principal component analysis of vibrational spectra of biological systems. **Analyst**, v. 137, n. 2, p. 322-332, 2012.
- 129 FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11-19, 2012. ISSN 2211-3207.
- 130 ORGANIZATION, W. H. **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases**. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniases.: World Health Organization, 2010. p.
- 131 GRAEBIN, C. et al. Antiprotozoal agents: an overview. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)**, v. 8, n. 4, p. 345-366, 2009. ISSN 1871-5214.
- 132 MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011. ISSN 0223-5234.
- 133 BOHS, L. Major clades in Solanum based on ndhF sequence data. **Monographs in Systematic Botany**, v. 104, p. 27, 2005. ISSN 0161-1542.
- 134 MILNER, S. E. et al. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from Solanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3454-3484, 2011. ISSN 0021-8561.
- 135 DA SILVA, T. M. S. et al. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero Solanum (Solanaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2003. ISSN 0100-4042.

- 136 SILVA, T.; CARVALHO, M.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.
- 137 SILVA, T. M. S. et al. Distribution of flavonoids and N-trans-caffeoyl-tyramine in *Solanum* subg. *Leptostemonum*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 32, n. 5, p. 513-516, 2004. ISSN 0305-1978.
- 138 VIEIRA JR, G. et al. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 8, p. 892-896, 2003. ISSN 0951-418X.
- 139 HALL, C. A.; HOBBY, T.; CIPOLLINI, M. Efficacy and mechanisms of α -solasonine-and α -solamargine-induced cytolysis on two strains of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of chemical ecology**, v. 32, n. 11, p. 2405-2416, 2006. ISSN 0098-0331.
- 140 ABREU MIRANDA, M. et al. In vitro leishmanicidal and cytotoxic activities of the glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) fruits. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 4, p. 642-648, 2013. ISSN 1612-1872.
- 141 KUO, K.-W. et al. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine: triggering apoptosis in human hepatoma cells. **Biochemical pharmacology**, v. 60, n. 12, p. 1865-1873, 2000. ISSN 0006-2952.
- 142 LIU, L.-F. et al. Action of solamargine on human lung cancer cells—enhancement of the susceptibility of cancer cells to TNFs. **FEBS letters**, v. 577, n. 1-2, p. 67-74, 2004. ISSN 1873-3468.
- 143 BALAÑA-FOUCE, R. et al. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 181, n. 2, p. 85-93, 2012. ISSN 0166-6851.
- 144 NOTINGHER, I.; SELVAKUMARAN, J.; HENCH, L. L. New detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 4, p. 780-789, 2004. ISSN 0956-5663.
- 145 CHOI, S.; JIANG, Z. Cardiac sound murmurs classification with autoregressive spectral analysis and multi-support vector machine technique. **Computers in biology and medicine**, v. 40, n. 1, p. 8-20, 2010. ISSN 0010-4825.

Anexos

▪ Produção científica decorrente desta tese:

[1] M.P. Lins, **E.C.O. Silva**, G.R. Silva, S.T. Souza, N.C. Medeiros, E.J.S. Fonseca, S. Smaniotto. Association between biomechanical alterations and migratory ability of semaphorin-3A-treated thymocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2018, volume 1862, Issue 4, p. 816-824.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.01.001>

[2] **Elaine Cristina Oliveira da Silva**, Flávio Martins dos Santos, Ana Rúbia Batista Ribeiro, Samuel Teixeira de Souza, Emiliano Barreto, Eduardo Jorge da Silva Fonseca. Drug-induced anti-inflammatory response in A549 cells, as detected by Raman spectroscopy: a comparative analysis of the actions of dexamethasone and *p*-coumaric acid. *Analyst*, 2019, volume 144, p. 1622-1631.

<https://doi.org/10.1039/C8AN01887A>

[3] Morgana V. Araújo, Aline C. Queiroz, João F. M. Silva, Amanda E. Silva, João K. S. Silva, Girliane R. Silva, **Elaine C. O. Silva**, Samuel T. Souza, Eduardo J. S. Fonseca, Celso A. Camara, Tania M. S. Silva, Magna S. Alexandre-Moreira. Flavonoids induce cell death in *Leishmania amazonensis*: *in vitro* characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. *Analyst*, 2019, volume 144, p. 5232-5244.

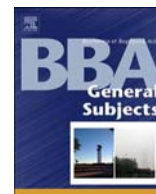
<https://doi.org/10.1039/C9AN00948E>



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

BBA - General Subjects

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



Association between biomechanical alterations and migratory ability of semaphorin-3A-treated thymocytes

M.P. Lins^a, E.C.O. Silva^b, G.R. Silva^b, S.T. Souza^b, N.C. Medeiros^a, E.J.S. Fonseca^b, S. Smaniotto^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, Alagoas, Brazil

^b Grupo de Óptica e Nanoscopia (GON), Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, Alagoas, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Semaphorin-3A
Cell migration
Atomic force microscopy
Nanomechanics

ABSTRACT

Background: Class 3 semaphorins are soluble proteins involved in cell adhesion and migration. Semaphorin-3A (Sema3A) was initially shown to be involved in neuronal guidance, and it has also been reported to be associated with immune disorders. Both Sema3A and its receptors are expressed by most immune cells, including monocytes, macrophages, and lymphocytes, and these proteins regulate cell function. Here, we studied the correlation between Sema3A-induced changes in biophysical parameters of thymocytes, and the subsequent repercussions on cell function.

Methods: Thymocytes from mice were treated *in vitro* with Sema3A for 30 min. Scanning electron microscopy was performed to assess cell morphology. Atomic force microscopy was performed to further evaluate cell morphology, membrane roughness, and elasticity. Flow cytometry and/or fluorescence microscopy were performed to assess the F-actin cytoskeleton and ROCK2. Cell adhesion to a bovine serum albumin substrate and transwell migration assays were used to assess cell migration.

Results: Sema3A induced filopodia formation in thymocytes, increased membrane stiffness and roughness, and caused a cortical distribution of the cytoskeleton without changes in F-actin levels. Sema3A-treated thymocytes showed reduced substrate adhesion and migratory ability, without changes in cell viability. In addition, Sema3A was able to down-regulate ROCK2.

Conclusions: Sema3A promotes cytoskeletal rearrangement, leading to membrane modifications, including increased stiffness and roughness. This effect in turn affects the adhesion and migration of thymocytes, possibly due to a reduction in ROCK2 expression.

General significance: Sema3A treatment impairs thymocyte migration due to biomechanical alterations in cell membranes.

1. Introduction

Semaphorins are members of a large and diverse family of widely expressed, secreted and membrane-associated proteins. These proteins were initially characterized by their role as axon guidance molecules, which are crucial for the development of the nervous system [1]. Although the expression of semaphorins has been described in detail in the nervous system, they are also expressed in most, if not all, tissues [2,3]. Based on their structural features, they are classified into seven classes. Class 3 semaphorins (Sema3) are the only group of secreted soluble proteins in the semaphorin family that are capable of forming steep tissue concentration gradients [4]. Additionally, Sema3 has desirable features from a therapeutic standpoint [5].

It is well known that diverse substances are able to disrupt the architecture of the cytoskeleton, resulting in changes in cellular

mechanical properties such as elasticity, adhesiveness, cell topography, and viscosity. In addition, these alterations can also affect cell behavior [6]. Semaphorins are proteins that can alter the cytoskeletal organization of actin filaments and the microtubule network, both of which are involved in cell migration and cell–cell communication [7].

Several studies examining Sema3-mediated cell morphological changes have been published. For example, Sema3A has been reported to cause disorganization of F-actin, alterations in cellular morphology, and an increase in endothelial permeability [8]; inhibition of glomerular $\alpha\beta3$ integrin activity, and modifications to podocyte shape [9]; and to promote contraction of actomyosin at the trailing edge of migrating dendritic cells [10]. Furthermore, another class 3 member, Sema3C, induces the directional migration of mouse glomerular endothelial cell and formation of a capillary-like network [11]. Few studies have addressed the biophysical changes that semaphorins induce in

* Corresponding author at: Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, CEP 57072-970 Maceió, Alagoas, Brazil.
E-mail address: smaniotto@icbs.ufal.br (S. Smaniotto).





cells [12,13].

Recently, several methods, including atomic force microscopy (AFM) have been developed to characterize cells mechanically and physically. The advent of AFM [14] provides a tool for measuring nanostructural details and the biomechanical properties of biological samples, ranging from single molecules to living cells, allowing them to be visualized and manipulated. The biomechanical properties of cells are crucial to a number of biological processes such as cell development [15], division [16], migration [17–19], differentiation [20], and tissue homeostasis [21]. In addition, studies on biophysical properties, such as morphology, elasticity, nanostructure, adhesive forces, and stiffness of cells have provided fundamental insights into their structures and biological functions [22]. AFM is one of the most versatile techniques that provides a multi-faceted platform for the study of biophysical properties in cell biology.

In this study, using AFM and adhesion and migration functional assays, we investigated the effects of Sema3A on thymocytes *in vitro*. To our knowledge, this is the first study to report the relation between Sema3A-mediated alterations in biophysical properties and changes in the adhesion and migration of thymocytes.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatment

Fresh thymocytes were obtained from 4 to 6-week-old C57BL/6 mice. After euthanasia, the thymi of animals were aseptically removed and mechanically dispersed to release the thymocytes. These cells were maintained at 4 °C in complete medium (RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, and 1% penicillin/streptomycin (all from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) until use in experiments. All animal procedures were approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Alagoas (Protocol 14/2015).

Recombinant mouse semaphorin-3A (R&D Systems, Lille, France), was used at a concentration of 100 ng/mL to treat thymocytes for 30 min [23] in a media comprising of 2% FBS/RPMI 1640 at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, prior to biophysical measurements or functional evaluations.

2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM was conducted using a Superscan SSX-550 (Shimadzu, Japan) electron microscope. To acquire the SEM images, circular slides were coated with 0.1% bovine serum albumin (BSA) diluted in phosphate buffered saline (PBS) for 1 h at 37 °C. Following this, the thymocytes (5×10^6) were cultured on these slides in 24-well plates. After 30 min of exposure to Sema3A, cells were fixed with a 0.5% glutaraldehyde solution. Images were collected in low-vacuum mode with a large field secondary electron detector. Prior to analysis, the samples were sputtered with gold for 10 s. Image acquisition used an accelerating voltage of 15 kV [22]. SEM analysis with 2000 × and 6000 × magnification was performed to study the thymocyte surface morphology. For each SEM image, the number of cells with or without filopodia, eight to ten cells per field, was counted. Ten SEM images/group were evaluated.

2.3. AFM measurements

Similar to SEM analysis, for AFM measurements, thymocytes were cultured on circular coverslips and exposed to Sema3A for 30 min prior to measurement. All thymocyte morphology images and elasticity measurements were obtained using a standard AFM setup (Multiview 1000™, Nanonics, Israel), with a combined optical microscope (BAXFM, Olympus, Japan). This combination permitted lateral positioning of the AFM tip over the nuclear region of the cell with micrometer-scale precision. The AFM system was acoustically isolated to reduce any

interference by ambient noise during the measurements, and the instrument was secured on an active damping table to suppress mechanical noise.

Cell topography was imaged (256 × 256 pixels) in tapping mode with a scan rate of 0.3–1 Hz. More than 30 cells were imaged by AFM for each sample. The roughness of individual cell membranes of Sema3A-treated or -untreated cells, was analyzed using WSxM software [24], through the parameters of average (R_a) and root mean square (R_{rms}) of roughness of each sample. The derived values can be assumed as representing reliable parameters related to the surface roughness of the membranes [25].

Sneddon's modification of the Hertzian model was used to characterize the force-distance curve to obtain the elastic indentation of the cells [26–28]. This model predicts a relation between the force and indentation depth of a soft sample; by fitting the Hertz model to the data, we calculated the local average Young's modulus of the sample. Analysis of the force-distance curves and the applicability of this model have been described in great detail in previous work [22,29,30]. All force-distance curve experiments were performed at the nuclear region of the cells. It is important to note that measurements taken around the nucleus, where the cells are thicker, are less prone to artifacts because of the hardness of the substrate [31,32]. The AFM experiments were performed using a scanning tip with a typical radius of curvature < 20 nm, a 320-μm-long cantilever, a spring constant of < 1 N/m, and a nominal frequency of 35 kHz. The spring constant cantilever was calibrated by fitting the power spectrum to a simple harmonic oscillator [33] and a maximum indenting force for the cantilever was set at 20 nN. All force-distance curve measurements were performed by moving the sample toward the cantilever tip with a constant load speed of 5 μm/s. Over 80 force-distance curves were acquired for each group of cells (treated with or without Sema3A). All force-distance curve experiments were performed with the same tip.

2.4. Cytoskeleton staining assay

Thymocytes (5×10^6) were treated with Sema3A as described above. Treatment was terminated by rapid centrifugation, and the media was discarded. The cells were immediately fixed and permeabilized with Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences, South San Francisco, CA, USA) on ice. After 20 min, FITC-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to the fixed cells, which were then stained for a further 30 min in the dark. Following this, the fluorescence intensity was quantified using a flow cytometer FACSCanto II device (BD Biosciences). A gate excluding cell debris and nonviable cells was applied using the forward *versus* side scatter parameters pre-established for thymocytes. Analysis with FACSDiva software (BD Biosciences) was performed after recording 20,000 events for each sample. In addition, cell samples were analyzed and photographed using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 50i; Nikon Instruments Inc., Chicago, IL, USA).

2.5. Cell adhesion assay

To assess thymocyte adhesive capacity, 6-well culture plates were coated for 1 h at room temperature with 0.1% BSA/PBS. In these assays, 10^7 fresh thymocytes (previously treated with Sema3A or not) were allowed to adhere onto the substrata for 1 h, in 3 mL 2% FBS/RPMI 1640, at 37 °C. After removal of non-adherent thymocytes by washing with PBS, adherent thymocytes were harvested with cooled PBS and counted using a hemocytometer [34].

2.6. Thymocyte migration assay

Thymocyte migratory activity was assessed *ex vivo* in 5-μm pore-size trans-well plates (Corning Costar, Lowell, MA, USA), as previously

described [23,35]. In this chemotaxis assay, membranes were coated on both sides with 0.1% BSA/PBS for 1 h at 37 °C. Thymocytes (2.5×10^6), preincubated with or without Sema3A for 30 min, were plated in the upper chamber in 100 μ L 1% BSA/RPMI 1640, after which 600 μ L of 1% BSA/RPMI 1640 was added to the lower chamber. After 3 h of incubation at 37 °C in 5% CO₂-containing air, cells that had migrated into the lower chamber were harvested and counted with a hemocytometer.

2.7. Intracellular ROCK2 staining

For staining of intracellular ROCK2, cells (10^6) were stimulated or not with Sema3A for 30 min at 37 °C, then medium was discarded by centrifugation. The thymocytes were fixed and permeabilized by treatment with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, South San Francisco, USA) for 20 min. After washing with PBS, the cells were stained with an anti-ROCK2 antibody (Abcam, Cambridge, UK). This primary antibody was then detected using a GAR-FITC (Milipore, Massachusetts, USA) labeled secondary antibody for 1 h. Cells were then analyzed by flow cytometry using a FACSCanto II device (BD Biosciences). Fluorescence intensity was quantified from 20,000 events for each sample.

2.8. MTT assay for assessing cell viability

Thymocytes (10^6) were cultivated in 96-well plates using 2% FBS/RPMI 1640 medium containing Sema3A at 50, 100, and 200 ng/mL for 30 min. After treatment, the cells were incubated with 5 mg/mL of tetrazolium salt (MTT) (Sigma-Aldrich) diluted in 2% FBS/RPMI 1640. The cells were maintained in an incubator at 37 °C for 4 h. The reduction of MTT by the metabolically active cells formed formazan crystals, which were then solubilized by the addition of DMSO (Sigma-Aldrich). The absorbance of the formazan solution in DMSO was measured using a spectrophotometer at 540 nm (TP-Reader-Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China) [36].

2.9. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). To show that all data were normally distributed, a Kolmogorov-Smirnov test was performed, and the statistical significance of differences in the modulus of elasticity between two groups of cells was assessed using a two-sample independent Student's *t*-test at 95% confidence level ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Morphological changes in Sema3A-treated thymocytes

Initially, we investigated whether Sema3A can have effects on thymocyte morphology. This cell type was chosen owing to its availability and abundance in various organisms, in addition to its important role in maintaining homeostasis [37,38]. It is important to note that semaphorins reportedly influence cellular morphology in a large variety of systems [39]; however, there are no data reporting their effects on thymocyte morphology.

To address this question, we used SEM to evaluate morphological alterations in Sema3A-treated thymocytes. Analysis of the images acquired by SEM of Sema3A-treated thymocytes revealed that the thymocyte membrane exhibited undulations and showed clear extensions of the filopodia toward the substratum. Interestingly, Sema3A-treated cells had a higher number of filopodia, indicating Sema3A induces morphological changes in thymocytes (Fig. 1A).

The number of cells with or without filopodia visible in each SEM image was counted. In the control group, there were more cells without filopodia whereas in Sema3A group, there was a prevalence of cells

with filopodia (Fig. 1B). In addition, when the number of filopodia per cell were evaluated, it was observed that cells in the Sema3A group had the average of 1.98 filopodia/cell while in the control group the average was 0.76 filopodia/cell. Therefore, Sema3A induces the formation of filopodia in thymocytes.

3.2. Sema3A modifies the biomechanical properties of the cell membrane

With the aim of obtaining a more detailed morphological analysis, we employed AFM, a powerful tool that can be used to observe nanostructural characteristics and biomechanical properties of biological samples including cells, biomolecules, and biomaterials [40,41]. Previous reports have shown that thymocytes can be assessed by AFM [42–44], although these studies did not examine the effects of Sema3A.

Cellular morphology, including cell membrane features, can be observed in AFM images. Thymocytes without treatment (control) exhibited a rounded shape with a smooth surface, whereas cells treated with Sema3A displayed an elongated shape, a rougher surface, and the presence of branched structures (filopodia), confirming our previous SEM results (Fig. 2).

In addition to morphology, other biophysical properties of cells (such as elasticity, nanostructure, adhesion force, stiffness, and others) provide fundamental insights into cellular function [45]. AFM can address each of these features. In this study, we focused on the assessment of membrane roughness and thymocyte elasticity. Both of these are hallmarks that can be used to infer the physiological and/or diseased state of cells [46].

The roughness analysis was based on calculating the height distribution of the plasma membrane in AFM images of thymocytes treated or not with Sema3A. Fig. 3 shows a histogram of the distribution of the roughness measure for thymocytes. Here, the R_a and R_{rms} values of average roughness for thymocytes were obtained from normal distribution fits of the total histogram composed of all values determined for all cells. For cells without Sema3A treatment (control), the R_a value was 64.4 ± 11.5 nm and the R_{rms} value was 78.5 ± 11.4 nm. For cells treated with Sema3A, the R_a and R_{rms} values increased to 76.3 ± 13.7 nm and 93.0 ± 14.1 nm, respectively. Therefore, this roughness analysis showed that cells treated with Sema3A have higher R_a and R_{rms} (greater roughness) values than untreated cells. Overall, Sema3A increased the roughness of thymocyte membranes, causing an approximately 18% increase in both R_a and R_{rms} compared to that of control thymocytes.

To quantify how Sema3A treatment affects the mechanical properties and organization of the cytoskeleton, we used AFM nano-indentation measurements to evaluate the Young's modulus values of Sema3A-treated or untreated thymocytes. To achieve this, we fitted the Hertz model to the force-displacement curves. As a result, control thymocytes exhibited a Young's modulus of 37.2 ± 9.5 kPa. In contrast, the average Young's modulus of cells treated with Sema3A was 47.2 ± 11.3 kPa, revealing an increase of 26.9% in the average elastic modulus as compared to untreated cells (Fig. 4). Sema3A, therefore, increases thymocyte stiffness after 30 min of exposure. These AFM data are pertinent because they relate the elasticity and roughness of cell membranes with cytoskeletal alterations, since previous research has shown that mechanical properties are associated with the cytoskeleton [47–49].

3.3. Sema3A triggers F-actin cytoskeleton reorganization

To determine whether significant differences in the cellular mechanics of thymocytes arise from different cytoskeletal organizations, we used flow cytometry and immunofluorescence to analyze the cytoskeleton through quantification and structural arrangement investigation, respectively. The median fluorescence intensity for F-actin in both groups was the same (Fig. 5A and B), implying that Sema3A does not induce additional F-actin fibers in the cytoplasm of thymocytes

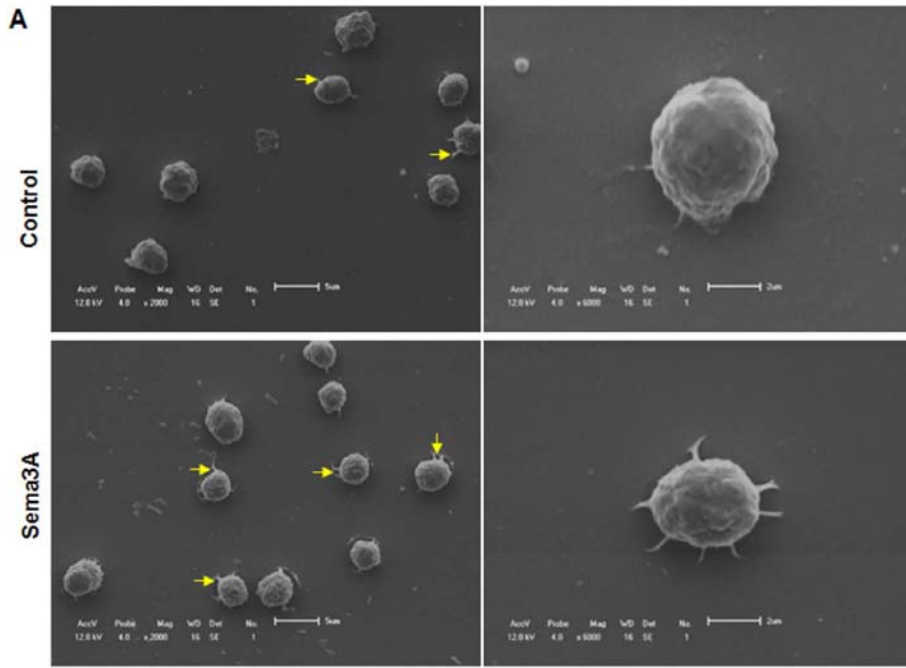


Fig. 1. Sema3A-induced alterations in thymocyte morphology. Fresh thymocytes were treated with Sema3A for 30 min, fixed, and photographed by scanning electron microscopy (SEM). (A) Representative SEM images show that the treated cells displayed undulations in the membrane and filopodia emergence toward the substrate (indicated by yellow arrows). Original magnification 2000 × (left) and 6000 × (right). (B) The graph bars represent mean ± SD of the number cells with or without filopodia per field. Three independent experiments were repeated to generate these results, $n = 3$ in each group and $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

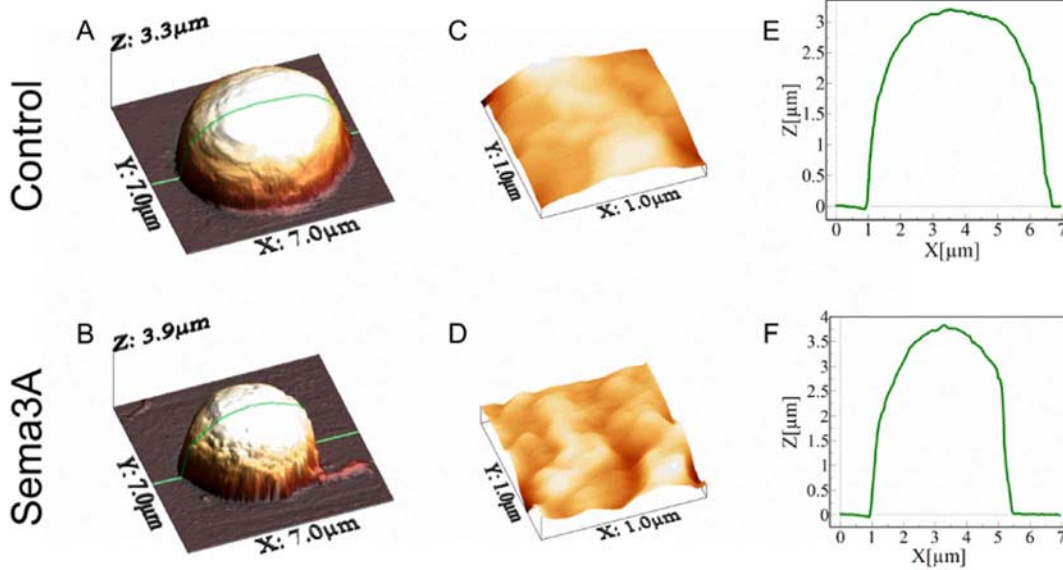
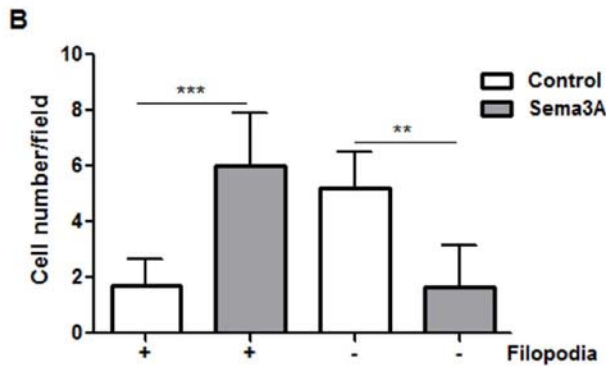


Fig. 2. Representative AFM topography images of thymocytes. AFM images of thymocytes (A) without treatment (control) and (B) treated with Sema3A. (C-D) Magnified view of the nuclear region of both cell surfaces. (E-F) Height profiles were taken along the green lines in (A-B). In each slide, > 30 cells were analyzed. These values are indicative of control and treated cells.

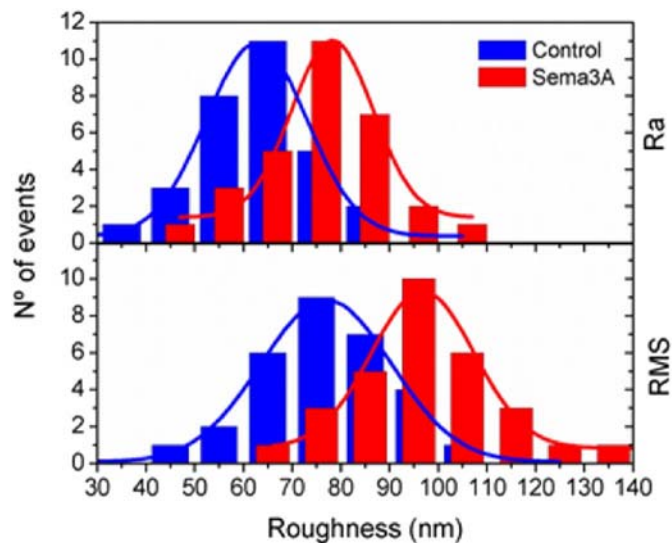


Fig. 3. Roughness distribution. Histograms of the distributions of the R_{rms} and R_a roughness values calculated for thymocytes. The normal distribution curve fits are shown (solid curves).

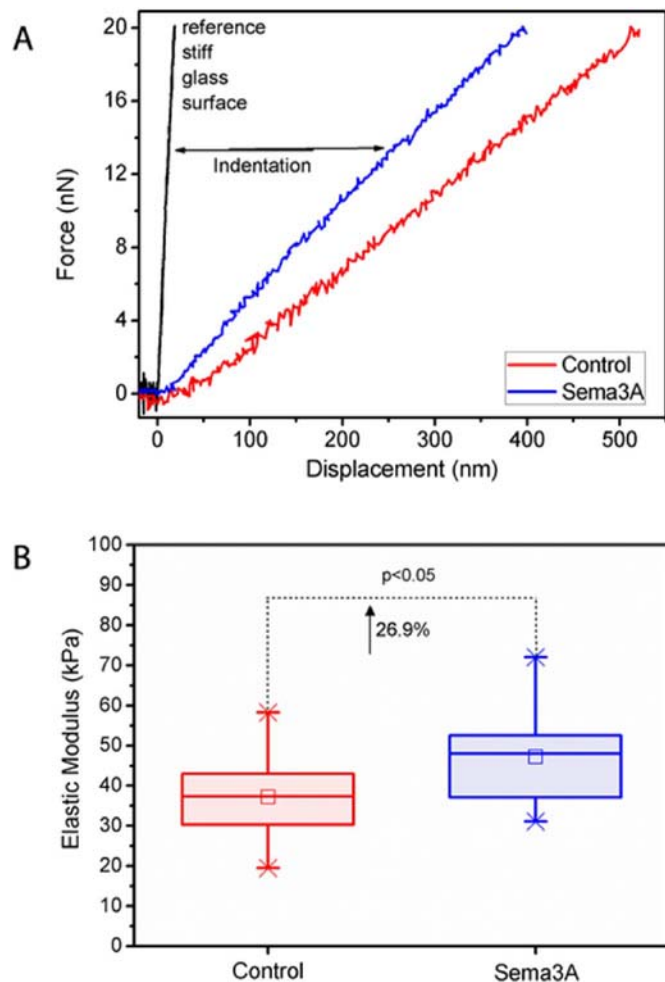


Fig. 4. Elastic modulus of the untreated thymocytes (control) and Sema3A-treated thymocytes. (A) Example of the force-distance curves generated using AFM. (B) Box plots of Young's moduli of thymocytes without treatment (control) and with Sema3A treatment. The average Young's modulus is shown by the horizontal line within each box.

or that Sema3A does not promote actin polymerization. The F-actin content was equivalent between the shorter (15 min) and longer (60 min) periods of treatment (data not shown), confirming that Sema3A does not have any effect on F-actin polymerization and expression.

Nevertheless, immunofluorescence analysis showed a new rearrangement of F-actin in the cortical layer of the cytoplasm induced by Sema3A treatment. In this group of cells, F-actin was found to be densely packed close to the cell membrane (indicated by yellow arrows in Fig. 5C), revealing a greater brightness in the images (see the inserts in Fig. 5C), and also showed evidence of short protrusions (filopodia, as also shown Figs. 1 and 2). Thus, Sema3A appears to preserve the amount of F-actin, and it mediates the organization and accumulation of F-actin at the cortical layers in the thymocyte cytoplasm.

By examining the morphology, membrane biomechanical properties, and cytoskeletal arrangements of thymocytes, we found that these cellular features are modulated by Sema3A. However, it is also known that the actin cytoskeleton is involved in several cellular activities, such as the maintenance of cell adhesion and migration [50]. Therefore, these aspects of cell function were also examined.

3.4. Repercussions of Sema3A-induced morphological changes on thymocyte function and the role of the rho/ROCK pathway

Cell adhesion (comprised of cell-cell and cell-matrix interactions) is critical for embryonic development, tissue remodeling, cell migration, and other homeostatic processes [51]. Cell adhesion is highly dependent on cytoskeletal changes. If Sema3A is able to alter the conformation of F-actin, we subsequently investigated the repercussions of these changes on thymocyte adhesion and migration.

To establish a functional assay, as thymocytes are normally non-adherent on untreated culture plates, we utilized a non-related protein (BSA) as a substratum to allow thymocytes to adhere and migrate. To determine whether Sema3A participates in thymocyte adhesion to this BSA substrate, we pre-incubated thymocytes with Sema3A. There was a 42.1% inhibition of thymocyte adhesion in Sema3A-treated cells (Fig. 6A). This was also evident by the larger number of thymocytes found in the supernatant of Sema3A cell cultures that were unable to establish firm adhesion to the BSA substrate. In accordance with these anti-adhesive effects of Sema3A on thymocytes, we investigated whether Sema3A could affect cell migration. Pre-incubation of thymocytes with Sema3A induced a 44.15% decrease in cell migration compared with that observed for thymocytes incubated with only BSA (Fig. 6B).

To understand why the adhesive and migratory capacities of thymocytes are reduced by Sema3A, we investigated the role of the Rho/ROCK pathway. The Rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 are serine/threonine kinases that are downstream targets of the small GTPases RhoA, RhoB, and RhoC. ROCKs are involved in a diverse range of cellular activities, including actin cytoskeleton organization, cell adhesion and motility, proliferation, and apoptosis [52]. We quantified the level of ROCK2 after exposure of thymocytes to Sema3A for 30 min. We observed a 13% reduction in the cytoplasmic levels of this protein (Fig. 6C and D), which may explain, at least in part, the attenuation of the migratory function of thymocytes observed following Sema3A treatment. These data strongly imply that the initial changes stimulated by Sema3A in thymocytes result in a decrease in the cells' functional abilities, mediated in part by the Rho/ROCK2 pathway.

3.5. Cell viability remains unaffected by Sema3A treatment

Some hormones, such as corticosteroids, can lead to apoptosis in certain cells (e.g., thymocytes), whereas other cells may be unaffected or even stimulated [53]. To reject the hypothesis that Sema3A has apoptotic effects on thymocytes, leading to the loss in cell adhesion and migration, we assessed thymocyte viability following Sema3A treatment. As expected, the thymocytes remained viable even after exposure

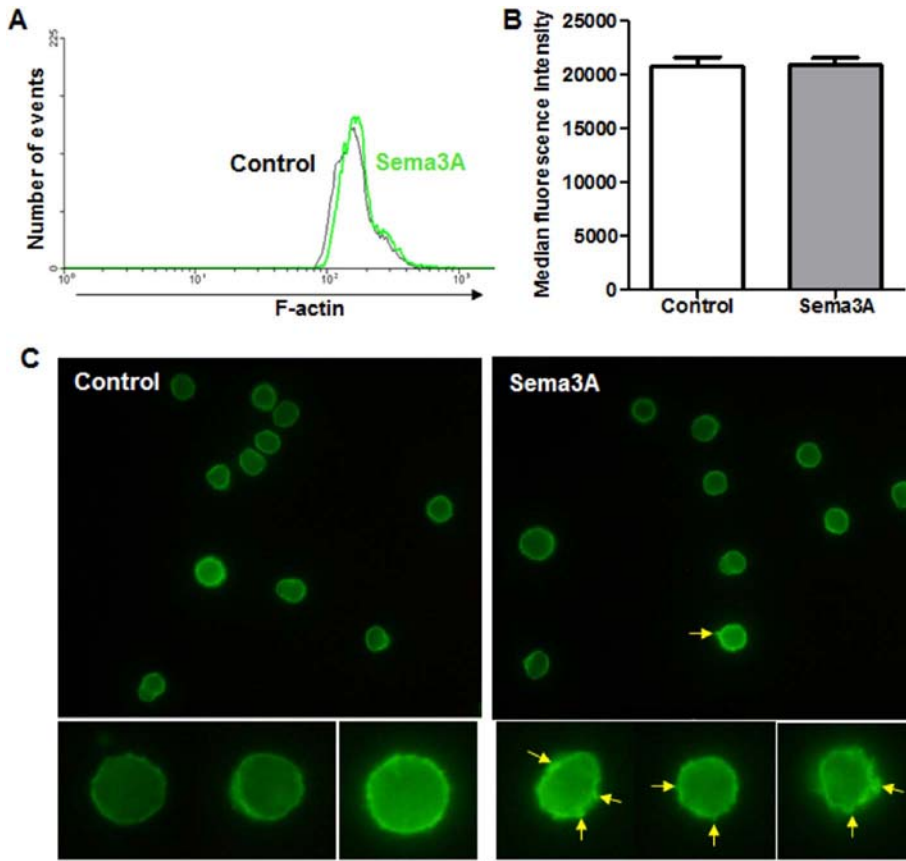


Fig. 5. Sema3A triggers F-actin cytoskeleton reorganization. Cells were permeabilized and stained with phalloidin, which binds to cytoskeletal F-actin. The cells were analyzed by cytofluorimetry and fluorescence microscopy. (A) Histogram showing the median fluorescence intensities. The black curve represents the control cells and the green curve represents the Sema3A-treated cells. (B) Results of cytometry, showing the mean \pm SD for both groups of cells (20,000 events each), confirming that Sema3A maintains F-actin abundance in the thymocyte cytoplasm. (C) F-actin staining showing cortical distribution of the cytoskeleton, which was enhanced in Sema3A-treated cells. The insets show F-actin clusters (yellow arrows) in thymocytes treated with Sema3A. (Magnification: \times 1000).

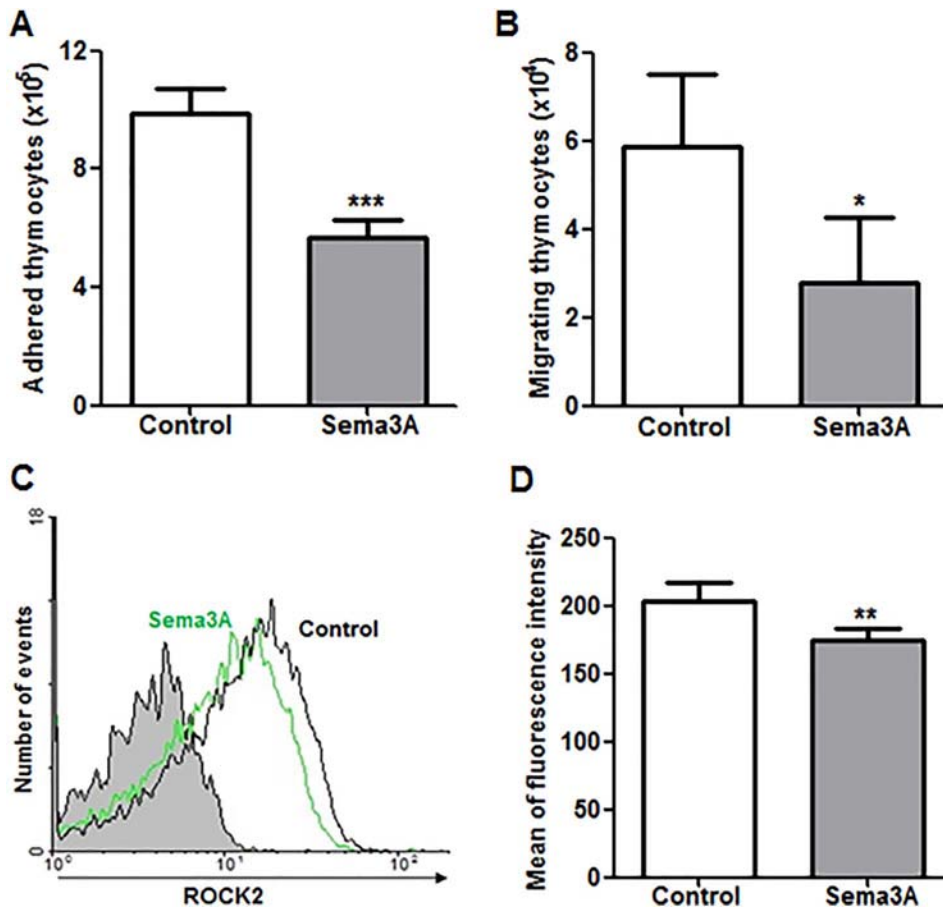


Fig. 6. Sema3A decreased *ex vivo* thymocyte adhesion and migration via ROCK2. (A) Lower adhesive capacity of thymocytes pre-treated with Sema3A after 1 h of adhesion to BSA as substrate. (B) Reduced number of migratory thymocytes in the Sema3A group after 3 h of spontaneous migration in transwell inserts. (C) Representative histogram showing ROCK2 levels in thymocytes exposed to Sema3A, measured by cytofluorimetry. The black curve indicates the control cells and the green curve indicates the Sema3A-treated cells. (D) ROCK2 fluorescence intensity showing reduced expression in Sema3A-treated cells. Data are shown as means \pm SD, for three independent experiments, with $n = 5$. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

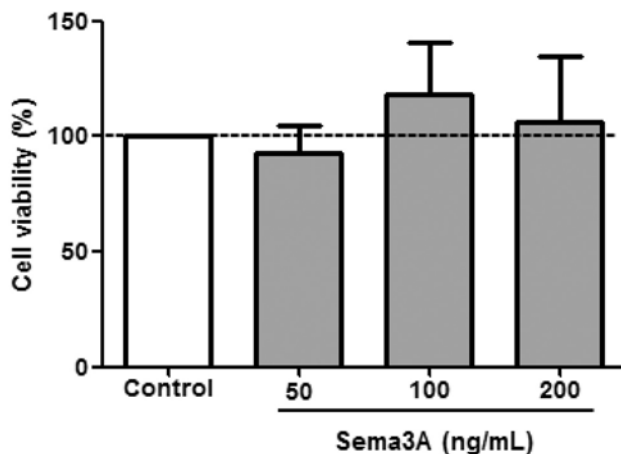


Fig. 7. Exposure to Sema3A does not alter thymocyte viability. The effect of Sema3A on thymocyte viability was assessed using an MTT assay. After treatment for 30 min, the cells were incubated with 5 mg/mL MTT for 4 h. Cell viability is shown as a percentage compared to the control cells. Data are shown as means \pm SD, with $n = 5$.

to Sema3A, including treatment with either lower (50 ng/mL) or higher (200 ng/mL) doses (Fig. 7), refuting the explanation that the reduction in thymocyte functionality is due to cell death.

4. Discussion

Secreted semaphorin, Sema3A, is a dimer, and dimerization is important for its biological activity. The dimerization is mediated through its receptor Neuropilin-1 (Nrp-1), which is located on cell membranes. However, Nrp-1 has a short cytoplasmic tail that lacks signaling capability. In order to transduce signals, Nrp-1 interacts with plexins through their cytoplasmic domains. Beyond this, the signal transduction cascades used by semaphorins are poorly understood, perhaps because their effects on cellular processes are highly diverse [54].

In this study, we treated thymocytes with Sema3A *in vitro*. It is known that up to 95% of these cells contain cytoplasmic Sema3A [23], and approximately 88% express its receptor [55]. This is indicative of the normal physiological functions that Sema3A/Nrp-1 exert in thymocytes. This is the first report describing the morphological changes that occur in thymocytes exposed to Sema3A. Mainly, the cells adopted a phenotype indicative of activated cells and presented membrane filopodia.

Filopodia are plasma membrane protrusions that are often referred to as being “finger-like.” They are formed by 10 or more tightly bundled, parallel actin filaments, with their barbed ends facing toward the plasma membrane. The polymerization of filaments at the leading edge of the filopodia drives their protrusion. These structures are important for many essential cellular processes such as cell adhesion, migration, angiogenesis, and cell-cell contact formation [56].

In neurons, Sema3A signaling through RhoA/ROCK mediates growth cone collapse and axon retraction, accompanied by a decrease in the area of the lamellipodium veils and disassembly of the filopodia [57]. In contrast, in thymocytes, Sema3A leads to the opposite effect, that is, the emergence of filopodia. These data further support the notion that the molecular mechanisms by which semaphorins mediate their functional effects are diverse, and not well understood [7]. We hypothesize that the presence of the Nrp-1 co-receptor plexin-A1, which is constitutively expressed in thymocytes, and its signaling activity, could explain this controversial result.

Surface roughness is an important quantitative parameter for characterizing and/or comparing surfaces, and it can be used to examine the morphology of biological membranes. Moreover, the roughness of the plasma membrane, which is independent of the cell's overall shape, *i.e.*, the three-dimensional arrangement of the membrane

at the submicron scale can be decoupled from the overall cellular shape, is a morphological parameter at the nanometer scale [58]. With respect to this, numerous different studies have related changes in membrane roughness to biological functions in cells. For example, after activation, human peripheral blood T-lymphocytes have a higher average roughness than resting cells [45], and the chemical composition and charge of the substrata can alter cell roughness [59]. Furthermore, contact between tumor cells and lymphocytes reduces the roughness of both cell types [60].

The results of this study indicated there was an enhancement in thymocyte roughness triggered by Sema3A. Intuitively, membrane topography should be sensitive to changes in physical or chemical factors in the microenvironment. For example, this is important for modulating cell behavior in the context of the whole organism, or during an immune response. Subsequent investigations are required to confirm this cellular parameter as a microenvironment sensor or a pathological marker.

Elasticity is a vital mechanical property of cells that has been extensively studied in recent years, especially because of its correlation with cell motility. Increased cell motility is usually a result of lower elasticity, which favors the deformation of cells during migration or invasion, (reviewed in [61]). It has been reported that cancerous cells are softer than their benign counterparts. This opens up the prospect of using this parameter in clinical studies as an early diagnostic biomarker of cancer. The potential for translation of these initial observations into clinical applications remains an open avenue for future studies.

The higher Young's modulus measures seen in Sema3A-treated thymocytes are in agreement with the reduced migratory capacity. The Young's moduli obtained from treated or non-treated cells do not provide information about the cell membrane alone, but also provide data about other membrane and subcellular components such as organelles, cytoskeleton, and the nucleus. Among these, there is a consensus that the cytoskeleton is crucial in determining cell elasticity and motility [62]. In this respect, we examined the actin cytoskeleton in thymocytes. We found that Sema3A induced a new cytoskeleton arrangement in thymocytes: F-actin was found to be cortically distributed and displayed greater brightness near the membrane as seen by immunofluorescence images. Thus, the increased elasticity observed may arise as a result of the reorganization of the cytoskeleton. It is well-known that cells largely rely on the cytoskeleton to maintain their basic morphology and functions [63].

Cell adhesion and migration require dynamic remodeling of the cytoskeleton. Semaphorins have been described to participate in both cell adhesion and migration [12,64,65]. In particular, studies have shown that in the immune system, Sema3A influences the migration of human thymocytes [23,66] and dendritic cells [67]. We have shown that pre-incubation of thymocytes with Sema3A resulted in a 42% inhibition of thymocyte adhesion to the substrate. It is noteworthy that these inhibitory effects of Sema3A have also been seen for thymocyte adhesion to thymic epithelial cells [23]. Interestingly, from the data obtained in this study, Sema3A not only reduces thymocyte adhesion but also inhibits thymocyte migration by 44%. Thus, we suggest that Sema3A inhibits thymocyte migration by altering the stiffness and roughness of the cell membrane due to changes in the cytoskeleton. Further studies are required to improve our understanding of this interesting process.

ROCK1 and ROCK2 are downstream effectors of the Rho subfamily of small GTPases. They are activated by interaction with Rho GTPases, and they are involved in a number of pathways to regulate the actin cytoskeleton; therefore, they indirectly regulate cell migration and cell-cell adhesion [68]. Distinctions between the ROCKs have been only rarely drawn; ROCK1 has been reported to be important for stress fiber formation, whereas ROCK2 controls cortical contractility of cytoskeleton [69].

For this reason, we chose to investigate ROCK2 expression in the thymocytes, as cortical F-actin was modulated by Sema3A. It was found

that there is a reduction in the level of this protein, which perhaps brings us closer to elucidating the mode of action of Sema3A in thymocytes. We cannot rule out the possibility that the other intracellular pathways may also be involved in the Sema3A-induced reduction of thymocyte functions. In particular, changes in the expression of ROCK1 should be further investigated.

In conclusion, our study has explored the biophysical effects of Sema3A on thymocytes *in vitro*, and identified mechanistic changes and their repercussions on cell function. We propose that, initially, Sema3A signaling induces changes in ROCK2 expression, which leads to cytoskeletal reorganization. This alters membrane properties, resulting in lower adhesion and migration of thymocytes. Taking into account the context of this cell in its microenvironment in the organism, this information is relevant to understanding the action of Sema3A in other cellular models.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.01.001> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

This study was funded by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Foundation for Funding Research in the State of Alagoas (Fapeal) and Brazilian National Coordination for Advancement of University Personnel (CAPES).

References

- [1] A.L. Kolodkin, D.J. Matthes, C.S. Goodman, The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules, *Cell* 75 (1993) 1389–1399.
- [2] T. Worzfeld, S. Offermanns, Semaphorins and plexins as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 603–621.
- [3] Y. Zhou, R.A. Gunput, R.J. Pasterkamp, Semaphorin signaling: progress made and promises ahead, *Trends Biochem. Sci.* 33 (2008) 161–170.
- [4] A.L. Kolodkin, D.V. Levengood, E.G. Rowe, Y.-T. Tai, R.J. Giger, D.D. Ginty, Neuropilin is a semaphorin III receptor, *Cell* 90 (1997) 753–762.
- [5] P. Nasarre, R.M. Gemmill, H.A. Drabkin, The emerging role of class-3 semaphorins and their neuropilin receptors in oncology, *Onco. Targets Ther.* 7 (2014) 1663–1687.
- [6] E. Moeendarbary, A.R. Harris, Cell mechanics: principles, practices, and prospects, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 6 (2014) 371–388.
- [7] U. Yazdani, J.R. Terman, The semaphorins, *Genome Biol.* 7 (2006) 211.
- [8] S.T. Hou, L. Nilchi, X. Li, S. Gangaraju, S.X. Jiang, A. Aylsworth, R. Monette, J. Slinn, Semaphorin3A elevates vascular permeability and contributes to cerebral ischemia-induced brain damage, *Sci. Rep.* 5 (2015) 7890.
- [9] A. Tufro, Semaphorin3a signaling, podocyte shape, and glomerular disease, *Pediatr. Nephrol.* 29 (2014) 751–755.
- [10] H. Takamatsu, N. Takegahara, Y. Nakagawa, M. Tomura, M. Taniguchi, R.H. Friedel, H. Rayburn, M. Tessier-Lavigne, Y. Yoshida, T. Okuno, M. Mizui, S. Kang, S. Nojima, T. Tsujimura, Y. Nakatsuji, I. Katayama, T. Toyofuku, H. Kikutani, A. Kumanogoh, Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 594–600.
- [11] N. Banu, J. Teichman, M. Dunlap-Brown, G. Villegas, A. Tufro, Semaphorin 3C regulates endothelial cell function by increasing integrin activity, *FASEB J.* 20 (2006) 2150–2152.
- [12] A. van Rijn, L. Paulis, J. te Riet, A. Vasaturo, I. Reinieren-Beeren, A. van der Schaaf, A.J. Kuipers, L.P. Schulte, B.C. Jongbloets, R.J. Pasterkamp, C.G. Figdor, A.B. van Spriel, S.I. Buschow, Semaphorin 7A promotes chemokine-driven dendritic cell migration, *J. Immunol.* 196 (2016) 459–468.
- [13] C. Vodouhe, M. Schmittbuhl, F. Boulmedais, D. Bagnard, D. Vautier, P. Schaaf, C. Egles, J.C. Voegel, J. Ogier, Effect of functionalization of multilayered polyelectrolyte films on motoneuron growth, *Biomaterials* 26 (2005) 545–554.
- [14] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930–933.
- [15] E. Paluch, C.P. Heisenberg, Biology and physics of cell shape changes in development, *Curr. Biol.* 19 (2009) R790–799.
- [16] U.S. Eggert, T.J. Mitchison, C.M. Field, Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 543–566.
- [17] J. Guck, F. Lautenschlager, S. Paschke, M. Beil, Critical review: cellular mechanobiology and amoeboid migration, *Integr. Biol.* 2 (2010) 575–583.
- [18] T. Lammerrmann, M. Sixt, Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009) 636–644.
- [19] M.L. Gardel, I.C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus, C.M. Waterman, Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 (2010) 315–333.
- [20] D.E. Discher, D.J. Mooney, P.W. Zandstra, Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells, *Science* 324 (2009) 1673–1677.
- [21] D.E. Discher, P. Janmey, Y.L. Wang, Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Science* 310 (2005) 1139–1143.
- [22] S.T. Souza, L.C. Agra, C.E. Santos, E. Barreto, J.M. Hickmann, E.J. Fonseca, Macrophage adhesion on fibronectin evokes an increase in the elastic property of the cell membrane and cytoskeleton: an atomic force microscopy study, *Eur. Biophys. J.* 43 (2014) 573–579.
- [23] Y. Lepelletier, S. Smaniotto, R. Hadj-Slimane, D.M. Villa-Verde, A.C. Nogueira, M. Dardenne, O. Hermine, W. Savino, Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 5545–5550.
- [24] I. Horcas, R. Fernandez, J.M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A.M. Baro, WSM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Rev. Sci. Instrum.* 78 (2007) 013705.
- [25] A. Kakaboura, M. Fragouli, C. Rahiotis, N. Silikas, Evaluation of surface characteristics of dental composites using profilometry, scanning electron, atomic force microscopy and gloss-meter, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 155–163.
- [26] I.N. Sneddon, The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile, *Int. J. Eng. Sci.* 3 (1965) 47–57.
- [27] H. Hertz, Uber den kontakt elastischer korper, *J. Reine Angew. Math.* 92 (1881) 245–260.
- [28] K.L. Johnson, *Contact Mechanics*, Cambridge University Press, 1987.
- [29] M. Lekka, D. Gil, K. Pogoda, J. Dulinska-Litewka, R. Jach, J. Gostek, O. Klymenko, S. Prauzner-Bechcicki, Z. Stachura, J. Wiltowska-Zuber, K. Okon, P. Laidler, Cancer cell detection in tissue sections using AFM, *Arch. Biochem. Biophys.* 518 (2012) 151–156.
- [30] R.E. Mahaffy, S. Park, E. Gerde, J. Kas, C.K. Shih, Quantitative analysis of the viscoelastic properties of thin regions of fibroblasts using atomic force microscopy, *Biophys. J.* 86 (2004) 1777–1793.
- [31] B. Codan, V. Martinelli, L. Mestroni, O. Sbaizero, Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: an investigation of cell elasticity changes due to fixation, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33 (2013) 3303–3308.
- [32] L. Sirghi, J. Ponti, F. Broggi, F. Rossi, Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation, *Eur. Biophys. J.* 37 (2008) 935–945.
- [33] N.A. Burnham, X. Chen, C.S. Hodges, G.A. Matei, E.J. Thoreson, C.J. Roberts, M.C. Davies, S.J.B. Tendler, Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers, *Nanotechnology* 14 (2003) 1–6.
- [34] M.P. Lins, L.F. de Araujo Vieira, A.A. Rosa, S. Smaniotto, Growth hormone in the presence of laminin modulates interaction of human thymic epithelial cells and thymocytes *in vitro*, *Biol. Res.* 49 (2016) 37.
- [35] S. Smaniotto, V. de Mello-Coelho, D.M. Villa-Verde, J.M. Pleau, M.C. Postel-Vinay, M. Dardenne, W. Savino, Growth hormone modulates thymocyte development *in vivo* through a combined action of laminin and CXC chemokine ligand 12, *Endocrinology* 146 (2005) 3005–3017.
- [36] I.M. Viana, M.E. de Almeida, M.P. Lins, M.D. dos Santos Reis, L.F. de Araujo Vieira, S. Smaniotto, Combined effect of insulin-like growth factor-1 and CC chemokine ligand 2 on angiogenic events in endothelial cells, *PLoS One* 10 (2015) e0121249.
- [37] D.H. Gray, A.P. Chidgey, R.L. Boyd, Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry, *J. Immunol. Methods* 260 (2002) 15–28.
- [38] G. Pearce, Normal structure, function and histology of the thymus, *Toxicol. Pathol.* 34 (2006) 504–514.
- [39] T.S. Tran, A.L. Kolodkin, R. Bharadwaj, Semaphorin regulation of cellular morphology, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23 (2007) 263–292.
- [40] B.L. Bozna, P. Polzella, C. Rankl, R. Zhu, M. Salio, D. Shepherd, M. Duman, V. Cerundolo, P. Hinterdorfer, Binding strength and dynamics of invariant natural killer cell T cell receptor/CD1d-glycosphingolipid interaction on living cells by single molecule force spectroscopy, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 15973–15979.
- [41] Q. Shi, S. Luo, H. Jia, L. Feng, X. Lu, L. Zhou, J. Cai, Insulin-producing cells could not mimic the physiological regulation of insulin secretion performed by pancreatic beta cells, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 90.
- [42] M.N. Starodubtseva, N.I. Yegorenkov, I.A. Nikitina, Thermo-mechanical properties of the cell surface assessed by atomic force microscopy, *Micron* 43 (2012) 1232–1238.
- [43] I.A. Nikitina, M.N. Starodubtseva, A.I. Gritsuk, Surface architectonics and cytoskeleton state of different age rats’ thymocytes exposed to peroxytrinitrite, *Adv. Gerontol.* 24 (2011) 227–233.
- [44] J. Thimonier, C. Montixi, J.P. Chauvin, H.T. He, J. Rocca-Serra, J. Barbet, Thy-1 immunolabeled thymocyte microdomains studied with the atomic force microscope and the electron microscope, *Biophys. J.* 73 (1997) 1627–1632.
- [45] Y. Wu, H. Lu, J. Cai, X. He, Y. Hu, H. Zhao, X. Wang, Membrane surface nanostructures and adhesion property of T lymphocytes exploited by AFM, *Nanoscale Res. Lett.* 4 (2009) 942–947.
- [46] G.Y. Lee, C.T. Lim, Biomechanic approaches to studying human diseases, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 111–118.
- [47] N. Curry, G. Ghezali, G.S. Kaminski Schierle, N. Rouach, C.F. Kaminski, Correlative STED and atomic force microscopy on live astrocytes reveals plasticity of cytoskeletal structure and membrane physical properties during polarized migration, *Front. Cell. Neurosci.* 11 (2017) 104.
- [48] A. Schaefer, J. Te Riet, K. Ritz, M. Hoogenboezem, E.C. Anthony, F.P. Mul, C.J. de Vries, M.J. Daemen, C.G. Figdor, J.D. van Buul, P.L. Hordijk, Actin-binding proteins differentially regulate endothelial cell stiffness, ICAM-1 function and neutrophil transmigration, *J. Cell Sci.* 127 (2014) 4470–4482.

- [49] J.S. Allingham, V.A. Klenchin, I. Rayment, Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 2119–2134.
- [50] I. Delon, N.H. Brown, Integrins and the actin cytoskeleton, *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (2007) 43–50.
- [51] J.L. Bays, K.A. DeMali, Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions, *Cell. Mol. Life Sci.* 74 (2017) 2999–3009.
- [52] S. Hartmann, A.J. Ridley, S. Lutz, The function of rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 276.
- [53] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516.
- [54] L. Capparuccia, L. Tamagnone, Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment—two sides of a coin, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 1723–1736.
- [55] D.A. Mendes-da-Cruz, Y. Lepelletier, A.C. Brignier, S. Smaniotto, A. Renand, P. Milpied, M. Dardenne, O. Hermine, W. Savino, Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1153 (2009) 20–28.
- [56] A. Arjonen, R. Kaukonen, J. Ivaska, Filopodia and adhesion in cancer cell motility, *Cell Adhes. Migr.* 5 (2011) 421–430.
- [57] R.E. McConnell, J. Edward van Veen, M. Vidaki, A.V. Kwiatkowski, A.S. Meyer, F.B. Gertler, A requirement for filopodia extension toward slit during Robo-mediated axon repulsion, *J. Cell Biol.* 213 (2016) 261–274.
- [58] M. Girasole, G. Pompeo, A. Cricenti, A. Congiu-Castellano, F. Andreola, A. Serafino, B.H. Frazer, G. Boumis, G. Amiconi, Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: a quantitative atomic force microscopy investigation, *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (2007) 1268–1276.
- [59] M.J. Stevens, L.J. Donato, S.K. Lower, N. Sahai, Oxide-dependent adhesion of the Jurkat line of T lymphocytes, *Langmuir* 25 (2009) 6270–6278.
- [60] H. Jin, H. Zhao, L. Liu, J. Jiang, X. Wang, S. Ma, J. Cai, Apoptosis induction of K562 cells by lymphocytes: an AFM study, *Scanning* 35 (2013) 7–11.
- [61] Q. Luo, D. Kuang, B. Zhang, G. Song, Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility, *Biochim. Biophys. Acta* 1860 (2016) 1953–1960.
- [62] M. Vicente-Manzanares, F. Sanchez-Madrid, Role of the cytoskeleton during leukocyte responses, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 110–122.
- [63] X. Huang, J. He, M. Liu, C. Zhou, The influence of aminophylline on the nanostructure and nanomechanics of T lymphocytes: an AFM study, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 518.
- [64] H. Yan, L. Wu, C. Shih, S. Hou, J. Shi, T. Mao, W. Chen, B. Melvin, R.J. Rigby, Y. Chen, H. Jiang, R.H. Friedel, C.G. Vinuesa, H. Qi, Plexin B2 and Semaphorin 4C guide T cell recruitment and function in the germinal center, *Cell Rep.* 19 (2017) 995–1007.
- [65] D.A. Mendes-da-Cruz, A.C. Brignier, V. Asnafi, F. Baleyrier, C.V. Messias, Y. Lepelletier, N. Bedjaoui, A. Renand, S. Smaniotto, D. Canioni, P. Milpied, K. Balabanian, P. Bousso, S. Lepretre, Y. Bertrand, H. Dombret, N. Ifrah, M. Dardenne, E. Macintyre, W. Savino, O. Hermine, Semaphorin 3F and neuropilin-2 control the migration of human T-cell precursors, *PLoS One* 9 (2014) e103405.
- [66] F. Garcia, Y. Lepelletier, S. Smaniotto, R. Hadj-Slimane, M. Dardenne, O. Hermine, W. Savino, Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule, in the human thymocyte migration induced by CXCL12, *J. Leukoc. Biol.* 91 (2012) 7–13.
- [67] S. Curreli, B.S. Wong, O. Latinovic, K. Konstantopoulos, N.M. Stamatou, Class 3 semaphorins induce F-actin reorganization in human dendritic cells: role in cell migration, *J. Leukoc. Biol.* 100 (2016) 1323–1334.
- [68] S. Kümper, F.K. Mardakheh, A. McCarthy, M. Yeo, G.W. Stamp, A. Paul, J. Worboys, A. Sadok, C. Jørgensen, S. Guichard, C.J. Marshall, Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis, *elife* 5 (2016) e12994.
- [69] A. Yoneda, H.A. Mulhaupt, J.R. Couchman, The rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity, *J. Cell Biol.* 170 (2005) 443–453.

Cite this: *Analyst*, 2019, **144**, 1622

Drug-induced anti-inflammatory response in A549 cells, as detected by Raman spectroscopy: a comparative analysis of the actions of dexamethasone and *p*-coumaric acid

Elaine Cristina Oliveira da Silva,^a Flávio Martins dos Santos,^b Ana Rúbia Batista Ribeiro,^b Samuel Teixeira de Souza,^a Emiliano Barreto^b and Eduardo Jorge da Silva Fonseca^{*,a}

Corticosteroids are widely used as effective treatments for the control of chronic inflammatory diseases. However, because their long-term administration carries serious consequences, there is a need to investigate alternative therapies to reduce or even replace their use. In this regard, phenolic compounds have been presented as an alternative for the treatment of inflammatory diseases. *p*-Coumaric acid, a natural phenolic compound found throughout nature, exhibits antioxidative and anti-inflammatory properties. Herein, using a combination of Raman spectroscopy with principal component analysis and hierarchical cluster analysis, the inflammatory process induced by cigarette smoke extract (CSE) in epithelial cells treated with either a corticosteroid or *p*-coumaric acid was monitored *in vitro*. Our findings showed that *p*-coumaric acid had a significant anti-inflammatory effect in CSE-activated epithelial cells, and thus may be a useful alternative to corticosteroids for the treatment of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. In addition, multivariate analysis of the cell spectral data indicated that the mechanisms of action of the two drugs occur through different routes.

Received 1st October 2018,
Accepted 20th December 2018

DOI: 10.1039/c8an01887a

rsc.li/analyst

Introduction

Corticosteroids are potent inhibitors of the inflammatory process and are often the first therapy of choice for the effective control of chronic inflammatory diseases, including asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Although corticotherapy is very effective at suppressing airway inflammation, its long-time use is associated with the real risk of adverse diseases such as diabetes, obesity, and osteoporosis, among others.¹ In the case of COPD, it is estimated that approximately 1–15% of the world's population of ≥40 years of age could be diagnosed with this disease.² The reason for this estimate variability is that many patients who present a subclinical manifestation of the disease have simply not yet been diagnosed, since the development of clinical symptoms usually requires a substantial loss (of 40–50%) of lung function. Moreover, the active or passive exposure to cigarette smoke is the more important risk factor for the development of COPD.³ Whereas medications able to reverse COPD-

mediated changes in the airways have not yet been identified, corticosteroid treatments aimed at alleviating symptoms, improving lung function, and reducing hospitalizations have been widely used. However, in view of the negative consequences of long-term treatment with corticosteroids, it is necessary to identify alternative therapies that will help to reduce the dosage or even replace the use of corticosteroids in this pathological condition.

Phenolic compounds are distributed widely throughout nature and in the diet in the form of cereals, fruits, and medicinal herbs.^{4,5} Many phenolic compounds exhibit antioxidative and anti-inflammatory properties and possess promising effects against cancer.⁶ A recent study using a mouse model of lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke extract (CSE) demonstrated that *p*-coumaric acid, a natural phenolic acid, was a strong therapeutic candidate for treating pulmonary inflammatory diseases.⁷ However, the intracellular targets of *p*-coumaric acid remain poorly known.

Raman spectroscopy, a vibrational spectroscopic technique based on inelastic light scattering, is used to provide important biochemical information about molecules in a sample.⁸ Owing to its advantages of being highly sensitive, nondestructive, and noninvasive, Raman spectroscopy has become an important tool in providing biochemical information regard-

^aGrupo de Óptica e Nanoscopia (GON), Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, Alagoas, Brazil. E-mail: eduardo@fis.ufal.br

^bLaboratório de Biologia Celular (LBC), Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, Alagoas, Brazil

ing the molecule interactions, composition, and structure in cells in physiological conditions.^{9,10} The applications of Raman spectroscopy to biological samples are numerous, including the analysis of bioactive materials,^{11,12} diagnosis and treatment of cancer,^{13,14} and monitoring of biochemical changes in red blood cells and tissue *ex vivo*.^{15,16} This spectroscopic technique has also been used in biomedical applications as a tool in drug development and screening.¹⁷ It can also be used to assess the effects of drugs on cells, with the potential to identify cellular changes in response to drug treatment and to reveal detailed biochemical information on how drugs may alter the quality and quantity of cellular constituents.¹⁸ This approach can contribute useful molecular information to elucidate the action mechanisms of drugs, which could be applicable to the development of new therapies, such as those for inflammatory processes.

However, in spite of the many advantageous features of Raman spectroscopy, the spectral differences between different drug treatments of cells are frequently minute, except for a small variation in the intensities. Using visual observation, small spectral variations in intensity are difficult to differentiate. Fortunately, this limitation of Raman spectroscopy can be overcome by the application of statistical analysis of the Raman spectra of biological cells.

Principal component analysis (PCA) has been successful in the identification of the patterns in multivariate data sets.¹⁹ It is an algorithm designed to reduce the variable number of a data set and can be used to identify the Raman spectra of biological cells.²⁰ On the other hand, hierarchical cluster analysis (HCA) is used to classify a data set into groups on the basis of combinations of interval variables; thus, the statistical difference between different data sets can be revealed effectively.²¹ Herein, with the intent to identify the biochemical changes in cells induced by anti-inflammatory drugs, we performed Raman spectroscopy analysis on CSE-activated epithelial cells treated with a corticosteroid or *p*-coumaric acid. We report the potential application of Raman spectroscopy, in conjunction with the PCA and HCA methods, to the study of A549 cell treatments with dexamethasone (a glucocorticoid) and *p*-coumaric acid.

Materials and methods

Cell line

The A549 human lung adenocarcinoma cell line was cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% penicillin, and 0.01% streptomycin, and maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. Cultures were monitored daily to evaluate the quantity of confluence and the absence of contaminants. Upon reaching confluence, the cells were detached using a 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid solution, and seeded into 24-well plates at the density of 2 × 10⁵ cells per well. Following overnight incubation, the RPMI-1640 medium was replaced with serum-free medium and the cells were exposed to the different

treatments and/or stimulus. All experiments were performed when the cell culture confluence reached at least 90%.

Culture conditions for the stimulus and treatments

A549 cells adhered onto 24-well plates (2 × 10⁵ cells per well) were maintained in RPMI-1640 medium without serum and treated with dexamethasone (0.25, 2.5 and 25 μM), or *p*-coumaric acid (10, 20, 100 μM) for 1 h, and shall thereafter stimulated with a cigarette smoke extract (CSE, 2.5, 5, 25 and 50%) for 24 h. Cells cultured in RPMI-1640 medium were used as control. To induce an experimental situation of activation of the airway epithelial cells that mimics the effects of cigarette smoke, a CSE was prepared using smoking protocol described by Victoni and coworkers¹⁴ with slight modification. In brief, two commercial cigarettes with the filters removed (Marlboro, Philip Morris, Inc., Richmond, VA, USA) were bubbled through 20 mL of RPMI-1640 medium, and the resulting solution was then filtered through a 0.22 μm pore filter. Next, lipopolysaccharide (LPS, 0.1 mg mL⁻¹) was added, resulting in a 100% CSE solution. The dose selection criteria were based in results of a pilot experiment. All the experiments were performed when the cell culture confluence reached 90% in an asynchronous cell culture system.²²

Cell viability assay

The effects of the drug treatments and CSE on cell viability were assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. In brief, A549 cells were seeded into 96-well plates (1 × 10⁵ cells per well) and then exposed to different concentration of dexamethasone, *p*-coumaric acid, or CSE solution for 24 h. Cells treated with RPMI-1640 medium only were used as the control. After 24 h of cell culture, 5 mg mL⁻¹ MTT (20 μL per well) was added to the medium and the cells were incubated for 4 h. Thereafter, the medium in each well was replaced with dimethyl sulfoxide (150 μL) and the cells were further incubated for 10 min. The optical density was then spectrophotometrically measured at 540 nm with a microplate reader.

Quantification of IL-8 and statistical analysis

A549 cells were plated into 96-well plates (1 × 10⁵ cells per well) and then exposed to different concentrations of dexamethasone, *p*-coumaric acid, or CSE solution for 24 h, as described in subsection "Culture conditions for the stimulus and treatments". Then, the culture supernatants were harvested and centrifuged at 14 000g for 10 min to remove cell debris. The interleukin (IL)-8 levels were measured using ELISA kits (BD eBiosciences) according to the manufacturer's protocol.

Statistical data of the effects of dexamethasone and *p*-coumaric acid on IL-8 secretion were expressed as the mean ± standard error and were analyzed for significant differences using analysis of variance followed by Tukey's *post-hoc* comparison test. Determinations of EC₅₀ were performed by using Prism-version 7.0 Graphpad Software Inc. (San Diego, CA, USA).

Raman spectral measurements

The Raman spectra were measured using a Horiba XploRA spectrometer coupled to an Olympus microscope and equipped with a 532 nm laser that was focused on the nucleus of the cells through a 60× oil immersion objective (NA = 1.40). The same objective lens was used for collecting Raman scattered light after interaction with the sample, in a backscattering geometry. The frequency calibration was set by reference to the 520 cm⁻¹ vibrational band of a silicon wafer. Under the same conditions, 30 cell spectra for each group were measured in the spectral range of 700–1800 cm⁻¹. In order to minimize laser-induced heating of the specimens a low power irradiation at the sample surface was used, around 5 mW, during a short exposure time (1 s laser exposure for 60 accumulations). The diffraction grating used had 1200 lines per millimeter, which yielded a spectral resolution of 1.5 cm⁻¹. All experiments were performed in living cells. In the Raman measurements, the cells were not in RPMI-1640 medium used to treatment. That is, prior the measurements, the coverslips with the cells were washed with PBS and placed in a glass petri dish containing such solution.

Data preprocessing and spectral analysis

In general, a visible 532 nm laser produces a strong background signal in the Raman spectrum of biological samples.^{20,23} Moreover, the noises from different sources (e.g., shot noise, dark noise, and readout noise) contribute to the background signal in the Raman spectra. Therefore, before conducting the spectral analysis, all spectra have to be smoothed, background-adjusted, and normalized using the adaptive “minmax” method.²⁴ By doing this, the external noises are suppressed and the useful information about the biochemical composition is enhanced. This method automatically chooses a polynomial order to correct the background spectra to avoid user intervention, following which each spectrum is normalized with its maximum intensity.

After the “minmax” method²⁴ had been applied, PCA and HCA were performed. PCA is a mathematical method that transforms the data into new coordinates on an orthogonal basis called principal components (PCs). The method extracts the useful information from complicated data and identifies the pattern on the basis of the relevant information. The component that explains the maximum variance in the data set is termed PC1, which corresponds to the first axis in the new coordinates. Each successive component accounts for the residual variance that is not captured by the previous component, and so on.²⁵ Usually, most of the variance is contained in the first three principal components, PC1, PC2, and PC3. Thereafter, the HCA algorithm was applied to the PCA results in order to separate the data into statistically similar groups. HCA is a method that defines the grouping structure in the samples of a data set by a nested tree graphical representation, called a dendrogram.²⁶ In a dendrogram, the samples are gradually linked according to their similarities, which are measured by a distance measurement among their related spectra.

Results

Viability of A549 cells after stimulation with CSE

As illustrated in Fig. 1, incubation of the A549 cells with 2.5% and 5% concentrations of CSE did not result in significant alterations in cell viability. However, CSE at the higher doses of 25% and 50% induced a 40% and 60% reduction in cell viability, respectively, indicating a cytotoxic effect at these concentrations. On the basis of this result, we decided to use 2.5% and 5% of CSE to evaluate the production of IL-8 from epithelial cells.

Inhibition of CSE-induced A549 activation by dexamethasone and *p*-coumaric acid

As shown in Fig. 2A, low levels of IL-8 protein (<30 pg mL⁻¹) were detected in the conditioned medium from cells cultured with RPMI-1640 culture medium (control). Cells under stimulation with CSE at 2.5% and 5% for 24 h showed in the supernatant higher levels of IL-8 representing 2.8- and 6.2-times control values, respectively (Fig. 2A). With this result, the effect of pretreatment with dexamethasone or *p*-coumaric acid was evaluated in 5% CSE-stimulated A549 cells. As determined in subsection “Viability of A549 cells after stimulation with CSE”, this CSE concentration does not affect cell viability, and thus the drug-dose-dependent effects on the IL-8 secretion by A549 cells after 24 h could be determined in relation to the control group.

As showed in Fig. 2B and C, CSE stimulation resulted in substantially increase in IL-8 production compared to cells unstimulated (medium). In cells treated with dexamethasone at 2.5 and 25 μM, the production of IL-8 was reduced by 48% and 69%, respectively (Fig. 2B). In cells treated with *p*-coumaric acid at 10, 20, and 100 μM, IL-8 production was significantly reduced by 24%, 55%, and 74%, respectively (Fig. 2C). As demonstrated in Fig. 2D, dexamethasone (EC₅₀ of 1.7 ± 0.5 μM) inhibits CSE-induced IL-8 secretion with an EC₅₀ approximately 10-fold lower than *p*-coumaric acid (EC₅₀ of 15.2 ± 1.3 μM). These data of EC₅₀ provides an initial quantitat-

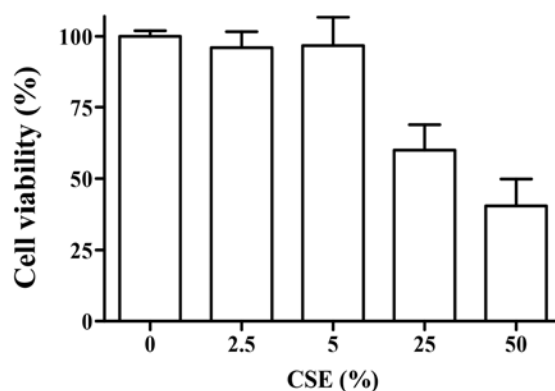


Fig. 1 Evaluation of A549 cell viability after exposure to increasing concentrations of cigarette smoke extract (CSE) for 24 h. Bars represents the mean ± SD of 3 independent experiments.

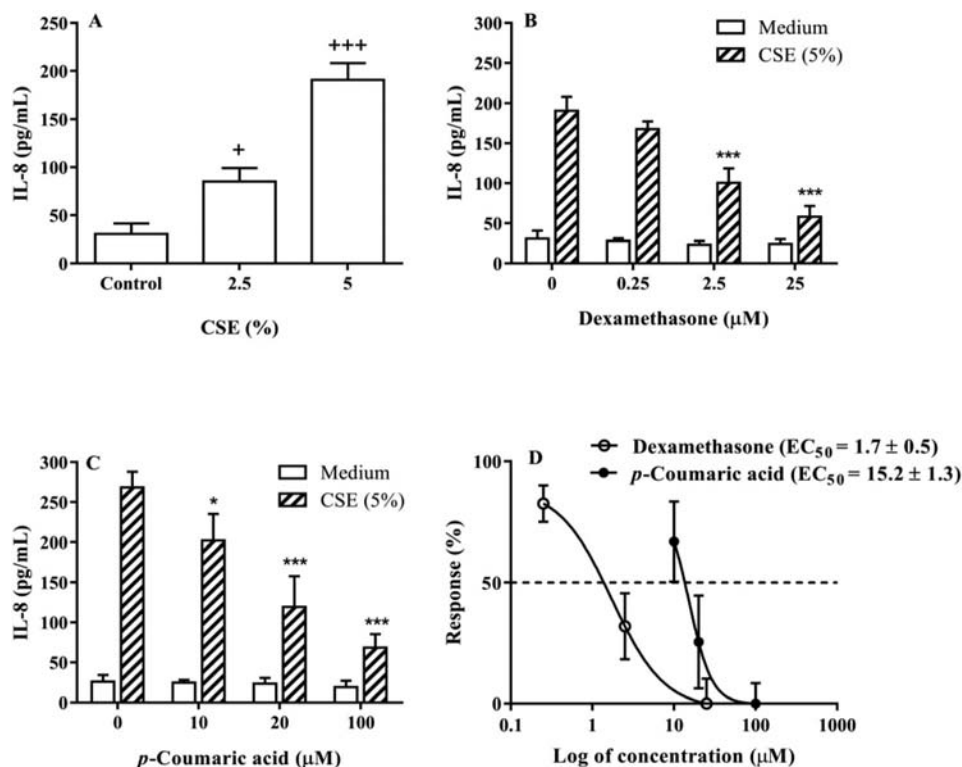


Fig. 2 IL-8 secretion in cigarette smoke extract (CSE)-stimulated A549 cells. (A) Cells exposed to CSE only (5%). (B) Cells pretreated with dexamethasone and then exposed to CSE (5%). (C) Cells pretreated with *p*-coumaric acid and then exposed to CSE (5%). (D) The EC₅₀ for dexamethasone and *p*-coumaric acid on CSE-induced IL-8 secretion. Bars represent the mean \pm SD of 3 experiments. * p < 0.05, *** p < 0.001 compared with no-treatment controls.

ive comparison of the drug effects. On the basis in Fig. 2B and C, we decided to use 2.5 μ M dexamethasone and 20 μ M *p*-coumaric acid for the spectroscopic studies on CSE-stimulated A549 cells.

Spectral variability among live A549 cells

Through the Raman spectrum, it is possible to evaluate drug-induced responses in cells and identify changes that may reveal detailed information about how drugs can alter the cellular biochemistry. To perform the spectral data analysis and classification, the Raman spectra of cells were divided into six groups: (i) cells treated only with RPMI-1640 medium (control); (ii) cells stimulated with CSE (CSE); (iii) cells treated with dexamethasone (Dex); (iv) cells treated with dexamethasone and stimulated with CSE (Dex + CSE); (v) cells treated with *p*-coumaric acid (*p*-Cou); and (vi) cells treated with *p*-coumaric acid and stimulated with CSE (*p*-Cou + CSE). A total of 30 cell spectra were measured for each group to identify the most important spectral differences among the groups of cells. All spectra were previously subjected to some preprocessing as described in the Materials and Methods section.

Fig. 3 shows the mean Raman spectra of the six groups of cells after preprocessing, with the respective standard deviations overlaid as shaded gray fill. The Raman spectra of A549 cells consist mainly of peaks corresponding to molecular vibrations of proteins, lipids, nucleic acids and carbohydrates,

and the Raman band assignments used in interpretation of the spectral features were carried out based on published literature.^{27,28}

The major changes observed in the spectra of A549 cells are in the Raman bands corresponding to DNA backbone O–P–O stretching at 828 cm^{-1} , C–C stretching at 937 cm^{-1} related to proteins, C–N peptide bonds of proteins at 1128 cm^{-1} , C–H deformation vibrations in 1460 cm^{-1} , and vibrations in the amide I band centered at 1659 cm^{-1} . The Raman spectrum also showed peaks in the 1209–1367 cm^{-1} spectral region. This region is a complex part because many vibrational frequencies corresponding to proteins, lipids, and nucleic acids overlap.

The 828 cm^{-1} peak corresponding to nucleic acids, presented a considerable decrease in cells treated with dexamethasone and dexamethasone + CSE, whereas in cells treated with *p*-coumaric acid and *p*-coumaric + CSE showed practically no alteration in comparison with the control cells. Already the region comprising the 937 cm^{-1} peak, related to proteins, presented a significant increase in cells treated with dexamethasone and dexamethasone + CSE comparing to control cells. The differences in the amide I band centered at 1659 cm^{-1} indicate that there are variations in the amount of proteins and lipids among the cells, since in this spectral range many vibrational frequencies corresponding to proteins and lipids overlap. It was observed that in the cells treated with dexamethasone and dexamethasone + CSE suffered a narrowing in

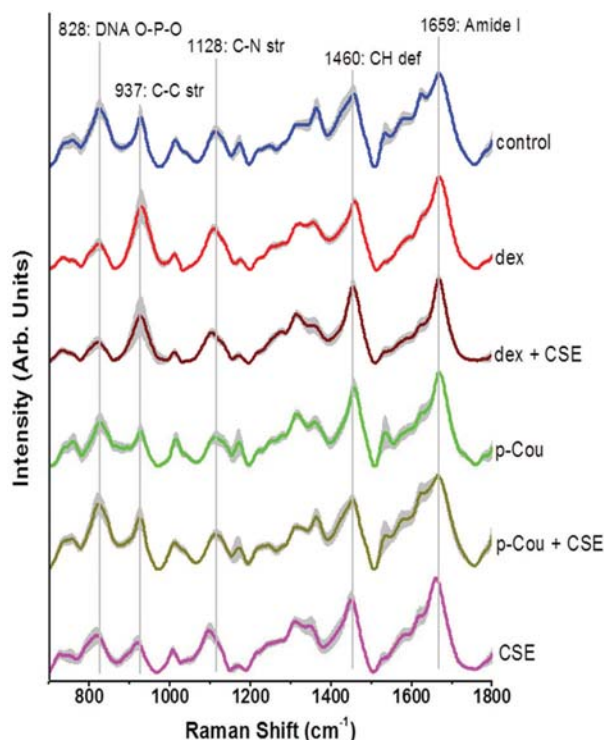


Fig. 3 Raman spectra of six groups of A549 cells exposed to different drug treatments and/or cigarette smoke extract (CSE) stimulus. The Raman spectra are the averages of 30 cells for each group in the fingerprint region ($700\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$). The shaded areas represent the standard deviations of the means.

relation to the control cells, whereas the cells treated with *p*-coumaric acid and *p*-coumaric acid + CSE presented a spectral profile similar to that of control cells.

We observed that the mean spectra looked similar to one another and there were no large group-to-group variations, albeit some peaks showed small differences in intensity. However, even small differences in Raman spectra may be sufficient to differentiate distinct groups of cells that have undergone some type of treatment. Through multivariate statistical methods, we are able to make this differentiation and prove that the treatments had in fact affected the cellular biochemical composition.

Multivariate statistical methods: PCA and HCA

The analysis of single peak intensities is not sufficient to resolve complex spectral peak shifts. The use of multivariate statistical methods becomes useful in this context. Herein, PCA and HCA were used, which allowed classification of the different cellular groups and interpretation of the spectral data. PCA summarizes the set of original variables to a few components capable of retaining as much variation as possible. The analysis was performed on the preprocessing cell spectra, and the scores for the first two PCs (PC1, and PC2) were analyzed with a two-sample test of variance to determine significant differences in the means of scores among the different cell groups. For the determination of the differen-

tiation capability of PCA and identification of significant Raman features, the loading profile of the PC1 have been used. Two-dimensional plots were constructed with combinations of sets of scores of the first two PCs as well as the corresponding plots of the PC1 loadings, as shown in Fig. 4.

As illustrated in Fig. 4A, the control cells (blue dots) could be easily distinguished from the cells in the Dex group (red dots) by the first two PCs, indicating significant spectral differences between the groups. The main discriminant was the score of PC1, where the Dex group had negative scores and the control group had positive scores. In this case, the first two PCs, accounting for 85% of the variance, showed significant differences ($p < 0.05$) among the two groups by a two-sample test of variance. An analogous comparison between the control group and the *p*-Cou group (green dots) is presented in Fig. 4B. The first two PCs used in this comparison accounted for 65% of the variance between the Raman spectra obtained from these two cell groups. The analysis showed a dispersion of the samples, with a small portion of the two groups of cells overlapping, indicating that although there were significant differences ($p < 0.05$) between the groups, some spectra were similar. The PC scores presented in Fig. 4C show excellent separation between the Dex and *p*-Cou groups of cells, evidencing significant spectral differences between them and suggesting different action mechanisms of the drugs. These three previous analyses were corroborated with the PCA plot for the three cell groups together, as shown in Fig. 4D. In this case, the first two PCs explained 75% of the variance of the original data set, with PC1 describing 54%, and PC2 describing 21% of the total variance.

The direct comparison between the control group and the CSE group (magenta dots) is presented in Fig. 4E. In this analysis, the variance attributed to each of the first two PCs of the Raman spectral accounts was 77% of the two cell groups. The smoke stimulus led the cells to an activation profile (IL-8 production), guaranteeing the spectral difference between the groups. Finally, all groups of cells stimulated with smoke were compared simultaneously with the control group to determine the resolution afforded by using the first two PCs, which accounted for 76% of the variance (Fig. 4F).

The loadings of the PCs are representative of the biochemical differences between the groups of cells, and contribute to the differentiation of the spectra in the scores plot of PCs. Indeed, loadings have a spectral dimension, where positive and negative peaks can be observed. In our study, loadings of PC1 indicated positive correlation of Raman bands at 828, 1027, 1168, 1364, 1460, 1533, 1659 and 1699 cm^{-1} , and negative correlation of signals at 937, and 1263 cm^{-1} for cells treated with dexamethasone when compared to control cells (Fig. 4A). The positive peaks in the loadings indicate rising Raman signals. In contrast, negative loading bands denote a reduced contribution of the respective signals in the measured Raman spectra (Fig. 3).

In the PCA of control cells and those ones treated with *p*-coumaric acid, PC1 loadings indicated positive correlation signals at 828, 937, 1168, 1364, 1460, 1533, 1659, and

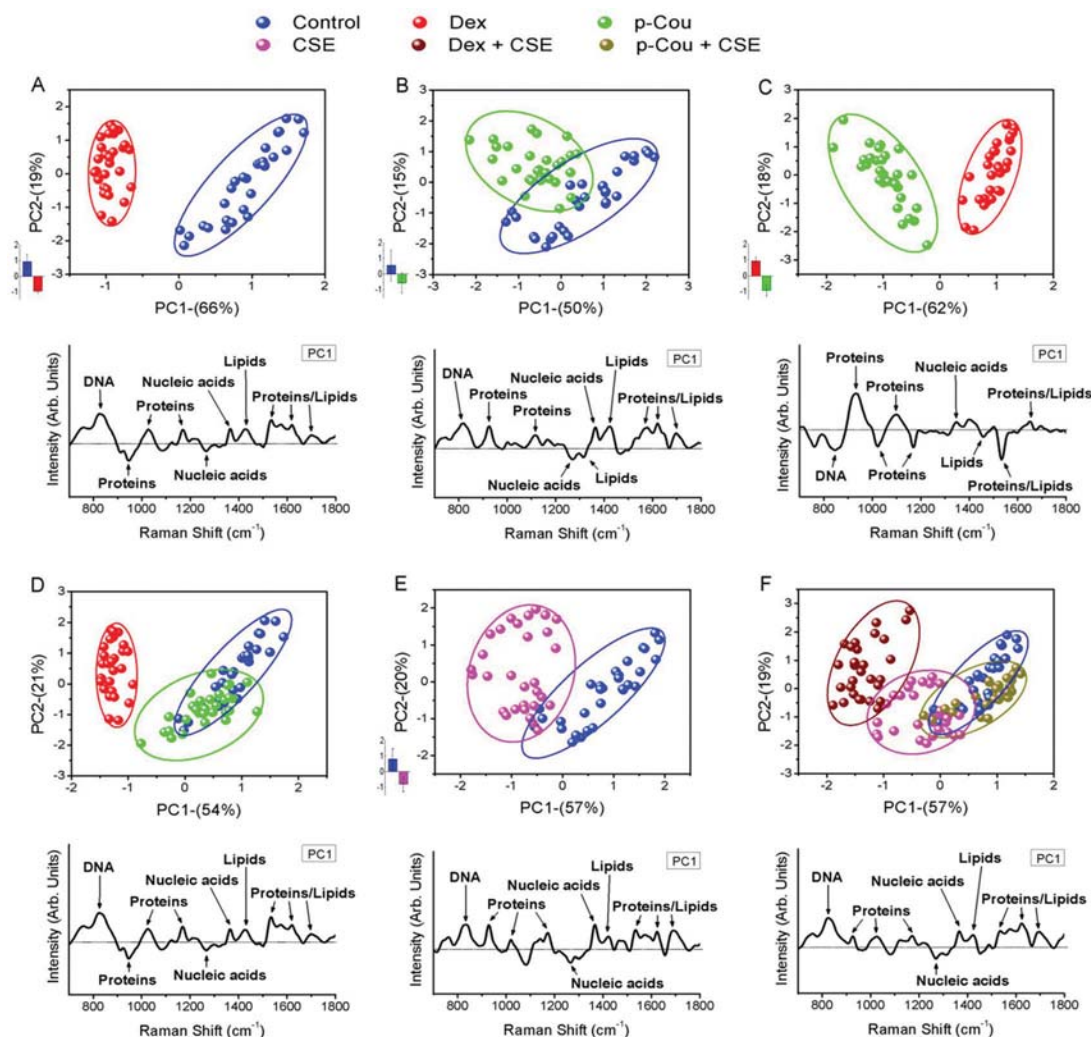


Fig. 4 Principal component analysis (PCA). Two-dimensional PCA plots, and loadings of PC1 for (A) control cells and cells treated with dexamethasone (Dex); (B) control cells and cells treated with *p*-coumaric acid (*p*-Cou); (C) Dex and *p*-Cou; (D) control cells, CSE, cells treated with dexamethasone and stimulated with CSE (Dex + CSE), and cells treated with *p*-coumaric acid and stimulated with CSE (*p*-Cou + CSE). The mean score values and standard deviations of each sample group compared with those of the control group are indicated on the left side of each plot. The loadings of PC1 show features responsible for the differentiation (nucleic acids, proteins, and lipids).

1699 cm^{-1} , whereas negative correlation of bands at 1263, and 1314 cm^{-1} (Fig. 4B). Compared to cells treated with *p*-coumaric acid, a decreasing band at 828, 1027, 1168, 1460, and 1533 cm^{-1} , and an increasing signal at 937, 1364, and 1659 cm^{-1} were identified in the spectra of cells treated with dexamethasone based on the PC1 loadings (Fig. 4C). The bands in the loadings plots show the Raman peaks where the spectral differences between the groups of cells exist. These peaks were found in agreement with those in the Raman spectra and have the highest weights for differentiation between dexamethasone and *p*-coumaric acid treatments, evidencing the fact that the drugs have different mechanisms of action. The same analyses can be following with the CSE groups.

HCA was also used for discrimination of the six cell groups. The results are presented in the form of dendrograms, which

group the samples into clusters according to their similarities. Observing the results of the $\text{PC1} \times \text{PC2}$ graphs obtained previously, we could verify that some cell groups overlapped. This information is strictly related to the groupings formed by the HCA, since the less the overlap, the better the grouping; that is, the samples that have similarities will be gathered in the same cluster. As illustrated in Fig. 5A, the HCA resulted in two main clusters: the first refers to the Dex group, and the second corresponds to the control group. The clusters showed a clear distinction between the two groups. Fig. 5B shows the HCA dendrogram for the control and *p*-Cou groups. Although the clusters were separated into two distinct main clusters, there were some ramifications corresponding to the control cells being within the cluster formed by the *p*-coumaric acid-treated cells, indicating that these samples have similar character-

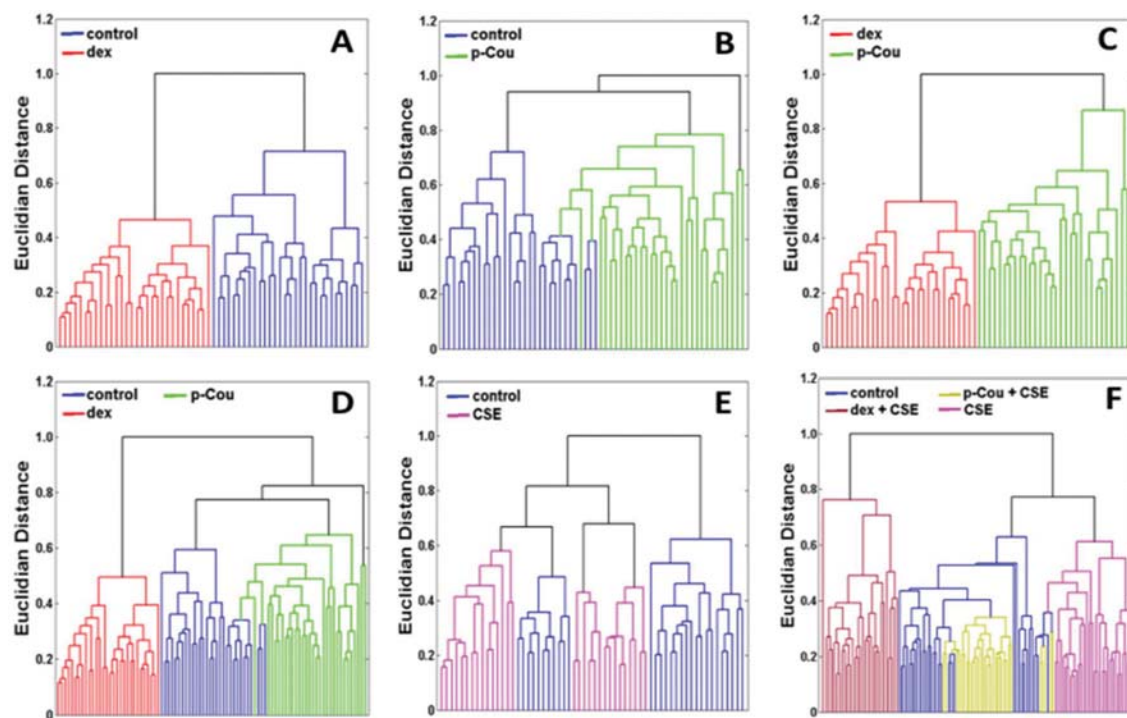


Fig. 5 Hierarchical cluster analysis (HCA). HCA of (A) cells treated only with RPMI-1640 medium (control) and cells treated with dexamethasone (Dex); (B) control cells and cells treated with *p*-coumaric acid (*p*-Cou); (C) Dex and *p*-Cou; (D) control cells, Dex, and *p*-Cou; (E) control cells and cells stimulated with CSE (CSE); and (F) control cells, CSE, cells treated with dexamethasone and stimulated with CSE (Dex + CSE), and cells treated with *p*-coumaric acid and stimulated with CSE (*p*-Cou + CSE).

istics, as suggested by the PCA. The HCA dendrogram for the Dex and *p*-Cou groups (Fig. 5C) showed a clear distinction between the two clusters.

The dendrogram in Fig. 5D revealed the separation of the samples into three main clusters: the first refers to the Dex group, the second to the control group, and the third to the *p*-Cou group. This analysis corroborated the results obtained in Fig. 5A and B.

The groups of cells stimulated with smoke were also analyzed by HCA. Fig. 5E shows the dendrogram obtained for the control cell group and the CSE group. In Fig. 5F, all groups of cells stimulated with smoke are shown together with the control group.

Discussion

This present study used Raman spectroscopy as a tool to characterize substances used in the treatment of inflammatory processes, through a comparative analysis of the *in vitro* actions of dexamethasone and *p*-coumaric acid in A549 cells.

Initially, we ascertained that CSE concentrations of less than 5% were the best for stimulating the inflammatory response in A549 cells without causing a cytotoxic effect. Such concentrations would lead the A549 cells to produce IL-8, a chemokine that plays an important role in COPD. In line with our results, a previous study also demonstrated that CSE

stimulates the secretion of IL-8 from A549 cells.¹⁴ Indeed, lung biopsies from ex-smokers and patients with COPD showed high levels of IL-8 mRNA and protein, confirming the inflammatory effect of cigarette smoking in the airways and lungs.²⁹

Scientific and clinical evidence implicate the inflammatory response in the pathogenesis and maintenance of COPD.³⁰ Therefore, therapeutic strategies aimed at halting the inflammatory response are desirable. Although showing significant side effects, corticosteroids have been the first therapy of choice against the inflammatory condition in all COPD settings.³¹ Corticosteroids act as suppressive agents of the expression of various proinflammatory cytokines, including IL-8. Despite all the side effects associated with corticosteroids, their use in patients with COPD remains supported owing to scientific evidence and the shortage of alternative treatments. Thus, the search for drugs that can be used in the treatment of these diseases without causing so many side effects is fundamental.

In recent years, a wide range of natural products have been suggested for use in COPD therapy, including macrolides,³² azithromycin,³³ and phenolic compounds.³⁴ A previous study showed that cinnamic acids, which are phenolic compounds found in a wide range of medicinal plants, are able to protect lung tissue against the inflammatory damage induced by cigarette smoke.³⁵ The results obtained from the present study demonstrated that *p*-coumaric acid could be a therapeutic alternative against inflammatory processes, because aside

from being non-cytotoxic, it was able to suppress the production/secretion of the chemokine IL-8. *p*-Coumaric acid has attracted substantial attention owing to its several pharmacological and biological actions, such as its antioxidative, anti-inflammatory, and neuroprotective activities.^{36,37} Therefore, *p*-coumaric acid has been used for the prevention or treatment of various diseases, and may provide protection against cardiovascular and Parkinson's diseases³⁸ in addition to being able to combat some types of cancer.³⁹

In this paper, pretreatment with either dexamethasone or *p*-coumaric acid reduced the IL-8 production in epithelial cells, showing both drugs to be effective in the treatment of inflammation. In this scenario, the Raman spectroscopy can offer a new ingredient to elucidate CSE-induced biological changes in A549 cells. Fig. 3 showed that to cells treated with dexamethasone (stimulated or not) produced significant changes, for instance, peak at 937 cm⁻¹ and the band centered 1659 cm⁻¹, when compared to control spectrum. On the other hand, the cells treated with *p*-coumaric (stimulated or not) presented a similar spectral profile to the control cells. However, it would undoubtedly be interesting to highlight any difference between their efficacies. In this regard, the multivariate analysis of the Raman spectra suggested that the mechanisms of action of the drugs occur through different routes. That is, each drug modifies the cell differently, and it was observed that *p*-coumaric acid treatment caused less change in the cell structure compared with dexamethasone treatment. These observations were made possible only by both PCA and HCA of the Raman spectra obtained from A549 cells treated with dexamethasone or *p*-coumaric acid.

PCA and HCA are multivariate techniques with very different theoretical foundations, and can be applied independently because they are complementary techniques for analyzing information on a spectral data set.⁴⁰ These techniques have been used to classify spectral changes related to human diseases, since in most cases the alterations are subtle and difficult to interpret and are most of the time related to several molecular components with overlapping spectral information.

The PCA and HCA results presented in this study showed a clear distinction between the cells treated with *p*-coumaric acid and those treated with dexamethasone. Through PCA, we observed differences between the control group and the Dex group (Fig. 4A), suggesting that dexamethasone causes changes in the biochemical constituents of the cells. However, when we compared the control group with the *p*-Cou group (Fig. 4B), the differences were noticeably smaller than those shown in Fig. 4A, a finding corroborated by the results shown in Fig. 4C. Summarized, Fig. 4D shows that there are overlap regions with greater similarity between the *p*-Cou group and the control group, unlike the case with the Dex and control groups. Moreover, an interesting result is shown in Fig. 4E, representing cells treated with dexamethasone or *p*-coumaric acid and stimulated with CSE. We can observe that the *p*-Cou + CSE group is close to the control group, which is quite different from the case with the Dex + CSE group versus the control. This result shows that *p*-coumaric acid leads to a

minor change in the biochemical constituents of the cells compared with that caused by dexamethasone. The same conclusion was achieved with HCA, where Fig. 5F reveals overlap of the *p*-Cou + CSE group with the control group, whereas the Dex + CSE group is in a distinctly separate cluster from that of the control. The variance revealed in the loadings (Fig. 4) agrees very well with the bands selected in the spectra discussed in Fig. 3, once these loadings can be used for such comparison.

Conclusions

Our study has indicated that *p*-coumaric acid decreases the production of IL-8 in CSE-stimulated A549 cells as efficiently as dexamethasone, the standard drug for research investigating the inflammatory process. The Raman spectra revealed that each drug modifies the cell differently, but *p*-coumaric acid treatment causes less change in the cell structure compared with dexamethasone treatment. Based on these results above, our findings provide an initial understanding of the anti-inflammatory mechanism of *p*-coumaric acid.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors are thankful to CAPES, CNPq, and FAPEAL (through PRONEX projects) for their financial support. The authors would also like to thank Juliane Silva MSc and Tássio Cartaxo MSc for their technical assistance with the IL-8 quantification, and Givanildo R. Silva MSc for his assistance with the Raman spectral measurements.

The human cell line used in this work was obtained from commercial suppliers.

References

- 1 M. Bonay, C. Bancal and B. Crestani, The risk/benefit of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease, *Expert Opin. Drug Saf.*, 2005, **4**(2), 251–271.
- 2 D. M. Mannino and A. S. Buist, Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends, *Lancet*, 2007, **370**(9589), 765–773.
- 3 M. Maskey-Warzęchowska, P. Nejman-Gryz, K. Osinka, P. Lis, K. Malesa, K. Górska, *et al.*, Acute Response to Cigarette Smoking Assessed in Exhaled Breath Condensate in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Healthy Smokers, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, **944**, 73–80.
- 4 C.-T. Ho, *Phenolic Compounds in Food*, 1992, vol. 506, pp. 2–7.

- 5 D. Lin, M. Xiao, J. Zhao, Z. Li, B. Xing, X. Li, *et al.*, An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes, *Molecules*, 2016, **21**(10), 1374.
- 6 M. Carocho and I. Ferreira, The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2013, **13**(8), 1236–1258.
- 7 W. Kim, D. Lim and J. Kim, p-Coumaric Acid, a Major Active Compound of *Bambusae Caulis* in *Taeniam*, Suppresses Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation, *Am. J. Chin. Med.*, 2018, **46**(02), 407–421.
- 8 A. Kudelski, Analytical applications of Raman spectroscopy, *Talanta*, 2008, **76**(1), 1–8.
- 9 P. Crow, J. S. Uff, J. A. Farmer, M. P. Wright and N. Stone, The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro, *BJU Int.*, 2004, **93**(9), 1232–1236.
- 10 Y. H. Ong, M. Lim and Q. Liu, Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells, *Opt. Express*, 2012, **20**(20), 22158.
- 11 D. Pappas, B. W. Smith and J. D. Winefordner, Raman spectroscopy in bioanalysis, *Talanta*, 2000, **51**(1), 131–144.
- 12 I. Notingher, J. R. Jones, S. Verrier, I. Bisson, P. Embanga, P. Edwards, *et al.*, Application of FTIR and Raman Spectroscopy to Characterisation of Bioactive Materials and Living Cells, *Spectroscopy*, 2003, **17**(2–3), 275–288.
- 13 P. Gao, B. Han, Y. Du, G. Zhao, Z. Yu, W. Xu, *et al.*, The Clinical Application of Raman Spectroscopy for Breast Cancer Detection, *J. Spectrosc.*, 2017, **2017**, 1–10.
- 14 R. E. Morty, T. Victoni, F. Gleonnec, M. Lanzetti, H. Tenor, S. Valença, *et al.*, Roflumilast N-Oxide Prevents Cytokine Secretion Induced by Cigarette Smoke Combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 Inhibition in Airway Epithelial Cells, *PLoS One*, 2014, **9**(1), e85243.
- 15 L. M. Almond, J. Hutchings, G. Lloyd, H. Barr, N. Shepherd, J. Day, *et al.*, Endoscopic Raman spectroscopy enables objective diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus, *Gastrointest. Endosc.*, 2014, **79**(1), 37–45.
- 16 R. Smith, K. L. Wright and L. Ashton, Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies, *Analyst*, 2016, **141**(12), 3590–3600.
- 17 H. Nawaz, F. Bonnier, P. Knief, O. Howe, F. M. Lyng, A. D. Meade, *et al.*, Evaluation of the potential of Raman microspectroscopy for prediction of chemotherapeutic response to cisplatin in lung adenocarcinoma, *Analyst*, 2010, **135**(12), 3070.
- 18 L. E. Jamieson and H. J. Byrne, Vibrational spectroscopy as a tool for studying drug-cell interaction: Could high throughput vibrational spectroscopic screening improve drug development?, *Vib. Spectrosc.*, 2017, **91**, 16–30.
- 19 R. Malini, K. Venkatakrishna, J. Kurien, K. M. Pai, L. Rao, V. B. Kartha, *et al.*, Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study, *Biopolymers*, 2006, **81**(3), 179–193.
- 20 T. Tao, Q. Shen, X. Lu, Y. He and L. Zhong, Raman Spectroscopy-Based Multivariate Statistical Analysis Reveals the Molecular Mechanism of K562 Cell Apoptosis Induced by Adriamycin, *Spectrosc. Lett.*, 2014, **47**(4), 301–305.
- 21 S. Shanmukh, L. Jones, Y. P. Zhao, J. D. Driskell, R. A. Tripp and R. A. Dluhy, Identification and classification of respiratory syncytial virus (RSV) strains by surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate statistical techniques, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**(6), 1551–1555.
- 22 Q. Matthews, A. Jirasek, J. Lum, X. Duan and A. G. Brolo, Variability in Raman Spectra of Single Human Tumor Cells Cultured in Vitro: Correlation with Cell Cycle and Culture Confluency, *Appl. Spectrosc.*, 2010, **64**(8), 871–887.
- 23 H. J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, *et al.*, Using Raman spectroscopy to characterize biological materials, *Nat. Protoc.*, 2016, **11**(4), 664–687.
- 24 A. Cao, A. K. Pandya, G. K. Serhatkulu, R. E. Weber, H. Dai, J. S. Thakur, *et al.*, A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence, *J. Raman Spectrosc.*, 2007, **38**(9), 1199–1205.
- 25 H. Abdi and L. J. Williams, Principal component analysis, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, 2010, **2**(4), 433–459.
- 26 K. R. Beebe, R. J. Pell and M. B. Seasholtz, Chemometrics: A Practical Guide, *Wiley Interscience Series on Laboratory Automation*, John Wiley & Sons, New York, 1998, xi+348pp., ISBN 0-471-12451-6.
- 27 I. Notingher, S. Verrier, S. Haque, J. M. Polak and L. L. Hench, Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: Living cells versus dead cells, *Biopolymers*, 2003, **72**(4), 230–240.
- 28 H. Nawaz, A. Garcia, A. D. Meade, F. M. Lyng and H. J. Byrne, Raman micro spectroscopy study of the interaction of vincristine with A549 cells supported by expression analysis of bcl-2 protein, *Analyst*, 2013, **138**(20), 6177.
- 29 G. A. Rossi, COPD Patients or 'Healthy Smokers': Is IL-8 Synthesis and Release the Borderline?, *Respiration*, 2003, **70**(5), 457–459.
- 30 J. A. Falk, O. A. Minai and Z. Mosenifar, Inhaled and Systemic Corticosteroids in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2008, **5**(4), 506–512.
- 31 K. M. Kew and T. Li, *Long-acting inhaled therapy (beta-agonists, anticholinergics and steroids) for COPD: a network meta-analysis*, 2013.
- 32 C. S. Haworth, D. Bilton and J. S. Elborn, Long-term macrolide maintenance therapy in non-CF bronchiectasis: Evidence and questions, *Respir. Med.*, 2014, **108**(10), 1397–1408.
- 33 R. K. Albert, J. Connett, W. C. Bailey, R. Casaburi, J. A. D. Cooper, G. J. Criner, *et al.*, Azithromycin for Prevention of Exacerbations of COPD, *N. Engl. J. Med.*, 2011, **365**(8), 689–698.
- 34 G. Flores, K. Dastmalchi, A. J. Dabo, K. Whalen, P. Pedraza-Peñalosa, R. F. Foronjy, *et al.*, Antioxidants of therapeutic

- relevance in COPD from the neotropical blueberry *Anthopterus wardii*, *Food Chem.*, 2012, **131**(1), 119–125.
- 35 S.-H. Park, J.-W. Ko, N.-R. Shin, D.-H. Shin, Y.-K. Cho, C.-S. Seo, *et al.*, 4-Hydroxycinnamic acid protects mice from cigarette smoke-induced pulmonary inflammation via MAPK pathways, *Food Chem. Toxicol.*, 2017, **110**, 151–155.
- 36 J. Alamed, W. Chaiyasit, D. J. McClements and E. A. Decker, Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**(7), 2969–2976.
- 37 M. Singh, M. Arseneault, T. Sanderson, V. Murthy and C. Ramassamy, Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**(13), 4855–4873.
- 38 D. Vauzour, G. Corona and J. P. E. Spencer, Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, **501**(1), 106–111.
- 39 B. Janicke, G. Önning and S. M. Oredsson, Differential Effects of Ferulic Acid and p-Coumaric Acid on S Phase Distribution and Length of S Phase in the Human Colonic Cell Line Caco-2, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**(17), 6658–6665.
- 40 R. A. Cazar, An Exercise on Chemometrics for a Quantitative Analysis Course, *J. Chem. Educ.*, 2003, **80**(9), 1026.

Cite this: *Analyst*, 2019, **144**, 5232

Flavonoids induce cell death in *Leishmania amazonensis*: *in vitro* characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy

Morgana V. Araújo,^a Aline C. Queiroz,^b João F. M. Silva,^a Amanda E. Silva,^a João K. S. Silva,^a Girliane R. Silva,^b Elaine C. O. Silva,^c Samuel T. Souza,^c Eduardo J. S. Fonseca,^c Celso A. Camara,^b Tania M. S. Silva^b and Magna S. Alexandre-Moreira^{*a}

Leishmaniasis comprises a group of infectious diseases with worldwide distribution, of which both the visceral and cutaneous forms are caused by *Leishmania* parasites. In the absence of vaccines, efficacious chemotherapy remains the basis for leishmaniasis control. The available drugs are expensive and associated with several secondary adverse effects. Due to these limitations, the development of new antileishmanial compounds is imperative, and plants offer various perspectives in this regard. The present study evaluated the *in vitro* leishmanicidal activity of flavonoids isolated from *Solanum paludosum* Moric. and investigated the mechanisms of cell death induced by them. These compounds were evaluated *in vitro* for their antileishmanial activity against *Leishmania amazonensis* promastigotes and they showed prominent leishmanicidal activity. The EtOAc fraction, gossypetin 3,7,8,4'-tetra-*O*-methyl ether (**1**), and kaempferol 3,7-di-*O*-methyl ether (**3**) were selected to be used in an *in vitro* assay against *L. amazonensis* amastigotes and cell death assays. The flavonoids (**1**) and (**3**) presented significant activity against *L. amazonensis* amastigotes, exhibiting the IC₅₀ values of 23.3 ± 4.5 μM, 34.0 ± 9.6 μM, and 10.5 ± 2.5 μM for the EtOAc fraction, (**1**), and (**3**), respectively, without toxic effects to the host cells. Moreover, (**1**) and (**3**) induced blocked cell cycle progression at the G1/S transition, ultimately leading to G1/G0 arrest. Flavonoid (**3**) also induced autophagy. Using Raman spectroscopy in conjunction with principal component analysis, the biochemical changes in the cellular components induced by flavonoids (**1**) and (**3**) were presented. The obtained results indicated that the mechanisms of action of (**1**) and (**3**) occurred through different routes. The results support that the flavonoids derived from *S. paludosum* can become lead molecules for the design of antileishmanial prototypes.

Received 23rd May 2019,

Accepted 6th July 2019

DOI: 10.1039/c9an00948e

rs.c.li/analyst

Introduction

Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by the protozoa of the genus *Leishmania*, which can affect human beings. Leishmaniasis is considered to be a neglected disease with a major impact on the economically weaker individuals, especially in underdeveloped countries.^{1,2} It is the second main cause of death, after malaria, among parasitic diseases caused by protozoa.³ Despite being a disease affecting millions

of people worldwide, the currently available treatment for leishmaniasis is restricted to a few drugs of the first choice such as pentavalent antimonials, pentamidine, miltefosine, amphotericin B with its derivatives, and paromomycin. The main problem of conventional treatments is the intrinsic or acquired resistance developed by the protozoan. Other restrictions related to the available drugs are a high incidence of adverse effects and toxicity.⁴ The clinical symptoms are diverse and are associated with antigenic differences among the *Leishmania* species in addition to hosting genetic and immunological factors.⁵

Due to the lack of better therapies, the identification of novel drugs, compounds, and targets is of interest to researchers worldwide. Natural products are potential sources of new agents for the treatment of neglected tropical diseases, especially those caused by protozoan parasites.⁶ Various secondary plant metabolites such as quinones, phenolics and

^aLaboratory of Pharmacology and Immunity, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, 57020-720 Maceió, Alagoas, Brazil.
E-mail: suzana.magna@gmail.com

^bPhytochemical Bioprospecting Laboratory, Chemistry Department, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

^cOptics and Nanoscopy Group, Institute of Physics, Federal University of Alagoas, 57072-970 Maceió, Alagoas, Brazil

their derivatives, alkaloids, terpenes, and saponins are beneficial for human beings due to their antiparasitic properties and highly selective mode of action. Furthermore, the skeletons of many metabolites have been successfully used to design more pharmacologically active compounds.⁷

An alternative strategy used against *Leishmania* is the use of natural products. Included in the Brazilian biodiversity, the *Solanum* genus is the best representative of the Solanaceae family with 1400 species⁸ and is characterized by the production of a variety of glycoalkaloids^{9–11} and high occurrence of flavonoids.^{12,13}

Some *Solanum* species have been reported to have anti-inflammatory, sedative, anti-spasmodic, anti-epileptic,¹⁴ hypoglycemic, anti-obesity, cholesterol-lowering,^{15,16} leishmanicidal, and trypanosomal activities.^{17,18} In addition, studies have demonstrated their anticancer activity against hepatoma cells (Hep3B) and tumor cells of lung lines (H441, H520, H661, and H69).^{19,20}

In order to identify the biochemical changes induced by flavonoids in the cell behavior, a combined analysis of Raman spectroscopy and principal component analysis was performed. Raman spectroscopy is a highly sensitive vibrational spectroscopic technique that can provide information about the molecular compositions of biological samples.^{21,22} For example, by the use of Raman spectroscopic analysis, the secondary structure of the promastigote surface protease was determined²³ in addition to the determination of the uptake of nanoparticles by macrophages,²⁴ antibiotic resistance,²⁵ and anticancer drug evaluation.²⁶ Due to the advantages of being noninvasive and nondestructive, this technique has become a useful tool in the identification of the biochemical changes caused by treatments in biological cells.^{27,28} This approach can contribute useful molecular information to assess the effects of flavonoids on cells, which can be applicable to the development of new therapies for the treatment of leishmaniasis.

Therefore, the present study aimed to investigate the leishmanicidal activity, the mechanisms of cell death, and the biochemical changes induced by the flavonoids isolated from *Solanum paludosum* Moric.

Materials and methods

Extraction and isolation of flavonoids

The flavonoids were obtained according to the method reported by Silva *et al.*¹² A fraction of the flavonoid mixture (532.5 mg) obtained from the aerial parts of *S. paludosum* was purified by semipreparative high-pressure liquid chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD). HPLC was conducted using a Shimadzu Prominence chromatograph model CMB-20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a UV-Vis detector (SPD-20A), column oven (CTO-20A), solvent pump (LC-20AD), and Luna Phenomenex C-18 column (21 mm × 250 mm × 5 μm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). The solvents H₂O (A) and

methanol : acetonitrile (1 : 1, B) were used as the mobile phase. Methanol and acetonitrile were obtained from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), and MilliQ water was used in the following gradient elution: from 0–5 min, 65% B; 5–15 min, 70% B; 15–30 min, 75%; 30–32 min, 100% and detection at 320 nm at a flow rate of 16 mL min⁻¹. Five principal flavonoids were isolated: 1 (30.0 mg), 2 (25.0 mg), 3 (29.0 mg), 4 (18.8 mg), and 5 (30.0 mg).

The purity of the compounds was examined by ultra-high pressure liquid chromatography along with quadrupole time of flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS/MS) HPLC-DAD-qTOF-MS. The XEVO-G2XSQTOF mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) was connected to the ACQUITY UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) *via* an electrospray ionization (ESI) interface. Chromatographic separation of the compounds was performed on ACQUITY UPLC with a conditioned autosampler at 4 °C using an Acquity BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm particle size) (Waters, Milford, MA, USA). The column temperature was maintained at 40 °C. The mobile phase consisting of water with 0.1% formic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) was pumped at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The gradient elution program was as follows: 0–8 min, 10–80% B; 9–1 min, 80–100% B. The injection volume was 5 μL. MS analysis was performed on Xevo G2 QTOF (Waters MS Technologies, Manchester, UK), a quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer coupled with an electrospray ionisation source in the positive ion mode. The scan range was from 50 to 1200 *m/z* for data acquisition. In addition, the MS^E experiments were carried out, which allowed both the precursor and production data to be acquired in one injection. The source conditions were as follows: capillary voltage, 3.0 kV; sample cone, source temperature, 120 °C; desolvation temperature 450 °C; cone gas flow rate 50 L h⁻¹; desolvation gas (N₂) flow rate 800 L h⁻¹. All analyses were performed using the lock spray, which ensured accuracy and reproducibility. Leucine-enkephalin (5 ng mL⁻¹) was used as a standard or reference compound to calibrate the mass spectrometers during analysis and was introduced by a lock spray at 10 μL min⁻¹ for accurate mass acquisition. All the acquisition and data analyses were controlled using the Waters MassLynx v 4.1 software.

Parasites

L. amazonensis [MHOM/BR/77/LTB0016] strain was maintained *in vitro* as proliferating promastigotes at 26 °C in Schneider's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), gentamycin (1 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich), L-glutamine (2 mM) (Sigma-Aldrich), and 2% sterile human urine. In the culture, the promastigote forms were cultured extracellularly and took an estimated 7 days to complete their life cycle. After the third day, the promastigote forms were in the exponential phase of growth and then, they were used in the third passage, a phase in which the parasites could infect the macrophages in the assay of *in vitro* infection.

Animals

Swiss mice (six-to-eight weeks old) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Alagoas in order to obtain the peritoneal macrophages. These studies were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Federal University of Alagoas (Brazil) (protocol no. 2015.01).

Macrophages

Peritoneal macrophages were obtained from Swiss mice (weighing 20–25 g) through peritoneal lavage with 10 mL of cold PBS (Phosphate-Buffered Saline; 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄ (Vetec Química fina), 2.7 mM KCl (Vetec Química fina), 1.5 mM KH₂PO₄ (Vetec Química fina), pH 7.0). The peritoneal exudate cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 min and the pellet was resuspended in an RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, gentamycin (1 mg L⁻¹), L-glutamine (2 mM), and sodium pyruvate solution (2 mM) (Sigma-Aldrich). The cells were then counted and seeded into 96-well plates for the cytotoxicity assay and into 24-well plates for the intracellular amastigote assay.

Cytotoxicity assay using the macrophages

Peritoneal macrophages were seeded (3×10^4 cells per well) in 96-well plates containing 100 μ L of media. The cells were allowed to attach to the bottom of the well for 24 h at 37 °C and then treated with different concentrations (1, 10, and 100 μ M) of flavonoids or pentamidine (Sigma-Aldrich) previously diluted in RPMI-1640 medium with dimethyl sulfoxide (0.1% DMSO) (Sigma-Aldrich). The plates were maintained in a 5% CO₂ incubator at 37 °C for 48 h. The cells were also cultured in media free from compounds, a vehicle (basal growth control), or media with 0.1% DMSO (vehicle control). Thereafter, the supernatant was removed and the cells were incubated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) (100 μ L per well) for 1 h in the dark at 37 °C. The MTT solution was then removed, the cells were resuspended in 100 μ L of DMSO, and the absorbance was measured using an ELISA reader at 550 nm.

Leishmanicidal activity assay

L. amazonensis promastigotes (2×10^6 cells per mL) were maintained *in vitro* in Schneider's medium supplemented with 10% FBS and 2% human urine in the presence of various concentrations of flavonoids and pentamidine (0.1, 1.0, 10, and 100 μ M) for 48 h at 26 °C. The cells were also cultured in media free from compounds (basal growth control) or with 0.1% DMSO (vehicle control). The promastigotes were adjusted to a concentration of 10^2 cells per mL in PBS and the viable cells were counted in a Neubauer's chamber.

Intracellular amastigote assay

Peritoneal cavity macrophages of Swiss mice were seeded on glass coverslips (13 mm diameter) in 24-well plates and incu-

bated at 37 °C with 5% CO₂ for 12 hours for adhesion. The macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes using a ratio of 1 : 10 at 37 °C overnight in isolated experiments. Non-internalized promastigotes were removed by washing (three times) with PBS. The infected macrophages were treated with concentrations of 0.1, 1.0, and 100 μ M of the EtOAc fraction, (1), and (3) flavonoids and maintained at 37 °C in 5% CO₂ for 48 h. The glass coverslips were fixed with methanol and stained with May-Grünwald-Giemsa (Sigma-Aldrich) and then, the intracellular amastigotes were counted (one hundred macrophages were evaluated per glass coverslip). The data were expressed as the infection index (percentage of infected macrophages multiplied by the average number of amastigotes per macrophage).

Cell cycle analysis

The cell cycle assay was performed according to the instructions of the Muse® Cell Cycle Kit. *L. amazonensis* promastigotes (10^5 cells per mL) were treated with pentamidine, (1), and (3) at a concentration of 100 μ M for 48 h. After the incubation period, the cells were centrifuged and the pellets were resuspended in 1 mL of PBS supplemented with 1% FBS to wash the cells; then, they were fixed with 70% ethanol for 3 hours at -20 °C. After fixation, 200 μ L of each cell suspension was centrifuged and washed with PBS, and the pellets were resuspended in 200 μ L of Muse® Cell Cycle reagent. After incubation for 30 min at room temperature and protection from light, data acquisition was carried out by flow cytometry on a Muse® Cell Analyzer and analyzed using the Muse™ 1400 Analysis software.

Analysis of phospholipid externalization in *L. amazonensis* promastigotes by flow cytometry

The quantification of the percentage of parasites undergoing apoptosis or necrosis was performed according to the instructions of the Annexin Muse® & Dead Cell Kit. Exponential-phase *L. amazonensis* promastigotes (10^5 cells per mL) were incubated with pentamidine, (1), and (3) (10 μ M and 100 μ M for 48 h). After the incubation period, the cells were centrifuged and resuspended in PBS supplemented with 1% FBS to wash the cells. Subsequently, 100 μ L of each cell suspension was incubated with 100 μ L of the reagent containing Annexin V-PE and 7-AAD for 30 min at room temperature with protection from light. Data acquisition was carried out by flow cytometry on a Muse® Cell Analyzer and the analysis was performed using the Muse® 1400 Analysis software.

Determination of caspase-like proteases

To determine the percentage of caspase-positive cells, the Muse® Multicaspase kit was used to perform the analysis according to the instructions of the manufacturer. *L. amazonensis* promastigotes were grown to the concentration of 10^5 cells per mL and then treated with pentamidine, (1), and (3) at a concentration of 100 μ M and incubated at 26 °C. After 48 h, 1 mL of the cell culture was pelleted and resuspended in 1 mL of PBS buffer supplemented with 1% FBS.

Muse® Multicaspase Reagent followed by 7-AAD was added. Data acquisition was carried out using a Muse® Cell Analyzer and analyzed using the Muse® 1400 Analysis software.

Assay of autophagy

The determination of autophagy induction was performed according to the instructions of the Muse® Autophagy LC3-based antibody kit. *L. amazonensis* promastigotes (5×10^4 cells per mL) were incubated with pentamidine, (1) and (3) at a concentration of 100 μ M for 48 h. After the incubation period, the contents of each well were transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged, and the pellets were resuspended in PBS supplemented with 1% FBS to wash the cells. Subsequently, the content was treated with reagent autophagy A for 3 hours at 37 °C. Each cell suspension was then centrifuged and the pellet was resuspended in 200 μ L of a solution containing reagent autophagy B and anti-LC3 Alexa Fluor®555. After 30 min of incubation on ice and protection from light, the tubes were centrifuged and the pellets were resuspended in the assay buffer. Data analysis was performed using the Muse® 1400 Analysis software.

Raman spectroscopic measurements

Raman spectroscopy was performed on infected macrophages according to the methodology described in "Intracellular Amastigote Assay"; however, the fixation process was with 4% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) for 5 min. Raman spectra were obtained using a Horiba XploRA spectrometer coupled to an Olympus microscope and equipped with a 532 nm laser that was focused on the nucleus of the cells through a 100 \times objective lens (NA = 0.9). The same objective lens was used for collecting the Raman scattered light after interaction with the sample in a backscattering geometry. The frequency calibration was set by the reference to the 520 cm^{-1} vibrational band of a silicon wafer. Under the same conditions, 50 cell spectra for each group were obtained in the spectral range from 800 to 1800 cm^{-1} . In order to minimize the laser-induced heating of the specimens, a lower power irradiation at the sample surface was used of about 5 mW for a short exposure time (1 s laser exposure for 15 accumulations). The diffraction grating used had 1200 lines per millimeter, and the spectral resolution of the system was 1.5 cm^{-1} .

Data preprocessing and spectral analysis

Before conducting the spectral analysis, all the spectra were smoothed, background-adjusted, and normalized using an algorithm implemented in the MatLab software. After removing the fluorescence background from the spectra, principal component analysis (PCA) was performed. PCA is a multivariate technique that transforms the given data into a set of new orthogonal variables called the principal components (PCs), which are responsible for the significant spectral variation. This technique extracts the important information from the data and identifies the patterns that reveal the main characteristics of the analyzed set. The PCs are ordered so that the first few retain most of the variations present in all of the

original variables. Each successive component accounts for the residual variance that is not captured by the previous component and so on.²⁹ Usually, most of the variance is contained in the first three principal components (PC1, PC2, and PC3). PCA is a suitable statistical method for biological samples due to its successful applications in cell sorting.^{30,31}

Statistical analysis

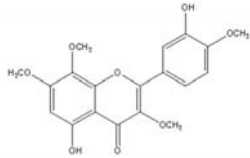
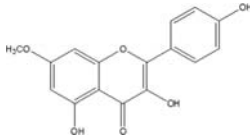
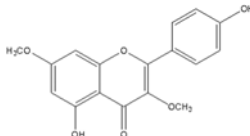
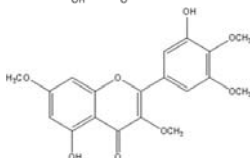
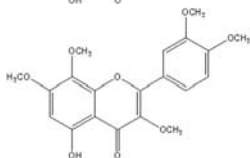
Data were expressed as the mean \pm S.E.M. and significant differences between the treated and control groups were evaluated using ANOVA and Dunnett's *post-hoc* tests using the Graph Pad Prism 5.0 software; 95% confidence intervals were also included.

Results

Chemistry

The chemical study of the fraction of flavonoids obtained from the aerial parts of *S. paludosum* resulted in the characterization of five flavonoids by UPLC-DAD-TOF-MS/MS. Five principal compounds (1–5, Table 1) were isolated and the structures of 1, 2, 3, and 5 were compared with the patterns of flavonoids previously isolated from *S. paludosum*.^{12,13} The flavonoid 4 was

Table 1 Chemical data of flavonoids 1–5. 3,7,3',4'-Tetra-*O*-methyl myricetin (4) ion at m/z 389.1230 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{20}H_{21}O_8$, 389.1230) and gossypetin 3,7,8,3',4'-penta-*O*-methyl ether (5) 389.1230 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{20}H_{21}O_8$, 389.1230)

Compounds	Molecular weight (g)	Chemical name
1 	300	Gossypetin 3,7,8,4'-tetra- <i>O</i> -methyl ether
2 	374	Kaempferol 7- <i>O</i> -methyl ether
3 	314	Kaempferol 3,7-di- <i>O</i> -methyl ether
4 	360	Myricetin 3,7,3',4'-tetra- <i>O</i> -methyl ether
5 	388	Gossypetin 3,7,8,3',4'-penta- <i>O</i> -methyl ether

identified by various spectroscopies (UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, 2D NMR, and MS), and it was readily identified by the direct comparison of its spectroscopic data with the literature data.³² This flavonoid is being reported for the first time in the *Solanum* genus.

The structures of the known isolated compounds were confirmed by their HR-ESI-MS spectra as gossypetin 3,7,8,4'-tetra-*O*-methyl ether (1) ion at m/z 375.1072 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_8$, 375.1074), kaempferol 7-*O*-methyl ether (2) ion at m/z 301.0707 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_6$, 301.0706), kaempferol 3,7-di-*O*-methyl ether (3) ion at m/z 315.0565 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_6$, 315.0863), myricetin 3,7,3',4'-tetra-*O*-methyl ether (4) ion at m/z 389.1230 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_8$, 389.1230), and gossypetin 3,7,8,3',4'-penta-*O*-methyl ether (5) 389.1230 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_8$, 389.1230).

Viability of peritoneal macrophages

The effect of the EtOAc fraction and flavonoids of *S. paludosum* on murine peritoneal macrophages was assessed by quantitative colorimetric MTT assays after 48 h of incubation. The macrophages were treated with flavonoid compounds (1, 10, and 100 μM) to investigate the potential toxic effects on mammalian cells. Table 2 shows the results for the flavonoid compounds and pentamidine (reference standard drug). Pentamidine and only flavonoid (3) showed the same deleterious activity to the host cells, as evidenced by the MTT assay, with the maximum cytotoxicities of $72.1 \pm 4.8\%$ and $47.9 \pm 8.2\%$, respectively. However, flavonoid (3) exhibited a CC_{50} value (the concentration that causes 50% of the cytotoxicity in macrophages) greater than the maximum concentration tested; the standard drug pentamidine, on the other hand, showed CC_{50} of $68.2 \pm 3.8 \mu\text{M}$.

In vitro evaluation of the antipromastigote activity of flavonoids

An initial screening was carried out to evaluate and compare the *in vitro* leishmanicidal profiles of the flavonoid compounds

and pentamidine against the proliferation of the exponentially growing promastigote form of *L. amazonensis*. The maximum effects and the IC_{50} values (concentrations causing 50% inhibition of promastigote growth) were used as parameters for leishmanicidal activity (Table 2). After 48 h of incubation, the EtOAc fraction and the isolated compounds (1), (2), and (3) exhibited antileishmanial activities against *L. amazonensis* promastigotes with maximum effects of $84.3 \pm 5.5\%$, $82.6 \pm 7.6\%$, $48.8 \pm 1.7\%$, and $83.7 \pm 2.6\%$, respectively. The EtOAc fraction, (1), and (3) exhibited the IC_{50} values of $63.0 \pm 2.3 \mu\text{M}$, $44.0 \pm 6.0 \mu\text{M}$, and $54.2 \pm 2.2 \mu\text{M}$, respectively; they were as potent and effective as pentamidine (with the efficacy of $90.4 \pm 5.5\%$ and IC_{50} of $24.3 \pm 5.3 \mu\text{M}$) against *L. amazonensis* promastigotes. In contrast, (4) and (5) did not present activity against the promastigote form of *L. amazonensis* up to 100 μM (Table 2). Based on the viability of the macrophage cells and *L. amazonensis* promastigotes, it was possible to calculate the selectivity index (SI) of the compounds (Table 2). Thus, when comparing the SI values of the macrophage and *L. amazonensis* promastigote, the flavonoids (2), (4), and (5) did not show selectivity for *L. amazonensis*. In addition, the EtOAc fraction and flavonoids (1) and (3) were probably selective for *L. amazonensis*; however, as their CC_{50} values were not determined, it was not possible to calculate SI for *L. amazonensis*. Pentamidine showed 2.81 times more selectivity for the parasites (Table 2).

In vitro evaluation of the antiamastigote activity of flavonoids

The EtOAc fraction, (1), and (3) were selected for testing against the amastigote forms for displaying the best data with the activity against the promastigotes of the two tested *Leishmania* species. In this study, the EtOAc fraction, (1), and (3) inhibited the amastigote growth with the maximum efficacy values of $85.6 \pm 0.0\%$, $72.2 \pm 13.7\%$, and $88.8 \pm 0.9\%$, respectively. The EtOAc fraction, (1), and (3) exhibited the IC_{50} values of $23.3 \pm 4.5 \mu\text{M}$, $34.0 \pm 9.6 \mu\text{M}$, and $10.5 \pm 2.5 \mu\text{M}$, respectively (Table 3).

Table 2 Effect of pentamidine, EtOAc fraction, and flavonoid compounds (1–5) of *S. paludosum* against the macrophages or the promastigote form of *L. amazonensis*

Substances	Peritoneal macrophages		<i>L. amazonensis</i> promastigotes		
	CC_{50}^a (μM)	Maximum cytotoxicity ^b (%)	IC_{50}^a (μM)	Maximum effect ^b (%)	SI ^c
Pentamidine	68.2 ± 3.8	$72.1 \pm 4.8^{**}$	24.3 ± 5.3	$90.4 \pm 5.5^{***}$	2.81
EtOAc fraction	>100	ND	63.0 ± 2.3	$84.3 \pm 5.5^{***}$	>1.19
(1)	>100	ND	44.0 ± 6.0	$82.6 \pm 7.6^{***}$	>2.27
(2)	>100	ND	>100	$48.8 \pm 1.7^{**}$	—
(3)	>100	$47.9 \pm 8.2^*$	54.2 ± 2.2	$83.7 \pm 2.6^{***}$	>1.84
(4)	>100	ND	>100	NA	—
(5)	>100	ND	>100	NA	—

^a Cytotoxic Concentration 50 (CC_{50}) calculated by the concentration-response curves. ^b Maximum Cytotoxicity or Maximum Effect (ME) is expressed as a mean \pm standard error of maximum toxicity, average of the triplicates of a representative experiment. ^c Selectivity Index (SI) calculated from the ratio of CC_{50} values of the macrophage and IC_{50} of the promastigotes. (—): Substance does not have a deleterious effect on the macrophage or *Leishmania*. The values of cytotoxicity or maximum effect were considered significant when $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$ compared to the DMSO group. ND: Not determined. Maximum Cytotoxicity to cell until the concentration of 100 μM compared to the DMSO group. NA: compound is not active.

Table 3 Leishmanicidal activity of the flavonoid compounds against the growth of amastigotes of *L. amazonensis*

Treatment	IC ₅₀ ^a (μM)	Efficacy ^b (%)
Pentamidine	6.4 ± 0.1	99.91 ± 0.04***
EtOAc fraction	23.3 ± 4.5	85.6 ± 0.0***
(1)	34.0 ± 9.6	72.2 ± 13.7***
(3)	10.5 ± 2.5	88.8 ± 0.9***

Data are reported as the mean ± standard error of the mean, S.E.M. ^aIC₅₀ is the concentration required to cause 50% inhibition. ^bThe efficacy values were considered significant when **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 compared to the 0.1% DMSO group.

Cell cycle analysis

After the *in vitro* leishmanicidal activity of (1) and (3) was characterized, other studies were conducted to investigate the mechanism of cell death by these compounds. The *Leishmania* cell cycle was analyzed by flow cytometry after treatment with pentamidine, (1), and (3) at a concentration of 100 μM for 48 hours (Fig. 1). The analysis of the cell population in different cell cycle phases was possible after staining with 7-AAD and subsequent analysis by flow cytometry. In Fig. 1, it is observed that pentamidine, (1), and (3) can induce changes in the cell cycle (in the G₀/G₁, S, and G₂/M phases) of *L. amazonensis* promastigotes after 48 h of treatment.

Analysis of externalized phosphatidylserine (PS)

In order to determine the mechanism by which the flavonoid compounds exert their antiproliferative activity against the parasites, flow cytometric analyses using Annexin V-PE and 7-AAD were performed to investigate the externalization of phospholipids or the rupture of the cytoplasmic membrane. As demonstrated in Fig. 2, flavonoids (1) and (3) do not induce cell death through the induction of necrosis or apoptosis in *L. amazonensis* promastigotes after 48 h of incubation at the concentrations of 10 and 100 μM. Additionally, the caspase-like activation did not occur in the promastigotes treated with flavonoids (1) or (3) at 100 μM for 48 hours (Fig. 3).

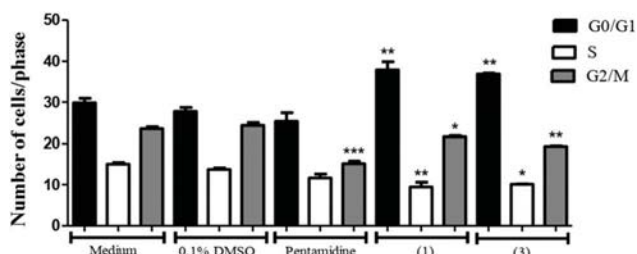


Fig. 1 Cell cycle distribution of *L. amazonensis* promastigotes. Analysis using flow cytometry after treatment with 10 μM pentamidine and 100 μM (1) and (3) flavonoids for 48 h. Values represent means ± SEMs for three samples.

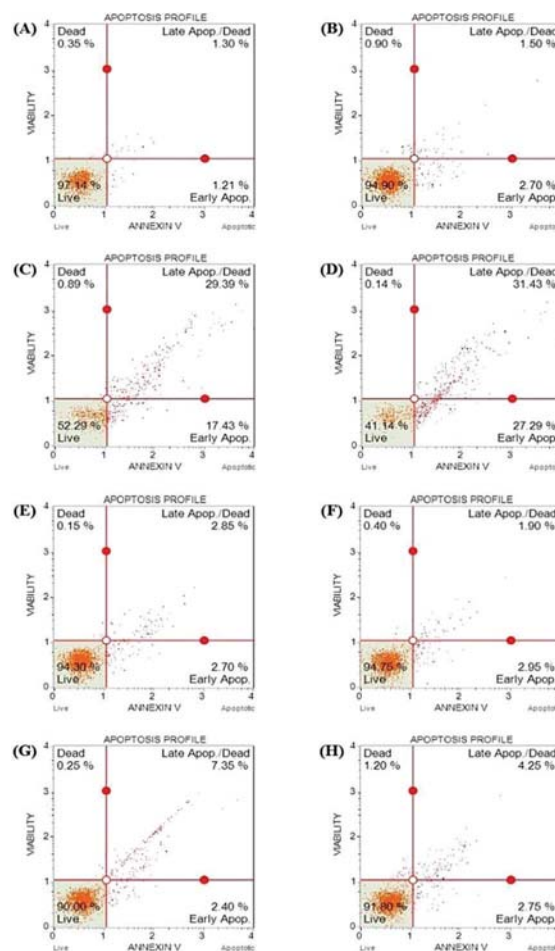


Fig. 2 Phospholipid externalization of *L. amazonensis* promastigotes. Analysis using flow cytometry after treatment with 10 and 100 μM pentamidine and flavonoids (1) and (3) for 48 h. (A) Medium; (B) 0.1% DMSO; (C) 100 μM pentamidine; (D) 10 μM pentamidine; (E) 100 μM (1); (F) 10 μM (1); (G) 100 μM (3); (H) 10 μM (3).

Detection of autophagy by flow cytometry

Next, we evaluated the induction of autophagic cell death in *L. amazonensis* promastigotes treated with (1) and (3) at a concentration of 100 μM for 48 hours. The treatment with (3) altered the mean of autophagy intensity in the promastigotes, showing that the antiproliferative activity of these compounds is probably also the result of an exacerbated autophagic process (Fig. 4).

Raman spectra of the macrophages infected with *L. amazonensis*

Through a Raman spectrum, it is possible to evaluate the responses induced by the treatments in cells and identify the most important spectral differences among the cell groups. The main bands observed in the spectra of the cells were in the regions corresponding to the C–C stretching of the proline ring at 920 cm⁻¹, the phenylalanine peaks at 1002 and 1030 cm⁻¹, the DNA phosphodiester group PO₂⁻ symmetric stretching at 1095 cm⁻¹, a band centered at 1240 cm⁻¹ related

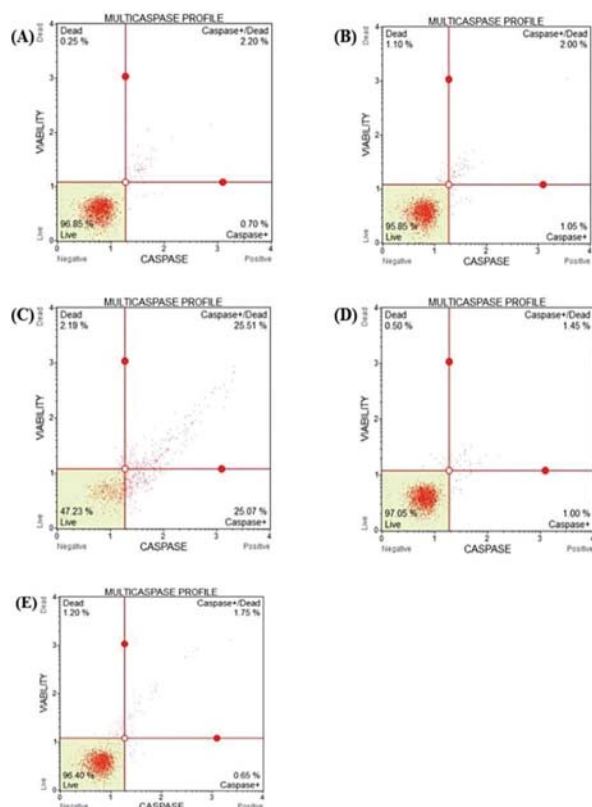


Fig. 3 Determination of the presence of active caspase-like proteases in *L. amazonensis* promastigotes. Analysis using flow cytometry after treatment with 100 μM pentamidine and flavonoids (1) and (3) for 48 h. (A) Medium; (B) 0.1% DMSO; (C) 100 μM pentamidine; (D) 100 μM (1); (E) 100 μM (3).

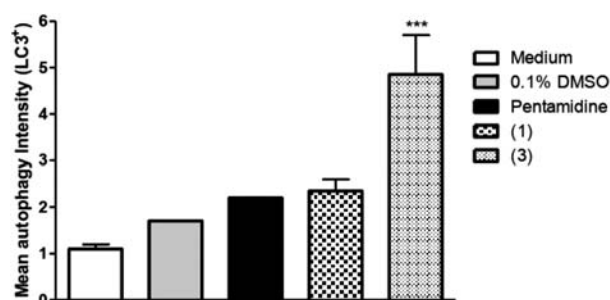


Fig. 4 Determination of the presence of autophagic LC3^+ in *L. amazonensis* promastigotes incubated with pentamidine and flavonoids (1) and (3) (100 μM) for 48 h and analyzed by flow cytometry. Values represent means \pm SEMs for three samples.

to RNA, the corresponding vibrations of the DNA bases adenine and guanine at 1317 and 1578 cm^{-1} , the 1446 cm^{-1} band corresponding to the C–H deformation vibrations, and the vibrations in the amide I band centered at 1657 cm^{-1} . The Raman band assignments used in the interpretation of the spectral features were carried out based on the published literature.³³

The spectral regions with the most significant variations were pointed out based on the calculated spectral difference between the cell groups. As illustrated in Fig. 5(A), the Raman spectra of the cells cultured in the medium free from compounds and those with 0.1% DMSO displayed similar patterns, indicating that these cell groups have very similar spectral characteristics. The differences between the Raman spectra of the DMSO group cells and pentamidine group cells can be seen in Fig. 5(B). The spectral changes can be observed in practically the entire analyzed region. The peaks at 920, 1002, 1030, 1446, and 1657 cm^{-1} correspond to proteins, whereas the peaks at 1095, 1240, 1317, and 1578 cm^{-1} correspond to nucleic acids. The differences in these regions indicate that there are variations in the amounts of proteins and nucleic acids among the cells.

In Fig. 5(C), it is observed that among the DMSO group cells and the cells treated with flavonoid (1), the main variations also occur in a large part of the analyzed spectral region. The cells treated with flavonoid (1) showed a smaller amount of proteins, as indicated by the less intense peaks at 1002, 1030, 1446, and 1657 cm^{-1} . Although the peak at 1578 cm^{-1} increased slightly, the amount of nucleic acids in the cells treated with flavonoid (1) seemed to be smaller, as indicated by the less intense peaks at 1240 and 1317 cm^{-1} . Important spectral variations were also observed in the differ-

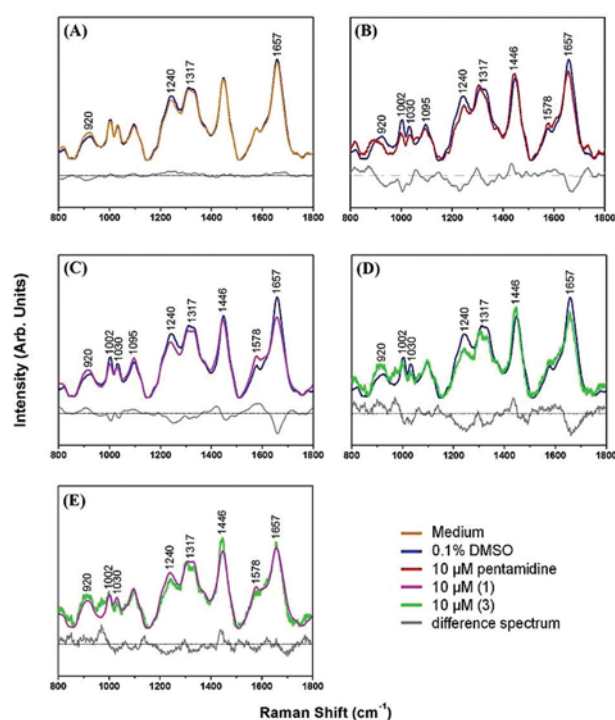


Fig. 5 Raman spectra of macrophages infected with *L. amazonensis* exposed to different treatments. The Raman spectra are the averages of 50 cells for each group in the fingerprint region (800–1800 cm^{-1}). (A) 0.1% DMSO and Medium; (B) 0.1% DMSO and 10 μM pentamidine; (C) 0.1% DMSO and 10 μM (1); (D) 0.1% DMSO and 10 μM (3), and (E) 10 μM (1) and 10 μM (3). The gray lines represent the computed difference spectrum between the cell groups.

ence spectrum of the cells of the DMSO group and the cells treated with flavonoid (3), as can be observed in Fig. 5(D). Among the regions with the highest spectral variations are the bands at 920, 1002, 1030, 1446, and 1657 cm^{-1} , corresponding to proteins, and the bands at 1240 and 1317 cm^{-1} related to nucleic acids. The spectrum of the cells treated with flavonoid (3) showed considerable decrease in the intensity of the peaks corresponding to the nucleic acids. This indicates that the DNA of these cells was lowered greatly.

Finally, as shown in Fig. 5(E), an analysis was performed between the cells treated with flavonoids (1) and (3). The most significant spectral variations occurred in the following regions: 920, 1030, 1446, and 1657 cm^{-1} (corresponding to proteins) and 1240, 1317, and 1578 cm^{-1} (corresponding to nucleic acids). The decrease in the intensity of the peaks corresponding to the nucleic acids in the cells treated with flavonoid (3) reiterates the results reported in Fig. 5(D) and may indicate cell death.

Spectral classification based on PCA

The small differences observed in the Raman spectra may be sufficient to differentiate and classify the different groups of cells. Through multivariate statistical methods, it was possible to make this differentiation and prove that the treatments had in fact affected the cellular biochemical composition. Herein, PCA was used for the classification of the cellular groups and interpretation of the spectral data. As seen in Fig. 6(A), the cells of the DMSO group (blue dots) can be separated from the cells of the Medium group (orange dots) by the first two PCs. This demonstrates that even in the groups of cells where the spectral characteristics are quite similar, PCA can successfully classify the samples. The first two PCs explained 51% of the

variance of the original data set, with PC1 describing 37% and PC2 describing 14% of the total variance.

The distribution of the cells of the DMSO, pentamidine (red dots), and flavonoid (1) (pink dots) groups is observed in Fig. 6(B). The cells were classified based on the first two PCs, which explained 59% of the total variance. Based on the distribution presented, the pentamidine treatment caused a large dispersion of the samples, indicating that in this group, there are cells quite different from each other. A region of overlap can also be observed for the samples under treatment, indicating that although there are significant differences between the groups, many spectra were similar. An analogous comparison between the cells of the DMSO, pentamidine, and flavonoid (3) (green dots) groups is presented in Fig. 6(C). The first two PCs explained 52% of the variance of the original data set, with PC1 describing 30% and PC2 describing 22%. In this analysis, it was observed that both treatments caused great dispersion of the samples, evidencing quite different spectra within each of the groups.

The PCA score plots presented in Fig. 6(D) show the distribution of the cells of the DMSO and (1) and (3) flavonoid groups. The first two PCs used in this comparison accounted for 64% of the variance of the original data set. The distribution presented evidenced the spectral differences among the groups exposed to the treatments, corroborating with the results of the analyses of flow cytometry, which demonstrated that the flavonoids (1) and (3) have different mechanisms of action. The grouping of the samples into three clusters indicated that the systematic differences between the Raman spectra can be revealed easily by PCA.

Discussion

Considering the low efficacy of the available drugs for the treatment of leishmaniasis as well as their side effects and the resistance developed by parasites, research using natural products, mainly due to the properties of the bioactive compounds found in the crude extracts of medicinal plants, may lead to the discovery of new therapies with high efficiency, which are cheap and safe for patients.³⁴ Hence, the purpose of this research was to study the antileishmanial effects of the flavonoid compounds isolated from the EtOAc fraction of *S. paludosum* and to investigate the mechanisms involved in cell death.

Previous studies with *Solanum* species have demonstrated various pharmacological activities, including activity against trypanosomatids, such as *L. amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*.^{17,18} In this study, the flavonoids showed pronounced leishmanicidal activity against the promastigotes of *L. amazonensis* with emphasis on the EtOAc fraction and flavonoids (1) and (3), which have also exhibited leishmanicidal activity against promastigotes of *L. chagasi* (data not show).

The activities of the compounds against promastigotes and amastigotes can differ depending on the targets of the antileishmanial action, which may be selective for one of the two

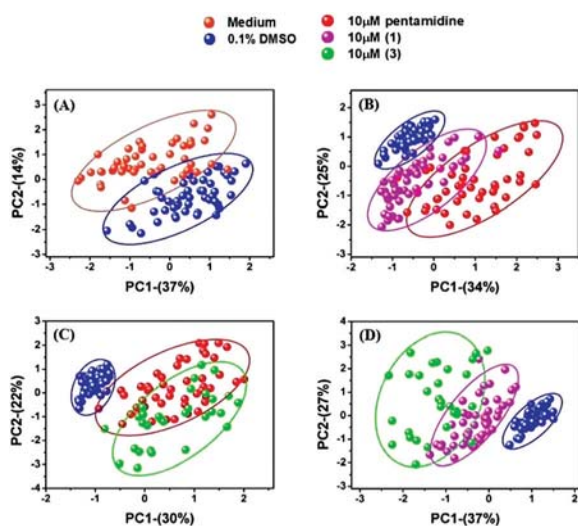


Fig. 6 Principal component analysis (PCA) of the macrophages infected with *L. amazonensis*. PCA score plots for (A) 0.1% DMSO and Medium; (B) 0.1% DMSO, 10 μM pentamidine, and 10 μM (1); (C) 0.1% DMSO, 10 μM pentamidine, and 10 μM (3); and (D) 0.1% DMSO, 10 μM (1), and 10 μM (3).

developmental forms. Overall, promastigotes may be more sensitive than intracellular amastigotes because amastigotes are adapted to survive in a hostile intracellular environment as well as due to the fact that the compounds have direct contact with promastigotes. In contrast, in order to have anti-amastigote activity, the substances must be capable of crossing the membrane of the host cell. The EtOAc fraction and flavonoids (1) and (3) were then subjected to the amastigote assay and besides the observed efficacy, they were found to be highly potent against the growth of *L. amazonensis* amastigotes, exhibiting the IC₅₀ values of 23.3 ± 4.5 μM (EtOAc fraction), 34.0 ± 9.6 μM (1 flavonoid), and 10.5 ± 2.5 μM (3 flavonoid). The data corroborated the results reported by Wong *et al.*,^{35,36} they tested the flavonoid dimers and found potent leishmanicidal activity similar to the results observed by Abreu-Miranda *et al.*,¹⁸ who tested the glycoalkaloids isolated from *S. lycocarpum* against the promastigotes of *L. amazonensis*.

In addition, there are few studies about flavonoids (1) and (3). It was found that the flavonoid (1) was isolated from *Fagoniaboveana*³⁷ and *Ricinocarpusstylosus*.³⁸ It was also demonstrated that this flavone did not induce the activation of apoptosis as it did not present antitubulin activity in HL60 cells.³⁹ In the case of flavonoid (3), this flavonolaglycone was isolated from *Siparunagigantotepala*⁴⁰ and *Cistus ladanifer*.⁴¹ Thus, this paper demonstrated the leishmanicidal activity of these flavonoids for the first time.

Although a screening for leishmanicidal activity is important to select promising substances, understanding the mechanism of action by which they inhibit the parasitic growth or cause parasite death is necessary to find specific targets. In the cell cycle assay, flavonoids (1) and (3) induced significant increase in the proportion of cells in the G0/G1 phase, a stage of cell cycle which cells have split and the cells have only one copy of their DNA. These treatments significantly decreased the proportion of promastigotes at the S and G2/M phases. These data suggest that there is accumulation of cells in the G0/G1 phase due to prolonging of the G1 phase or arrest of cell cycle progression through the G1/S restriction point. Other studies also reported the induction of arrest in the G0/G1 phase by leishmanicidal compounds. For example, the dibenzalacetone treatment changed the profile of the cell cycle with an increase in the G0/G1 population associated with the decrease in the S (synthesis) and G2/M phases of the *L. donovani* promastigotes.⁴²

Morphological, biochemical, or molecular changes lead to parasite death or prevent parasite proliferation.⁴³ The cell death pathways can be generally classified into apoptosis, necrosis, and exacerbation of the autophagic processes.⁴⁴ To determine the way by which the tested flavonoids exert their antiproliferative activity, flow cytometry analysis was performed using annexin V-PE to investigate the externalization of phospholipids, a typical characteristic of apoptosis in *Leishmania*.⁴⁵

Lipids are essential for the structural and functional integrity of cells. As the predominant constituents of cellular membranes, lipids compartmentalize the cellular functions and are involved in various aspects of signal transduction.⁴⁶ Some

changes in the lipid distribution generally trigger a physiological event such as the clearance of apoptotic cells or the internalization of viruses by the host cells. Therefore, the externalization of phospholipids may indicate apoptotic death.^{47,48} The binding of annexin V to the cell surface of *Leishmania* parasites is therefore likely to be a consequence of the changes in the plasma membrane lipid arrangement. In this study, flavonoids (1) and (3) at the concentration of 100 μM did not cause cell death through the induction of apoptosis in *L. amazonensis* promastigotes after 48 h of incubation. Intriguingly, it was observed that the parasites treated with pentamidine at 10 μM presented a higher percentage of cells in early apoptosis than that for the treatment at 100 μM. In parallel, the treatment with this reference antileishmanial drug at both concentrations also presented analogous effects in the induction of late apoptosis (the results were not significantly different). Thus, pentamidine is a potent antileishmanial drug; at 100 μM, it induced apoptosis in promastigotes. However, there was reduction in the element counts recorded by a flow cytometer in this treatment due to the high fragmentation of the parasitic cells. Moreover, pentamidine has been employed as a positive control to induce the apoptotic killing of the *Leishmania* parasites, but the exact mechanism by which this drug exerts its cytotoxic effect has not yet been fully elucidated, disregarding the identification of several molecular targets of pentamidine in the scientific literature.^{49–54} Logically, the elevation of concentration may also cause loss of selectivity of the compound for other systems; for example, to inhibit topoisomerase II, another target of this drug acts on the DNA synthesis. These hypotheses explain how the treatment at 10 μM induced earlier apoptosis than that at the concentration of 100 μM, but other studies are needed to understand these findings.

Unlike a necrotic cell, which presents membrane rupture and release of intracellular content, a cell undergoing apoptosis is rapidly phagocytosed by tissue cells or phagocytes such as macrophages. Death by apoptosis can be triggered by various stimuli ranging from stress on intracellular organelles to receptor-mediated signalling. An important characteristic of this process is the activation of several cysteine proteases known as caspases. The proteolytic cleavage of different cell substrates by caspases determines the main characteristics of the process of cell death by apoptosis.⁵⁵ The pharmacological manipulation of apoptosis and caspases may have clinical applications and is a new frontier in the development of novel approaches to treat human diseases. In our study, we observed that flavonoids (1) and (3) did not cause caspase activation, which corroborated with our previous results about apoptosis.

Autophagy is a physiological process characterized by lysosome-mediated degradation and recycling of proteins and other cytoplasmic components; however, when it is exacerbated, autophagy is associated with the development of cell death.^{56,57} In this regard, we evaluated autophagy induction in the promastigote forms of *L. amazonensis* treated with flavonoids (1) and (3). From these observations, it was seen that flavonoid (3) was capable of inducing autophagy at the concen-

tration of 100 μM , therefore indicating the contribution of this process for the leishmanicidal activity of this flavonoid. Other studies also reported the induction of autophagic cell death in response to leishmanicidal compounds.^{58,59} However, it is not clear whether autophagy regulates the G1/G0 cell cycle arrest in *Leishmania* sp. In fucoxanthin-treated HeLa cells, it was reported to be dose-responsively cytotoxic and G0/G1 arrest occurred without apoptosis change; autophagy-based cytotoxicity was found to involve the inhibition of the Akt/mTOR signaling pathway.⁶⁰

Raman spectroscopy is a technique widely used to noninvasively monitor the cellular biochemical responses induced by substances. Recent studies have demonstrated the potential in the evaluation of the effects of drugs on cells.^{61–63} In this study, Raman spectroscopy was used to characterize the flavonoids isolated from *S. paludosum* used in the treatment of macrophages infected with *L. amazonensis*. Initially, the spectra of the cells cultured in a medium free from compounds and those with 0.1% DMSO were analyzed. The analysis showed that these cell groups have similar spectral patterns, indicating that DMSO (vehicle control) does not cause significant changes in the cells.

The pentamidine treatment produced significant changes in the cell spectrum when compared to the spectrum of the DMSO group cells. As pentamidine is an aromatic diamidine, the reduction in the proline vibrations induced by this treatment might be related to the alterations induced by the drug in polyamine pathways.⁶⁴ Also, pentamidine reduced phenylalanine and amide I peaks, indicating conformational changes in the proteins.^{65–67} In addition, this decrease in the protein content in the dying cells followed by the induction of the apoptosis proteins for cleavage and slicing is suggested by the decrease in most of the Raman bands of the proteins.⁶⁶ Moreover, there was decrease in the intensity of the peaks at 1240 and 1095 cm^{-1} , indicating the disintegration of DNA/RNA related to cell death.^{66,67}

The spectra of the cells treated with flavonoids (1) and (3) present changes in the same spectral regions. However, the cells treated with flavonoid (3) showed more dramatic changes in their Raman spectrum when compared to the DMSO group cells. Thus, the treatment of macrophages infected with *L. amazonensis* induced decrease in the Raman bands corresponding to the proteins (peaks at 1002, 1030, and 1657 cm^{-1}), and this result might indicate denaturation and conformational changes in the proteins related to cell death⁶⁵ since autophagy is a catabolic system that promotes the degradation of proteins and organelles.^{68,69} Also, it is possible to observe decrease in the intensity of the peak at 1240 cm^{-1} , indicating increase in the catabolism of RNA and the consequent reduction in protein synthesis.

To further highlight any differences between the treatments, the PCA analysis of the Raman spectra was performed. This multivariate method has been widely used to identify the spectral changes related to human diseases.⁷⁰ In most cases, the changes are subtle and difficult to interpret. By using PCA, the statistical difference between different types of cells can be

revealed effectively, which is similar to the difference spectrum. The PCA results obtained in this study presented a classification of the cell groups.

Although the cells of the Medium group and those of the DMSO group showed very similar spectral characteristics, it was possible to separate and classify the samples successfully by PCA, thus demonstrating the potential of this multivariate method. Subsequently, the DMSO, pentamidine, and flavonoid (1) groups were analyzed. This analysis suggested that despite the changes caused by both the treatments, pentamidine significantly modified the cellular structure compared to flavonoid (1). However, when we compared the DMSO, pentamidine, and flavonoid (3) groups, we observed that both flavonoid (3) and pentamidine significantly modified the cellular structure, forming overlapping regions that demonstrated greater similarity between these groups.

Ultimately, the distribution of the cells of the DMSO and flavonoid (1) and (3) groups was observed. This analysis revealed separated clusters and showed that the cells treated with flavonoid (1) presented more similar characteristics to that of the cells of the DMSO group, whereas the cells treated with flavonoid (3) presented very different spectra with greater dispersion of the samples. Summing up, the flavonoid (1) treatment caused lesser changes in the cell structure compared with the flavonoid (3) treatment. The PCA analysis suggested that the mechanisms of action of the flavonoids occur through different routes, that is, each flavonoid modifies the cell differently.

Conclusions

In conclusion, it was demonstrated in this study that flavonoids showed excellent *in vitro* activity against *Leishmania*. In addition, in the investigation of the possible mechanisms of cell death, flavonoids (1) and (3) could increase the number of cells in the G0/G1 phases and reduce the number of cells in the S and G2/M phases of the cell cycle; flavonoid (3) also showed antiproliferative activity due to the induction of autophagy. Through the combination of Raman spectroscopy and PCA, it was possible to interpret and classify the spectral data accurately. This approach was proven to be useful in detecting the molecular mechanisms induced by flavonoids in cell behavior. The results support that the flavonoids isolated from *S. paludosum* can become lead compounds for the design of new prototypes of antileishmanial drugs.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES, CNPq, MCT, FINEP, INCT-INOVAR (573.564/2008-6), CNPQ (479822/2013-1), CNPQ

(404344/2012-7), FACEPE and FAPEAL (Pronem 20110722-006-0018-0010), FACEPE-PRONEM (APQ0741.1.06/14), and CENAPESQ for providing financial assistance for this research. Moreover, the authors would like to thank several colleagues working at UFAL for constructive criticism and assistance during the development of this study.

References

- 1 L. H. Freitas-Junior, E. Chatelain, H. A. Kim and J. L. Siqueira-Neto, Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?, *Int. J. Parasitol.*, 2012, **2**, 11–19.
- 2 *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis*, ed. Organization WH, World Health Organization, 2010.
- 3 J. Alvar, I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, *et al.*, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One*, 2012, **7**(5), e35671.
- 4 C. Graebin, F. Uchoa, L. Bernardes, V. Campo, I. Carvalho and V. Eifler-Lima, Antiprotozoal agents: an overview, *Anti-Infect. Agents Med. Chem.*, 2009, **8**(4), 345–366.
- 5 F. Silveira, R. Lainson, C. De Castro Gomes, M. Laurenti and C. Corbett, Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L.*(L.) *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis, *Parasite Immunol.*, 2009, **31**(8), 423–431.
- 6 B. B. Mishra and V. K. Tiwari, Natural products: an evolving role in future drug discovery, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**(10), 4769–4807.
- 7 M. J. Chan-Bacab and L. M. Peña-Rodríguez, Plant natural products with leishmanicidal activity, *Nat. Prod. Rep.*, 2001, **18**(6), 674–688.
- 8 L. Bohs, Major clades in *Solanum* based on *ndhF* sequences, in *A Festschrift for William G D'Arcy: The Legacy of a Taxonomist Monogr Syst Bot Missouri Bot Gard*, 2005, vol. 104, pp. 27–49.
- 9 S. E. Milner, N. P. Brunton, P. W. Jones, N. M. O'Brien, S. G. Collins and A. R. Maguire, Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**(8), 3454–3484.
- 10 T. M. S. Silva, M. Agra and J. Bhattacharyya, Studies on the alkaloids of *Solanum* of northeastern Brazil, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2005, **15**(4), 292–293.
- 11 T. M. S. da Silva, M. G. de Carvalho, R. Braz-Filho and M. de Fatima Agra, Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae), *Quim. Nova*, 2003, **26**(4), 517–522.
- 12 T. Silva, M. Carvalho and R. Braz-Filho, Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* Moric, *Quim. Nova*, 2009, **32**(5), 1119–1128.
- 13 T. M. S. Silva, R. J. B. Nascimento, C. A. Câmara, R. N. Castro, R. Braz-Filho, M. de Fátima Agra, *et al.*, Distribution of flavonoids and N-trans-caffeoyl-tyramine in *Solanum* subg. *Leptostemonum*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2004, **32**(5), 513–516.
- 14 G. Vieira Jr., P. Ferreira, L. Matos, E. Ferreira, W. Rodovalho, P. Ferri, *et al.*, Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits, *Phytother. Res.*, 2003, **17**(8), 892–896.
- 15 R. Dall'Agnol and G. L. von Poser, The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits, *J. Ethnopharmacol.*, 2000, **71**(1–2), 337–341.
- 16 A. Oliveira, D. Endringer, R. Araújo, M. Brandão and M. Coelho, The starch from *Solanum lycocarpum* St. Hill. fruit is not a hypoglycemic agent, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2003, **36**(4), 525–530.
- 17 C. A. Hall, T. Hobby and M. Cipollini, Efficacy and mechanisms of α -solasonine and α -solamargine-induced cytolysis on two strains of *Trypanosoma cruzi*, *J. Chem. Ecol.*, 2006, **32**(11), 2405–2416.
- 18 M. Abreu Miranda, R. F. J. Tiossi, M. R. da Silva, K. C. Rodrigues, C. C. Kuehn, L. G. Rodrigues Oliveira, *et al.*, In vitro leishmanicidal and cytotoxic activities of the glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) fruits, *Chem. Biodiversity*, 2013, **10**(4), 642–648.
- 19 K.-W. Kuo, S.-H. Hsu, Y.-P. Li, W.-L. Lin, L.-F. Liu, L.-C. Chang, *et al.*, Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine: triggering apoptosis in human hepatoma cells, *Biochem. Pharmacol.*, 2000, **60**(12), 1865–1873.
- 20 L.-F. Liu, C.-H. Liang, L.-Y. Shiu, W.-L. Lin, C.-C. Lin and K.-W. Kuo, Action of solamargine on human lung cancer cells—enhancement of the susceptibility of cancer cells to TNFs, *FEBS Lett.*, 2004, **577**(1–2), 67–74.
- 21 P. Crow, J. Uff, J. Farmer, M. Wright and N. Stone, The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro, *BJU Int.*, 2004, **93**(9), 1232–1236.
- 22 Y. H. Ong, M. Lim and Q. Liu, Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells, *Opt. Express*, 2012, **20**(20), 22158–22171.
- 23 F. Jähnig and R. Etges, Secondary structure of the promastigote surface protease of *Leishmania*, *FEBS Lett.*, 1988, **241**(1–2), 79–82.
- 24 V. Dugandžić, D. Drikermann, O. Ryabchykov, A. Undisz, I. Vilotijević, S. Lorkowski, *et al.*, Surface enhanced Raman spectroscopy-detection of the uptake of mannose-modified nanoparticles by macrophages in vitro: A model for detection of vulnerable atherosclerotic plaques, *J. Biophotonics*, 2018, **11**(12), e201800013.
- 25 L. Cui, Y.-J. Zhang, W. E. Huang, B.-F. Zhang, F. L. Martin, J.-Y. Li, *et al.*, Surface-enhanced Raman spectroscopy for identification of heavy metal arsenic(v)-mediated enhan-

- cing effect on antibiotic resistance, *Anal. Chem.*, 2016, **88**(6), 3164–3170.
- 26 J. Binoy, J. P. Abraham, I. H. Joe, V. Jayakumar, G. Pettit and O. F. Nielsen, NIR-FT Raman and FT-IR spectral studies and ab initio calculations of the anti-cancer drug combretastatin-A4, *J. Raman Spectrosc.*, 2004, **35**(11), 939–946.
- 27 H. Nawaz, F. Bonnier, P. Knief, O. Howe, F. M. Lyng, A. D. Meade, *et al.*, Evaluation of the potential of Raman microspectroscopy for prediction of chemotherapeutic response to cisplatin in lung adenocarcinoma, *Analyst*, 2010, **135**(12), 3070–3076.
- 28 P. Gao, B. Han, Y. Du, G. Zhao, Z. Yu, W. Xu, *et al.*, The clinical application of Raman spectroscopy for breast cancer detection, *J. Spectrosc.*, 2017, **2017**, 5383948.
- 29 H. Abdi and L. J. Williams, Principal component analysis, *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Stat.*, 2010, **2**(4), 433–459.
- 30 G. Das, R. La Rocca, T. Lakshmikanth, F. Gentile, R. Talerico, L. Zambetti, *et al.*, Monitoring human leukocyte antigen class I molecules by micro-Raman spectroscopy at single-cell level, *J. Biomed. Opt.*, 2010, **15**(2), 027007.
- 31 R. Malini, K. Venkatakrishna, J. Kurien, K. M. Pai, L. Rao, V. Kartha, *et al.* Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study, *Biopolymers*, 2006, **81**(3), 179–193.
- 32 K. Dimas, C. Demetzos, D. Angelopoulou, A. Kolokouris and T. Mavromoustakos, Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro, *Pharmacol. Res.*, 2000, **42**(5), 475–478.
- 33 Z. Movasaghi, S. Rehman and I. U. Rehman, Raman spectroscopy of biological tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2007, **42**(5), 493–541.
- 34 P. Raveendran, J. Fu and S. L. Wallen, A simple and “green” method for the synthesis of Au, Ag, and Au–Ag alloy nanoparticles, *Green Chem.*, 2006, **8**(1), 34–38.
- 35 I. L. K. Wong, K.-F. Chan, Y.-F. Chen, Z.-R. Lun, T. H. Chan and L. M. C. Chow, In Vitro and In Vivo Efficacy of Novel Flavonoid Dimers against Cutaneous Leishmaniasis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, **58**(6), 3379–3388.
- 36 I. L. Wong, K.-F. Chan, B. A. Burkett, Y. Zhao, Y. Chai, H. Sun, *et al.*, Flavonoid dimers as bivalent modulators for pentamidine and sodium stibogluconate resistance in Leishmania, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, **51**(3), 930–940.
- 37 S. R. Gedara, O. B. Abdel-Halim, S. H. El-Sharkawy, O. M. Salama, T. W. Shier and A. F. Halim, New erythroane-type diterpenoids from fagonia boveana (hadidi) hadidi & graf, *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.*, 2003, **58**(1–2), 23–32.
- 38 C. Henrick and P. Jefferies, The chemistry of the Euphorbiaceae. VIII. New flavones from Ricinocarpus stylosus, *Aust. J. Chem.*, 1964, **17**(8), 934–942.
- 39 G. Lewin, A. Maciuk, S. Thoret, G. Aubert, J. Dubois and T. Cresteil, Semisynthesis of natural flavones inhibiting tubulin polymerization, from hesperidin, *J. Nat. Prod.*, 2010, **73**(4), 702–706.
- 40 H. G. T. Castañeda, A. J. C. Dulcey and J. H. I. Martínez, Flavonoid glycosides from Siparuna gigantotepala leaves and their antioxidant activity, *Chem. Pharm. Bull.*, 2016, **64**(5), 502–506.
- 41 C. Valares Masa, J. Alías Gallego, N. Chaves Lobon and T. Sosa Diaz, Intra-population variation of secondary metabolites in Cistus ladanifer L, *Molecules*, 2016, **21**(7), 945.
- 42 I. S. Chauhan, G. S. Rao, J. Shankar, L. K. S. Chauhan, G. J. Kapadia and N. Singh, Chemoprevention of Leishmaniasis: In vitro antiparasitic activity of dibenzalacetone, a synthetic curcumin analog leads to apoptotic cell death in Leishmania donovani, *Parasitol. Int.*, 2018, **67**(5), 627–636.
- 43 C. M. Adade, G. S. Chagas and T. Souto-Padron, Apis mellifera venom induces different cell death pathways in Trypanosoma cruzi, *Parasitology*, 2012, **139**(11), 1444–1461.
- 44 C. A. Guimarães and R. Linden, Programmed cell deaths, *Eur. J. Biochem.*, 2004, **271**(9), 1638–1650.
- 45 A. Debrabant and H. Nakhasi, Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest?, *Kinetoplastid Biol. Dis.*, 2003, **2**(1), 7.
- 46 P. F. Devaux, Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes, *Biochemistry*, 1991, **30**(5), 1163–1173.
- 47 A. D. Tepper, P. Ruurs, T. Wiedmer, P. J. Sims, J. Borst and W. J. van Blitterswijk, Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology, *J. Cell Biol.*, 2000, **150**(1), 155–164.
- 48 P. Williamson, M. S. Halleck, J. Malowitz, S. Ng, X. Fan, S. Krahl, *et al.*, Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells, *PLoS One*, 2007, **2**(8), e729.
- 49 N. Azas, C. Di Giorgio, F. Delmas, M. Gasquet and P. Timon-David, Leishmania infantum Promastigotes: Flow Cytometry as a Possible Tool for Assessing the Effects of Drugs on Cellular Functions, *Exp. Parasitol.*, 1997, **87**(1), 1–7.
- 50 A. Mehta and C. Shaha, Apoptotic Death in Leishmania donovani Promastigotes in Response to Respiratory Chain Inhibition Complex II Inhibition Results in Increased Pentamidine Cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**(12), 11798–11813.
- 51 P. A. Nguewa, M. A. Fuertes, V. Cepeda, S. Iborra, J. Carrión, B. Valladares, *et al.*, Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin, *Chem. Biodiversity*, 2005, **2**(10), 1387–1400.
- 52 G. Singh and C. S. Dey, Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant L. donovani, *Acta Trop.*, 2007, **103**(3), 172–185.
- 53 A. Pućkowska, D. Drozdowska, M. Rusak, T. Bielawski, I. Bruzgo and K. Midura-Nowaczek, Amino and chlorambucil analogues of pentamidine—synthesis and biological examinations, *Acta Pol. Pharm.*, 2012, **69**(1), 63–73.

- 54 M. Islamuddin, D. Sahal and F. Afrin, Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*, *J. Med. Microbiol.*, 2014, **63**(1), 74–85.
- 55 X.-M. Sun, M. MacFarlane, J. Zhuang, B. B. Wolf, D. R. Green and G. M. Cohen, Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**(8), 5053–5060.
- 56 Y. Liu and B. Levine, Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy, *Cell Death Differ.*, 2015, **22**(3), 367.
- 57 T. Yonekawa and A. Thorburn, Autophagy and cell death, *Essays Biochem.*, 2013, **55**, 105–117.
- 58 U. Schurigt, C. Schad, C. Glowa, U. Baum, K. Thomale, J. K. Schnitzer, *et al.*, Aziridine-2, 3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, **54**(12), 5028–5041.
- 59 A. Bera, S. Singh, R. Nagaraj and T. Vaidya, Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2003, **127**(1), 23–35.
- 60 L.-l. Hou, C. Gao, L. Chen, G.-q. Hu and S.-q. Xie, Essential role of autophagy in fucoxanthin-induced cytotoxicity to human epithelial cervical cancer HeLa cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, 2013, **34**(11), 1403.
- 61 T. Tao, Q. Shen, X. Lu, Y. He and L. Zhong, Raman spectroscopy-based multivariate statistical analysis reveals the molecular mechanism of K562 cell apoptosis induced by adriamycin, *Spectrosc. Lett.*, 2014, **47**(4), 301–305.
- 62 E. C. O. da Silva, F. M. dos Santos, A. R. B. Ribeiro, S. T. de Souza, E. Barreto and E. Fonseca, Drug-induced anti-inflammatory response in A549 cells, as detected by Raman spectroscopy: a comparative analysis of the actions of dexamethasone and p-coumaric acid, *Analyst*, 2019, **144**(5), 1622–1631.
- 63 L. E. Jamieson and H. J. Byrne, Vibrational spectroscopy as a tool for studying drug-cell interaction: could high throughput vibrational spectroscopic screening improve drug development?, *Vib. Spectrosc.*, 2017, **91**, 16–30.
- 64 R. Balaña-Fouce, E. Calvo-Álvarez, R. Álvarez-Velilla, C. F. Prada, Y. Pérez-Pertejo and R. M. Reguera, Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2012, **181**(2), 85–93.
- 65 I. Notingher, J. Selvakumaran and L. L. Hench, New detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells, *Biosens. Bioelectron.*, 2004, **20**(4), 780–789.
- 66 I. Notingher, S. Verrier, S. Haque, J. Polak and L. Hench, Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells, *Biopolymers*, 2003, **72**(4), 230–240.
- 67 S. Choi and Z. Jiang, Cardiac sound murmurs classification with autoregressive spectral analysis and multi-support vector machine technique, *Comput. Biol. Med.*, 2010, **40**(1), 8–20.
- 68 B. Levine and D. J. Klionsky, Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy, *Dev. Cell*, 2004, **6**(4), 463–477.
- 69 F. Reggiori and D. J. Klionsky, Autophagosomes: biogenesis from scratch?, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2005, **17**(4), 415–422.
- 70 J. W. Chan, D. S. Taylor, T. Zwerdling, S. M. Lane, K. Ihara and T. Huser, Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells, *Biophys. J.*, 2006, **90**(2), 648–656.