



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Centro de Ciências

Departamento de Física

**Estudo Morfológico e das Propriedades Elásticas
de Plaquetas Humanas por Microscopia de Força Atômica**

Luciana Magalhães Rebelo Alencar

Dissertação apresentada ao Departamento de Física
da Universidade Federal do Ceará como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador: Dr. José Alexander de King Freire

22 de Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Centro de Ciências

Departamento de Física

**Estudo Morfológico e das Propriedades Elásticas
de Plaquetas Humanas por Microscopia de Força Atômica**

Luciana Magalhães Rebelo Alencar

Dissertação apresentada ao Departamento de Física
da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Ciências

BANCA EXAMINADORA:

Dr. José Alexander de King Freire
(Orientador, UFC)

Dra. Silvia Maria Meira Magalhães
(Co-Orientadora, UFC)

Dr. Luciano Paulino da Silva
(Embrapa)

22 de Fevereiro de 2007

*Em memória de meu pai,
pelo amor incondicional
e por sempre acreditar em mim.*

*"Existem pessoas que não se abatem por nada,
até mesmo os mais terríveis obstáculos
são encarados como novos e maravilhosos desafios."*

(Joseph Climber)

Agradecimentos

A Deus, por me fazer forte nessa caminhada.

Ao professor Dr. José Alexander de King Freire, pelo apoio, acolhida, orientação e incentivo à realização deste trabalho.

À professora Dra. Silvia Maria Meira Magalhães, pela co-orientação e encorajamento durante esta aventura da física em meio à medicina.

Ao professor Valder Nogueira Freire, pela formação científica.

À colaboradora no departamento de medicina, Raquel, a quem devo a paciência e presteza nas explicações sobre medicina.

Ao professor Dr. Gil de Aquino Farias, pela liderança do grupo de pesquisa ao qual pertença.

Ao professor Dr. José Soares Andrade Jr., coordenador da pós-graduação do Departamento de Física.

Aos professores do curso de mestrado e graduação, pela valiosa formação.

Ao amigo-irmão, Ton, pela inestimável amizade, pelo carinho, companheirismo, conhecimento dividido, e por toda a grande ajuda, sem a qual este trabalho nunca teria sido realizado.

Aos caros amigos de laboratório Thiago, Jorge, Lino e Karla.

Ao amigo e colaborador Marcelo, pela amizade e apoio neste e em outros trabalhos.

Ao Dr. Jeanlex Soares de Sousa, pela amizade e pela valiosa ajuda na obtenção dos resultados deste trabalho.

Ao Mestre Francisco Franciné Maia Jr., pela amizade de tantos anos e por todo conhecimento dividido.

Ao Mestre Ricardo Pires dos Santos, pelas longas discussões sobre AFM e outros assuntos afins.

À Mestra e colaboradora Mariana Pelissari Monteiro Aguiar Baroni, pela amizade conquistada, pelo apoio incondicional na vida pessoal e profissional.

À amiga Luciana Angélica, pelos momentos alegres e apoio nos momentos difíceis.

Às secretárias da pós-graduação, Ana Cleide e Rejane, por toda ajuda quando necessário.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Ao companheiro e confidente Mateus Marinho Alencar, por tudo. CAEFPTV.

Ao meu pai, a quem eu devo a mais profunda gratidão e admiração. Sem o seu apoio e referencial, certamente eu teria fraquejado durante as dificuldades desta jornada.

À minha mãe Áurea e minha irmã Ana Paula, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todos os sentidos.

Resumo

Um grupo de células que têm participação fundamental nos processos de hemostasia e trombose são as plaquetas. Durante estes eventos, tais células passam por uma drástica transformação de sua estrutura, o que inclui alteração de forma, saindo de um perfil discóide para um completamente amorfo. Conseqüentemente, este fenômeno de reestruturação da arquitetura celular está intimamente ligado um rearranjo do citoesqueleto plaquetário, estrutura localizada abaixo da membrana celular responsável pela forma, estabilidade, maleabilidade, dentre outras características mecânicas e fisiológicas da membrana plasmática. Neste contexto, a investigação das características elásticas do corpo de plaquetas ativadas, como são denominadas ao iniciar o processo acima citado, apresenta-se como uma alternativa viável ao aprofundamento no conhecimento da função plaquetária no organismo. Para tanto, a microscopia de força atômica (AFM), surge como uma técnica de grande utilidade a este tipo de investigação. Capaz de tocar a superfície celular com forças da ordem de piconewtons (10^{-12} N), o AFM pode ser utilizado como um nanoindentador, ou seja, de posse da geometria da sonda e da constante de mola do *cantilever* empregado, grandezas como elasticidade e viscosidade da amostra podem ser determinadas. Neste trabalho, duas subtécnicas AFM foram empregadas no estudo de plaquetas humanas sadias ativadas, tais foram: *Force Plot* e *Force Volume*. A primeira fornece um gráfico chamado de curva de força, obtida com uma única indentação na superfície celular. Já a segunda reúne todas estas curvas numa imagem conhecida como imagem de volume de força. Tais ferramentas provêm informações que, trabalhadas com um modelo matemático adequado, no nosso caso o modelo de Hertz, tornam possíveis a determinação, não apenas pontual, mas em todo o corpo da célula, das propriedades mecânicas plaquetárias.

Abstract

The platelets have a major role in processes like hemostasis and thrombosis. They go through drastic changes in their structure in such events, which includes alterations in shape from a circular outline to a completely amorphous profile. Therefore, this cellular restructuration is strongly linked to a citoeskeleton rearrangement, affecting the whole structure localized under the plasmatic membrane, which is responsible for cell's shape, malleability and deformability. In this view, looking into elastic properties of activated platelets' bodies is a promising source of deeper knowledge about the function of these cells in animal organisms. Nowadays, Atomic Force Microscopy (AFM) is the most suitable technique for this task. Because of its ability of touching a surface with forces around picoNewtons (10^{-12} N), the AFM can be straightly used as a nanoindenter. In this work, two AFM subtechniques were applied to study healthy activated human platelets, which were: *Force Plot* and *Force Volume*. The former generates a graphic called force curve that is obtained when the sample is indented only once on a single point. The second procedure joins several force curves extracted over a surface area in an image known as force volume image. The data provided by these procedures were worked out through a model based on Hertz theory for Young's modules calculation for a surface indented with a conic indenter. Finally, the platelets' mechanical properties were determined not only locally, but throughout the cell body.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Sobre a microscopia.	1
1.2	O AFM	6
1.2.1	Descrição Básica operacional do AFM	7
1.3	Investigação de Células Vivas por meio de AFM	11
1.4	Imagens AFM em meio líquido	15
1.4.1	Métodos básicos para obtenção de imagens AFM com célula líquida.	15
1.5	As plaquetas humanas	19
2	Espectroscopia de Força via AFM - Técnicas e análise.	23
2.1	Uma analogia a respeito das curvas de força.	24
2.2	Forças que atuam no AFM.	26
2.2.1	Forças de van der Waals.	26
2.2.2	Forças eletrostáticas.	28
2.2.3	Capilaridade e forças adesivas.	29
2.2.4	Forças de "dupla camada" (<i>Double Layer</i>).	29
2.3	A curva de Força.	30
2.4	Imagens AFM de Modulação de Força.	33
2.5	Imagens AFM de Volume de Força.	36
3	Aplicação e interpretação das curvas de força obtidas com AFM	42
3.1	Curvas de força aplicadas à Biofísica.	43
3.2	Interações obtidas através das curvas de força.	45
3.2.1	A curva de aproximação.	45
3.2.2	A curva de retração.	48
3.3	Modelo para análise das medidas de indentação.	54
3.4	Microscopia de força atômica em plaquetas humanas.	59
4	Medidas de microelasticidade em plaquetas humanas.	63
4.1	Função plaquetária e análise via AFM.	64
4.2	Metodologia e material utilizado.	65
4.2.1	Coleta e preparação das células.	65
4.2.2	Análise no microscópio de força atômica.	66

4.2.3	Resultados.	69
4.2.4	Modulação de força com piezo bimorfo.	75
5	Volume de Força.	79
5.1	Introdução.	80
5.2	Metodologia e material utilizado.	81
5.3	Resultados.	83
5.3.1	Resposta elástica qualitativa das plaquetas.	83
5.3.2	Superfícies de força constante.	87
5.3.3	Quantificação da resposta elástica plaquetária.	89
6	Conclusões e Perspectivas	96
	Referências	101
A	Tabelas de dados.	109
B	Premiações e Apresentações em Conferências.	112
C	Aprovação do Comitê de Ética	114

Lista de Figuras

1.1	Imagem obtida por microscopia de campo iônico de uma microesfera de Rh. São visíveis os átomos que constituem a superfície, onde é possível observar diferentes morfologias [3].	2
1.2	Imagem de TEM de uma célula mielóide de rato, evidenciando o complexo de Golgi cercado por mitocôndrias [8].	3
1.3	Componentes básicos de um microscópio de varredura eletrônica. Adaptado de [11].	4
1.4	Esquema de um microscópio de força atômica. Enquanto o <i>cantilever</i> varre a amostra, apoiada sobre uma cerâmica, a luz do laser, que incide sobre sua extremidade livre, é refletida para um espelho o qual a leva até um detector, que mede as deflexões do <i>cantilever</i> e envia as informações a um computador, e este, por sua vez, transforma essa informação de deflexão em imagem por meio de um <i>software</i> específico.	5
1.5	(a) Imagem de STM da superfície de Cu (111) retirada da galeria da IBM [15]. (b) Binnig e Rohrer com o equipamento que lhes garantiu um Nobel [16].	6
1.6	Imagens de microscopia de varredura eletrônica de <i>cantilevers</i> microfabricados e sondas de AFM. (a) <i>Cantilever</i> de nitreto de silício. (b) Ampliação de sua sonda. (c) <i>Cantilever</i> de silício. (d) Ampliação da sonda de silício [18].	7

1.7	Diagrama esquemático demonstrando como a forma da sonda pode influenciar a imagem do objeto estudado com AFM. Quando a sonda é larga e inacessível, a cada parte da superfície do objeto (a), um perfil errôneo da amostra é visto na imagem (b). Quando uma sonda mais fina é usada para fazer a varredura do mesmo objeto (c), a micrografia AFM descreve uma imagem quase idêntica do objeto (d). De forma similar, quando uma sonda de AFM faz a varredura de uma área de depressão, a angulação da sonda limita a profundidade máxima na qual essa sonda pode acessar essa depressão.	8
1.8	Modos de operação básicos em AFM. O gráfico mostra o potencial de interação entre a sonda e a amostra, evidenciando: (1) o regime atrativo em que a sonda opera no modo contato, varrendo a amostra lateralmente, e (2) o modo contato intermitente ou <i>tapping</i> , em que a sonda varre a amostra oscilando sobre a mesma, abrangendo regimes atrativos e repulsivos. Podemos observar também que a deflexão do cantilever muda em cada modo de operação, representado nesta figura pela posição do laser no fotodetector para cada caso.	9
1.9	Variação da amplitude de oscilação em função da aproximação ponteira-amostra.	10
1.10	Esquema da membrana celular composta pela dupla camada lipídica e proteínas [30].	13
1.11	Parte de baixo de uma célula líquida sendo carregada por uma sonda [42]. . .	16
1.12	<i>O Ring</i> onde fica depositado o líquido no qual é imersa a sonda e a amostra durante a varredura.	17
1.13	Célula líquida com sistema de injeção de fluido.	18
2.1	Valor da força medida em intervalos regulares durante o ciclo de abaixamento do imã.	24
2.2	Representação gráfica da força com que o imã é puxado para baixo. Adaptado de [49].	25
2.3	Forças entre a sonda e a amostra em função da distância entre elas.	28

2.4	Curvas de força <i>versus</i> distância realizadas em ar e em meio fluido respectivamente. Em (a) observamos a presença de grandes forças adesivas devido à camada de contaminação que está presente nas amostras examinadas em ar. Em (b), vemos que essas forças são eliminadas quando a imagem é realizada em líquido, como veremos <i>a posteriori</i> [17].	30
2.5	(a) Anatomia de uma curva de força, (b) o piezo sofre extensão e a sonda desce em direção a amostra, ainda não há contato com a mesma; (c) a sonda desce bruscamente em direção a amostra devido às forças atrativas; (d) a sonda pressiona a superfície e o <i>cantilever</i> é flexionado para cima; (e) o piezo se retrai, a sonda sobe até que as forças estejam em equilíbrio e o <i>cantilever</i> relaxa para baixo; (f) o piezo continua se retraindo e a sonda sobe ainda mais, o <i>cantilever</i> se curva para baixo devido às forças de atração que prendem a amostra; (g) como a sonda continua subindo, esta se livra da atração da superfície, o <i>cantilever</i> se flexiona bruscamente para cima; (h) o piezo continua se retraindo e a sonda permanece em seu movimento ascendente, nesse momento, não há mais contato entre a sonda e a amostra.	31
2.6	A figura da esquerda mostra uma imagem de altura em modo contato, à direita visualizamos uma imagem de modulação de força do mesmo polímero. As regiões mais macias do polímero estão mapeadas em preto. A varredura possui 900 nm de tamanho lateral [53].	33
2.7	Diagrama do princípio de modulação de força mostrando a sonda varrendo um material de baixa constante elástica, da esquerda para direita. O sinal de amplitude aumenta quando a sonda encontra sítios de módulo elástico elevado (materiais duros). Adaptado de [54].	34
2.8	<i>Tipholder</i> bimorfo de modulação de força para equipamentos MultiMode [®] [54].	35
2.9	Curvas de volume de força. Um conjunto de curvas de força regularmente espaçadas produz uma informação de força tridimensional. Em um conjunto de dados de volume de força, as curvas de força variam com a posição <i>x-y</i> . Adaptado de [55].	36

2.10	Cortes horizontais através dos dados de volume de força mostrando a distribuição dos valores de deflexão em cada posição em z . Na figura acima, as regiões escuras correspondem a grandes deflexões. A fatia superior tem uma distribuição de força baixa e uniforme devido à sonda ainda não estar em contato com a superfície. A fatia inferior tem uma distribuição também uniforme, no entanto, a força é elevada devido o contato máximo da sonda com a superfície [55].	37
2.11	Interface de uma medida de volume de força obtida com o software NanoScope. A imagem é de uma interface de vidro-platina [54].	38
2.12	Cortes horizontais retirados dos dados de volume de força da Fig. 2.14. Cada imagem possui tamanho de $2\mu\text{m}$, e foram retirados das regiões 1, 2, 3 e 4 mostradas na Fig. 2.14. A distribuição das forças de adesão são mostradas a partir dos dados extraídos da curva de retração do volume de força [54].	40
2.13	(a) Imagem de altura de células MDCK sobre vidro, obtidas por meio de volume de força. (b) Mapa de elasticidade da célula MDCK construído com dados do volume de força. Os pixels mais claros mostram regiões de maior rigidez na célula. A imagem possui $30\mu\text{m}$ de tamanho [54].	41
2.14	(a) Imagem de altura em líquido da membrana de uma bactéria adsorvida em mica, realizada por meio de volume de força. (b) Mapa da densidade de carga relativa da superfície obtido com o ajuste das curvas de volume de força por meio de um modelo baseado na teoria de Gouy-Chapman de uma esfera de aproximando de um plano. A imagem possui $3\mu\text{m}$ de tamanho [54].	41
3.1	Esquema de uma curva de força com as diferentes regiões das porções destacadas de aproximação e retração.	44

3.2	Medida de indentação pela análise da curva de força. (a) Curva da força em uma amostra rígida; (b) curva da força em uma amostra macia. Neste caso a amostra é indentada e para a mesma deflexão do <i>cantilever</i> o movimento em z do piezo é mais elevado do que para o caso de uma amostra rígida. (c) A comparação entre duas curvas da força realizadas em uma célula viva (curva vermelha) e no vidro (curva preta). As duas curvas foram alinhadas a fim ter o mesmo ponto de contato.	46
3.3	Série cronometrada de mapas de elasticidade de um fibroblasto de NRK que mostra a desagregação da rede de actina, com imagens de AFM e microscopia de fluorescência. (a) Imagem de AFM em modo contato. (b) Imagem de deflexão (AFM); as fibras de stress são descritas pelas setas. (c) Reconstrução da imagem de altura com força nula. (d) Mapa de elasticidade. (e), (f) decrescimento gradual do modulo de Young em um intervalo de 40 minutos. (g) Mapa de elasticidade e (h) imagem da altura com força nula obtida após 60 minutos mostrando uma forte segmentação do citosol. (i) Imagens correspondentes de fluorescência para identificar estruturas em (g) e (h) como redes de actina. A seta em (h) aponta a uma região muito plana (500 nanômetro) que mostra uma região desprovida de fibras [56].	49
3.4	Nanotubo de carbono anexado ao fim de uma sonda de silício. O quadro superior é um aumento da imagem, girada de 180 graus (barra = 1 $\mu m/s$) [76].	50
3.5	Os oligonucleotídeos complementares do DNA são quimicamente unido a sonda do AFM e a uma superfície de vidro. Quando a sonda é trazida ao contato com a superfície, as fitas duplas de DNA são formadas, podendo ser subsequentemente desfeitas pela retração da sonda. Adaptado de [80]	51
3.6	Sonda funcionalizada com polímero [87].	52

3.7	<p>Poliproteína presa entre uma sonda de AFM e um substrato sólido. Enquanto a extremidade é movida para cima, as forças requeridas para puxar e separar a estrutura da proteína faz o <i>cantilever</i> se deflexionar possibilitando assim com que elas sejam armazenadas. Uma típica curva da força-extensão é mostrada. No ponto (a), a sonda se retrai e um domínio da proteína é prolongado. Em (b), uma força crítica é alcançada onde o domínio mecanicamente menos estável se rompe. A tensão é quebrada pelo prolongamento máximo do domínio desdobrado e o <i>cantilever</i> retorna a sua posição de descanso. Em (c), porque as extremidades da proteína são movidas cada vez mais distantes, o domínio desdobrado é prolongado e o acréscimo da força aplicada faz com que um segundo domínio seja desdobrado [89].</p>	53
3.8	<p>Diferenças nas curvas de força de amostras rígidas e macias. Na curva de força em (a), a deflexão do cantilever é traçada em função da altura da amostra. Em amostras duras, as curvas de forças possuem dois regimes lineares distintos. O primeiro a sonda ainda não esta em contato com a amostra e a deflexão é constante (visível entre os pontos 1 e 2 na figura (a) e na posição 1 da figura (b)). No segundo a sonda toca a amostra e a deflexão é proporcional a sua altura (entre os pontos 2 e 3a). em amostras macias, contudo, devido a deformação de sua superfície, a deflexão será suave, não evidenciando os dois regimes (região da curva entre os pontos 2 e 3b em (a) e posições 2 e 3 em (b)). A resposta elástica da amostra levará a uma relação não linear entre a deflexão e a altura. A diferença entre as curvas na figura (a) corresponde a indentação da amostra.</p>	58

3.9	Exemplo do procedimento de ajuste das curvas e obtenção de z_0 . A partir dos dados experimentais (curva de x) o ajuste da deflexão pode ser obtido pela média de d na região reta da curva de força correspondente ao cantilever fora da amostra. O intervalo de análise é definido pelos valores de d_1 e d_2 . O modelo de Hertz é ajustado para os valores do intervalo, resultando em valores de E e z_0 . Como pode ser visualizado no gráfico acima, a curva ajustada se aproxima muito bem da curva experimental. O ponto de contato encontrado está em torno de 610 nm. O módulo de Young encontrado para o caso acima é $E = 5100$ Pa.	59
3.10	Curso temporal da ativação de uma plaqueta humana sobre vidro [93]. . . .	61
3.11	Representação pictórica da sonda de AFM deformando a membrana de uma célula.	61
3.12	Mapa topográfico (a) e elástico (b-d) de plaquetas humanas. O tamanho da imagem é de 4.3 x 4.3 μm . A escala cinza na imagem (b) é de 2 μm . Na imagem (b) o módulo elástico é mostrado de tal forma que as regiões mais escuras correspondem a 100 kPa e as regiões mais claras a 1 kPa. Diferentes regiões da plaqueta são identificadas na figura (c): P é o pseudonúcleo, I é o tecido interno, O é o tecido externo e C o córtex. Em (d), observamos que o pseudonúcleo é a região mais macia, variando de 1.5-4 kPa, o tecido interno possui elasticidade de aproximadamente 4 kPa, e o externo varia de 10-40 kPa, as áreas do córtex são as mais duras, com aproximadamente 50 kPa [95].	62
4.1	Esquema de preparação das plaquetas para análise por AFM.	67
4.2	(a) Processo de lavagem da sonda AFM em etanol e (b) posterior exposição ao ultra-violeta por 1 hora.	68
4.3	Imagem de altura de uma plaqueta ativada sobre vidro. (P)-Pseudonúcleo, (F)- <i>Filopodium</i> e (L)- <i>Lamellipodium</i>	70
4.4	Possíveis partículas liberadas pela célula durante a ativação.	71

4.5	Curvas de forças típicas obtidas sobre diferentes regiões morfológicas da plaqueta e sobre o substrato (vidro). O módulo de Young de cada região foi calculado com base nestas curvas utilizando o modelo de Hertz para uma sonda cônica: 810.6 kPa - vidro, 66.1 kPa - filopodium e 13.7 kPa - pseudonúcleo.	72
4.6	A semelhança entre as curvas de aproximação e retração vista nesta figura mostra a natureza elástica da membrana de uma plaqueta. A histerese entre as curvas é causada pela a resistência hidrodinâmica do fluido de operação.	73
4.7	Diversas curvas de retração atestando a ausência de adesão entre a sonda AFM e membrana da plaqueta.	74
4.8	Curva de indentação <i>versus</i> força obtida sobre a membrana de uma plaqueta. Para pequenos intervalos de força, há uma grande concordância entre os dados experimentais e aqueles gerados pelo modelo	75
4.9	Obtenção dos valores de E e z_0 a partir do <i>fit</i> de Monte Carlo. Os valores são definidos após a sua estabilização com a evolução do ajuste.	76
4.10	Curva de força com região de indentação destacada em vermelho.	77
4.11	Discordância entre a curva teórica e experimental para altos valores de força.	77
4.12	(a) Imagem de altura de uma plaqueta, (b) imagem de modulação obtida com <i>tipholder</i> bimorfo.	78
4.13	(a) Imagem de altura e (b) imagem de modulação de força evidenciando impurezas sobre a área varrida.	78
5.1	Janela de comando de uma medida de volume de força realizada em uma plaqueta humana. A curva de força mostrada no campo <i>Force Plot</i> correspondente a uma região no substrato. A histerese observada nas curvas se deve a resistência hidrodinâmica das medidas em solução tampão em taxas de varreduras moderadas. A redução das taxas de varredura até o completo desaparecimento da histerese se torna inviável por conta do elevado tempo de aquisição dos dados de volume de força. Também é observada a presença de algum ruído espúrio na curva de aproximação devido a vibração excessiva do <i>cantilever</i> no líquido.	84

5.2	Medida de volume de força em outra plaqueta mostrando gráficos múltiplos de força em regiões correspondentes em (1) ao substrato e em (2) ao granulômero ou pseudonúcleo. Uma das vantagens desta técnica é o conhecimento exato do ponto da imagem de onde está sendo retirada a curva de força, bem como a obtenção simultânea da mesma. No gráfico de força, observamos a diferença de maciez das diferentes regiões.	85
5.3	Conjunto de curvas de força adquiridas sobre uma área da lamínula que contém uma plaqueta ativada. Esse relevo de força identifica diversas regiões da amostra.	86
5.4	Topografia de força constante das curvas de força armazenadas no modo volume de força, enquanto a sonda varre lateralmente uma superfície contendo uma plaqueta humana. As quantidades de força são respectivamente (a) 3.6 nN, (b) 4.8 nN, (c) 6.0 nN e (d) 7.2 nN. Note que a célula é comprimida à medida que a força aumenta. A imagem acima possui uma área de 11 x 11 μm .	88
5.5	(<i>a-m</i>) Cortes horizontais em diferentes alturas obtidos com os dados de volume de força da célula da Fig. 5.6(a). Na Fig. 5.5(a) a sonda está em uma altura muito próxima do substrato e a deflexão do <i>cantilever</i> é bastante elevada. A célula está quase que completamente comprimida, comparando-se em deflexão ao substrato. Na Fig. 5.5(m), a sonda encontra-se muito distante da amostra e os valores de deflexão são baixos. Observamos que a plaqueta quase não é percebida pela sonda. A Fig. 5.5(f) apresenta uma altura razoável entre o par sonda-amostra, valor da deflexão mostrado é moderada e a plaqueta pode ser claramente percebida, sem danos visíveis à sua estrutura.	90
5.6	(a) Imagem tridimensional da plaqueta da qual os cortes horizontais foram obtidos; (b) curva de aproximação entre o <i>cantilever</i> e a amostra para a mesma plaqueta. Os pontos <i>a-m</i> indicam as alturas das quais os cortes do volume de força mostrados na Fig. 5.5 foram obtidos.	91

5.7	O gráfico mostra os valores médios de E para o pseudonúcleo (15.61 kPa), para uma região intermediária da célula (171.35 kPa) e para o substrato (1213.85 kPa). O valor elevado de erro para E obtido sobre a célula se deve a morfologia variada da mesma.	92
5.8	O gráfico mostra os valores médios para a força aplicada sobre o pseudonúcleo (3.71pN), sobre uma região intermediária (40.74pN) e sobre o substrato (288.60pN)	93
5.9	Curva experimental (preto) e curvas obtidas com os ajustes Gaussiano (azul), Lorentziano (verde) e o polinomial (vermelhos). Os valores de E obtidos para cada uma das curvas em um mesmo intervalo de deflexão foram 50.1kPa, 50.1 kPa, 46kPa e 0.4kPa, respectivamente.	94

Lista de Tabelas

1.1	Principais Glicoproteínas plaquetárias e proteínas de adesão [44].	20
2.1	Variações das imagens de volume de força. A matriz sumariza cada um dos principais tipos de obtenção de imagens de volume de força com AFM. Adaptada de [54].	39
3.1	Propriedades elásticas de diversos materiais. Adaptada de [57].	56
4.1	Especificação do <i>cantilever</i> utilizado na obtenção das imagens de altura e curvas de força.	68
5.1	Valores de E e z_0 para cada uma das curvas ajustadas. Observamos aqui que o ajuste Gaussiano apresenta valores mais aproximados.	95
A.1	Valores de E calculados em kPa sobre diferentes regiões da plaqueta e no substrato.	110
A.2	Valores de F em pN para as mesmas regiões das quais o E foi calculado.	111

1

Introdução

1.1 Sobre a microscopia.

Por volta de quatrocentos anos atrás, a invenção dos telescópios e microscópios não somente ampliou nossa capacidade visual, como também revolucionou a percepção do mundo. Há uma extensa variedade de técnicas para observação das estruturas de superfícies, tais como a utilização de lentes e microscópios óticos, conhecidos desde o século XVII.

Ao final do séc. XIX, o aperfeiçoamento desses instrumentos permitiu a visualização de pequenos organismos e células que, anteriormente, eram impossíveis de se observar devido ao tamanho reduzido. Décadas mais tarde, novos avanços da microscopia já possibilitavam que a amostra fosse visualizada em um tamanho duas mil vezes maior.

Nesse ponto, em que tais equipamentos pareciam ter chegado a um limite, surgiram novas técnicas baseadas em feixes de íons ou de elétrons, varredura por laser, varredura por sonda, além de outras técnicas, permitindo aos pesquisadores um estudo detalhado de suas amostras, o que a microscopia convencional não era capaz [1]. O uso dessas novas técnicas cresceu rapidamente e em diferentes áreas do saber, principalmente nas ciências médicas e biológicas, permitindo o conhecimento de elementos e organismos fundamentais.

A concepção da estrutura básica de que é formada a matéria tem se mostrado ao longo do tempo como um desafio aos estudiosos. A partir do momento em que a compreendemos, podemos entender suas propriedades, levando a uma mudança controlada do ambiente no qual vivemos.

As primeiras imagens em escala atômica (Fig. 1.1), foram obtidas com um microscópio de campo iônico, inventado por Erwin Muller em 1951 [2].

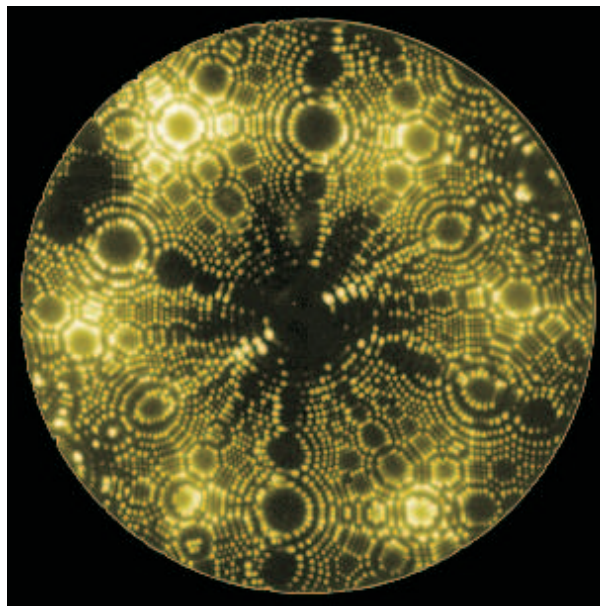


Figura 1.1: Imagem obtida por microscopia de campo iônico de uma microesfera de Rh. São visíveis os átomos que constituem a superfície, onde é possível observar diferentes morfologias [3].

Em 1931, na Alemanha, Knoll e Ruska desenvolveram o primeiro microscópio eletrônico [4], com base no experimento de Bush (1926) [5], provando que era possível focalizar um feixe de elétrons utilizando uma lente eletromagnética circular. Em 1938, a *Siemens Corporation* construiu o primeiro modelo comercial do TEM (*Transmission Electron Microscope*), que exerceu, em meados do século XX, uma grande influência sobre a biologia e as demais ciências, ao permitir estudos das ultra-estruturas dos materiais [6].

O TEM possui um sistema de iluminação a vácuo produzindo feixes de elétrons de alta energia, que, ao incidir sobre uma amostra de tecido ultrafina (com espessura da ordem de nanômetros), fornece imagens planas, imensamente ampliadas, com capacidade de aumento útil de até um milhão de vezes (Fig. 1.2), possibilitando a visualização de moléculas orgânicas, como o DNA, RNA, algumas proteínas, etc. O seu sistema a vácuo remove o ar e outras moléculas de gás da coluna do microscópio, evitando que

ocorra erosão do seu filamento e propiciando a formação de uma imagem com excelente qualidade e contraste. A imagem é projetada em um anteparo fluorescente, podendo ser redirecionada para uma chapa fotográfica ou, ainda, ser captada por um *software* e armazenada para futura análise. Grande parte dos átomos das estruturas celulares tem baixo número atômico e poucos contribuem para a formação da imagem. O emprego de substâncias que contêm átomos pesados, como ósmio, chumbo e urânio permite obter um contraste entre as estruturas celulares, contribuindo para uma melhor imagem. A imagem é também uma resultante da absorção diferenciada de elétrons por diversas regiões da amostra, seja por variação de espessura, seja por interação com átomos de maior ou menor número atômico. A principal aplicabilidade do TEM está nas análises morfológicas, caracterização de precipitados e determinação de parâmetros de rede [7].

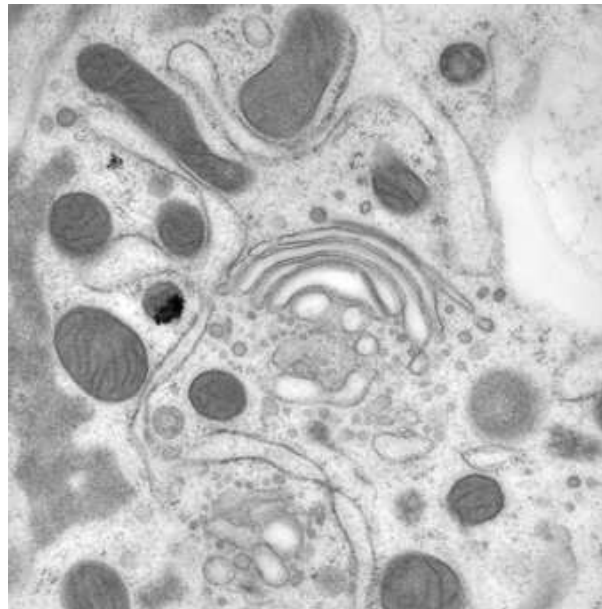


Figura 1.2: Imagem de TEM de uma célula mielóide de rato, evidenciando o complexo de Golgi cercado por mitocôndrias [8].

Outro método para obtenção de imagens de alta resolução é através do Microscópio Eletrônico de Varredura ou SEM (*Scanning Electron Microscope*). Diferentemente do TEM, onde o material tem que ser cortado em fatias muito finas ou visto muito grosseiramente por contrastação negativa, no SEM, o material é visto por inteiro, permitindo que sua superfície seja revelada. O SEM (Fig. 1.3) foi desenvolvido para

mostrar detalhes em alta resolução, com a utilização de um feixe fino de elétrons de alta energia impulsionado sobre o material estudado, havendo, assim, interação desse feixe com o material [9]. Após a interação, parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em uma imagem de ERE (imagem de elétrons retroespalhados). Outro grupo de elétrons atravessa a amostra produzindo a chamada imagem de ES (elétrons secundários). Ocorre também a emissão de raios-X, que fornecem a composição química de um ponto ou região da superfície, possibilitando a identificação de praticamente qualquer elemento presente [10].

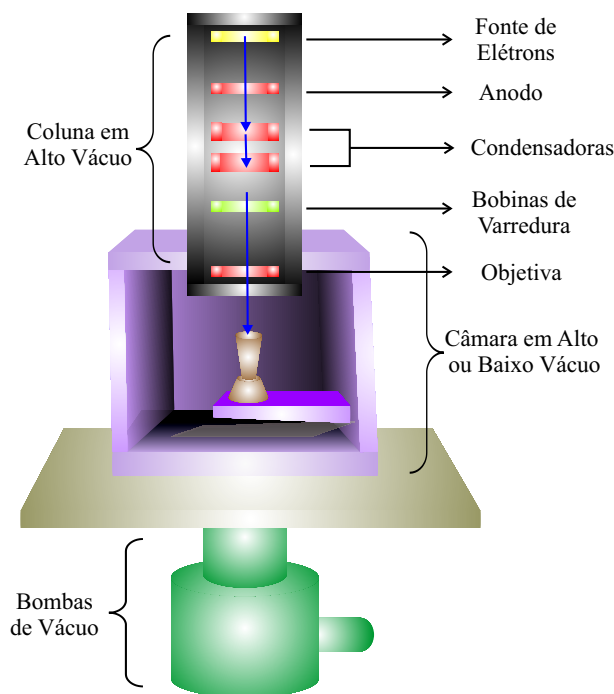


Figura 1.3: Componentes básicos de um microscópio de varredura eletrônica. Adaptado de [11].

O pequeno comprimento de onda dos elétrons é responsável pela alta resolução do SEM. Apenas capazes de trabalhar em vácuo, os microscópios eletrônicos podem resolver escalas nanométricas ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), mas, em geral, com efeitos destrutivos às amostras. Ademais, um SEM não é capaz de fornecer informações de profundidade com qualidade.

A idéia da microscopia de varredura por sonda é totalmente diversa das demais

técnicas de microscopia. Um microscópio de varredura por sonda ou SPM (*Scanning Probe Microscope*) é um conjunto de instrumentos compostos basicamente de sonda sensora, cerâmicas piezelétricas usadas para posicionar a amostra com relação à sonda, circuitos de realimentação para o controle da posição vertical da sonda e um computador para realizar a movimentação dos *scanners* de varredura, armazenar os dados extraídos nas medidas e os converter em imagens por meio de um *software* específico (Fig. 1.4).

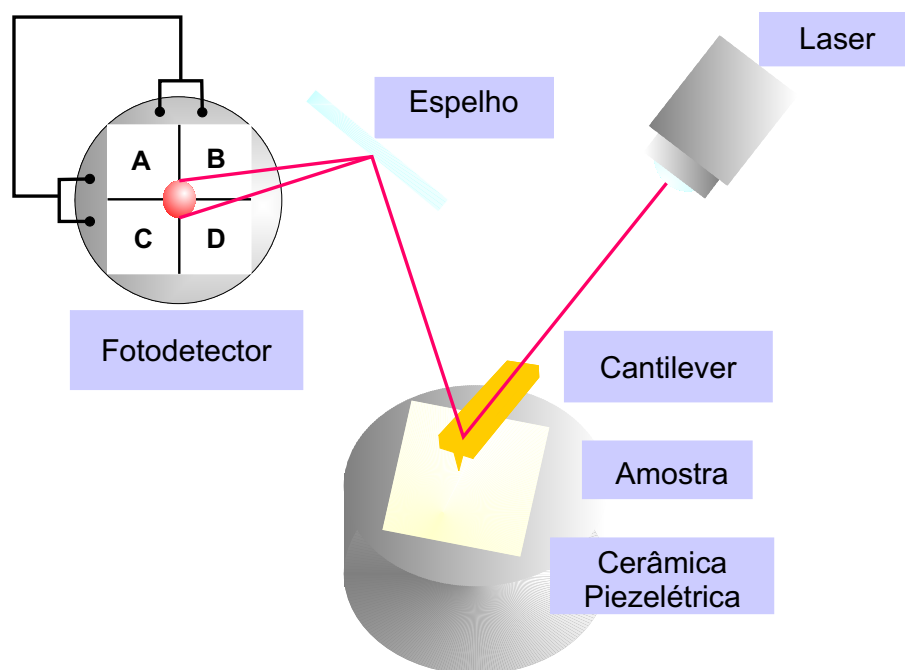


Figura 1.4: Esquema de um microscópio de força atômica. Enquanto o *cantilever* varre a amostra, apoiada sobre uma cerâmica, a luz do laser, que incide sobre sua extremidade livre, é refletida para um espelho o qual a leva até um detector, que mede as deflexões do *cantilever* e envia as informações a um computador, e este, por sua vez, transforma essa informação de deflexão em imagem por meio de um *software* específico.

As técnicas de varredura por sonda alargaram nosso conhecimento dentro dos "mundos" nano e micrométrico. Além disso, tocar os objetos é um pré-requisito essencial para manipulá-los. Essa habilidade de "sentir" moléculas e átomos certamente marca outro passo revolucionário na ciência.

O microscópio de tunelamento ou STM (*Scanning Tunneling Microscope*), o primeiro

de varredura por sonda, foi inventado por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, da IBM de Zurich, em 1981, e foi o primeiro instrumento capaz de gerar imagens reais de superfícies com resolução atômica [12]. Em 1986, os inventores ganharam o Prêmio Nobel de Física (Fig. 1.5). Depois dos primeiros relatos, vários trabalhos sobre a técnica foram desenvolvidos, registrando-se imagens atômicas de superfícies de semicondutores, assim como moléculas adsorvidas quimicamente. Ainda mais, a espectroscopia de tunelamento com varredura STS (*Scanning Tunneling Spectroscopy*), que mede a condutância de tunelamento *versus* a voltagem de polarização em uma posição específica da sonda, proporciona informação estrutural eletrônica local da superfície, a qual é resolvida em escala atômica [13]. A partir de uma modificação do microscópio de tunelamento, Binnig, Quate e Gerber desenvolveram o AFM em 1986 [14].

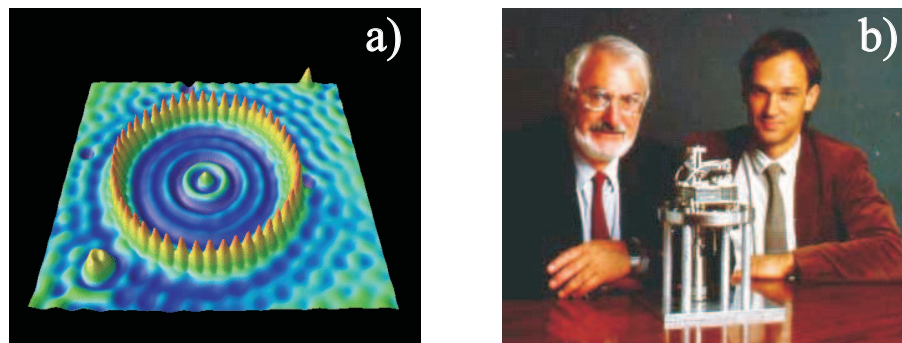


Figura 1.5: (a) Imagem de STM da superfície de Cu (111) retirada da galeria da IBM [15]. (b) Binnig e Rohrer com o equipamento que lhes garantiu um Nobel [16].

1.2 O AFM

A habilidade do microscópio de força atômica de produzir micrográficos tridimensionais com resolução abaixo da escala nanométrica tem feito dele uma ferramenta essencial para obtenção de imagens de superfícies.

Além de produzir imagens topográficas, o AFM também é capaz de investigar as propriedades mecânicas e outros atributos fundamentais das amostras, tais como aderência e elasticidade local. A adesão microscópica influencia uma grande variedade

de eventos, desde o comportamento de cerâmicas e materiais compostos, até a replicação de DNA e atuação de drogas no corpo humano [17]. Propriedades elásticas têm uma importância similar, afetando freqüentemente a estrutura e dinâmica de sistemas, num universo que abrange diversos materiais compostos, como, por exemplo, o sangue humano. A microscopia de força atômica oferece uma nova ferramenta para o estudo desses importantes parâmetros, empregando um artifício que mede as forças entre a sonda do aparelho e a amostra, quando aquela se aproxima ou se afasta da superfície investigada.

1.2.1 Descrição Básica operacional do AFM

O principal elemento do AFM é um sensor de força microscópico: o *cantilever*. Os diversos tipos de *cantilevers* são classificados dependendo de sua habilidade de se flexionar. Usualmente, é formado por uma ou mais hastes de silício ou nitreto de silício, cuja constante de mola varia de acordo com o comprimento e formato dessa haste.

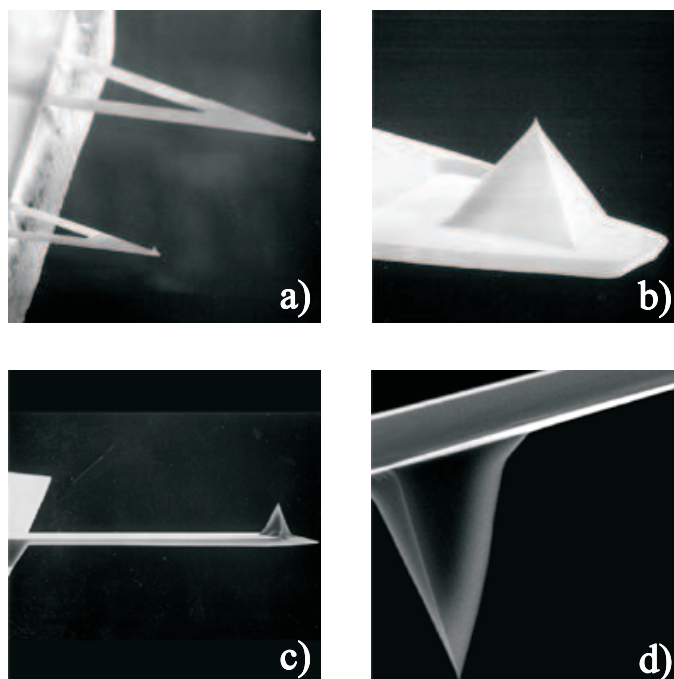


Figura 1.6: Imagens de microscopia de varredura eletrônica de *cantilevers* microfabricados e sondas de AFM. (a) *Cantilever* de nitreto de silício. (b) Ampliação de sua sonda. (c) *Cantilever* de silício. (d) Ampliação da sonda de silício [18].

Disposta na extremidade livre desse *cantilever* está uma sonda muito fina, usada para medir as forças que atuam entre ela e a superfície estudada. Estas sondas são pequenos objetos, cujas interações com a amostra podem ser sentidas em posições selecionadas. Por meio da varredura do *cantilever* de AFM sobre a amostra e do registro de sua deflexão, a altura local é medida. Mapas topográficos tridimensionais da superfície são construídos gerando gráficos da altura *versus* posição horizontal da sonda. As sondas piramidais de nitreto de silício são as mais usadas para os trabalhos com amostras biológicas (Fig. 1.6).

A geometria e a composição da sonda têm importante papel na geração das imagens AFM. Artefatos de imagem ocasionados pela sonda ocorrem se esta é menos fina do que o formato do objeto estudado. Quando a sonda de varredura é tão fina quanto o perfil da amostra estudada, uma imagem mais aproximada da real é alcançada (Fig. 1.7). Porém, se as sondas forem muito mais finas, pode haver danos para amostras biológicas [19].

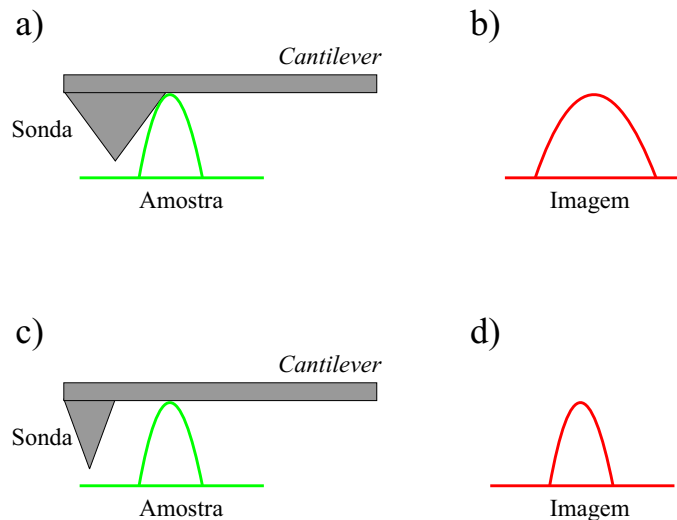


Figura 1.7: Diagrama esquemático demonstrando como a forma da sonda pode influenciar a imagem do objeto estudado com AFM. Quando a sonda é larga e inacessível, a cada parte da superfície do objeto (a), um perfil errôneo da amostra é visto na imagem (b). Quando uma sonda mais fina é usada para fazer a varredura do mesmo objeto (c), a micrografia AFM descreve uma imagem quase idêntica do objeto (d). De forma similar, quando uma sonda de AFM faz a varredura de uma área de depressão, a angulação da sonda limita a profundidade máxima na qual essa sonda pode acessar essa depressão.

Para a obtenção de imagens topográficas, a sonda é aproximada da amostra sob contato contínuo ou intermitente (Fig. 1.8), varrendo assim a sua superfície.

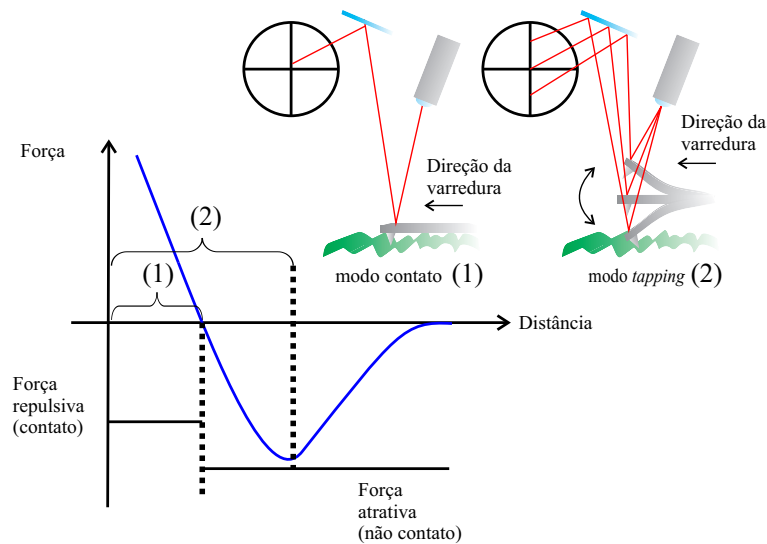


Figura 1.8: Modos de operação básicos em AFM. O gráfico mostra o potencial de interação entre a sonda e a amostra, evidenciando: (1) o regime atrativo em que a sonda opera no modo contato, varrendo a amostra lateralmente, e (2) o modo contato intermitente ou *tapping*, em que a sonda varre a amostra oscilando sobre a mesma, abrangendo regimes atrativos e repulsivos. Podemos observar também que a deflexão do cantilever muda em cada modo de operação, representado nesta figura pela posição do laser no fotodetector para cada caso.

No modo contato de varredura, a força atuante é repulsiva e o *cantilever*, em geral em "V", deve ser mole (ou seja, de baixa constante elástica) para que se consiga uma boa flexão sem deformar a amostra. Para fazer imagens de amostras biológicas macias em modo contato, os *cantilevers* mais flexíveis são ideais, pois dobram sem deformar a superfície da amostra. Eventualmente, podem ser utilizados *cantilevers* duros que, entretanto, devem ser operados em altas forças. Em tal hipótese, durante a aproximação da sonda, o *cantilever* é puxado fortemente para a superfície, podendo distorcê-la ou danificá-la se a amostra for mole. As medidas com AFM no regime de contato exploram fundamentalmente as forças de repulsão íon-íon, que decaem rapidamente com o aumento da separação sonda-superfície [1].

No modo de contato intermitente ou *tapping mode* (Fig. 1.9), o *cantilever* oscila numa frequência próxima de sua frequência de ressonância enquanto é feita a varredura

sobre a amostra. A sonda é aproximada até que ela começa a realizar um contato intermitente com a superfície. Este modo tem a vantagem de permitir a visualização de amostras que não aderem muito bem ao substrato, pois com ele pode-se reduzir (e até eliminar) a influência de forças laterais aplicadas à amostra [20]. Uma vez que o contato com a amostra é apenas intermitente, há um atrito desprezível entre a sonda e a superfície, e, portanto, não há avarias provenientes de forças laterais, o que é ideal para materiais biológicos.

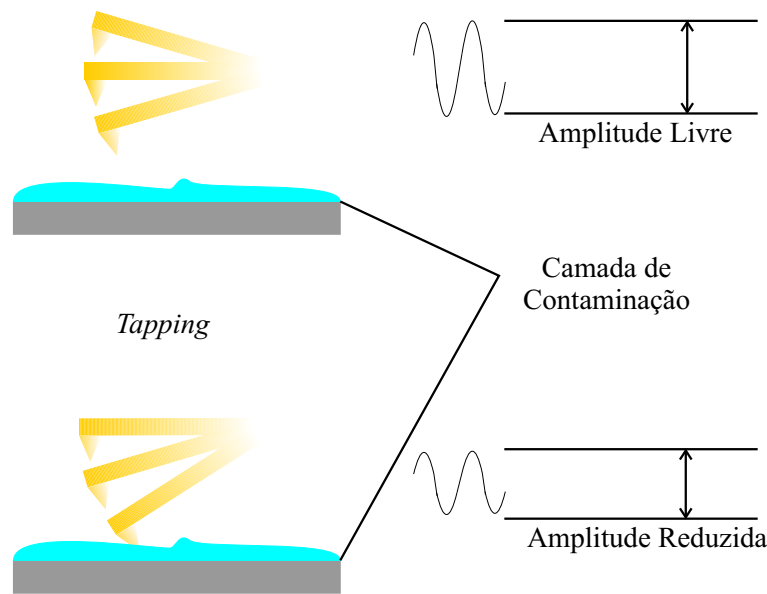


Figura 1.9: Variação da amplitude de oscilação em função da aproximação ponteira-amostra.

Além disso, a amplitude de oscilação é fixa e suficientemente alta, de forma que, quando a sonda toca na superfície, o *cantilever* tenha suficiente força restauradora (devido à deflexão) para impedir que a sonda fique presa na camada de contaminação (pelas forças de menisco ou eletrostáticas) presentes nas medidas feitas ao ar. Na Biologia, o *tapping* em líquidos é o meio de operação mais utilizado para obtenção de imagens topográficas [21]. A cada ciclo, a ponteira toca a amostra e as mudanças na amplitude e fase do *cantilever* causadas por esta interação são utilizadas para produzir a imagem. A amplitude da oscilação decai na medida em que a sonda vai se aproximando da amostra. Isso acontece mesmo levando-se em conta a existência do grande amortecimento produzido pelo atrito viscoso.

A movimentação da sonda em relação à amostra é realizada por um sistema de deslocamento de alta precisão; o *scanner* piezelétrico. O *scanner* é um atuador mecânico formado por cerâmicas piezelétricas, que são materiais cristalinos capazes de produzir uma polarização elétrica quando submetidos à um *stress* mecânico. Em alguns modelos de AFM, a amostra permanece em repouso enquanto a sonda movimenta-se guiada pelo scanner, em outros o contrário acontece [22].

É importante citar o sistema de realimentação do equipamento, ou *feedback*, que é composto por um feixe de laser, um espelho, e um fotodetector. Esse sistema informa o deslocamento da sonda, quando esta é defletida ao interagir com a amostra.

A última parte que compõe o sistema AFM é a unidade de controle, onde parâmetros da medida como a força aplicada, velocidade de varredura, modo de operação, entre outros, são selecionados. Nesta unidade as imagens e parâmetros obtidos com as medidas AFM são processadas por meio do *software* Nanoscope 5.12r3[©].

1.3 Investigação de Células Vivas por meio de AFM

Avanços no nosso entendimento sobre biologia molecular e celular foram e continuam sendo ditados pelo desenvolvimento de novas técnicas que permitem o estudo estrutural e funcional de materiais vivos. A paixão de van Leeuwenhoek's pelo conhecimento levou à descoberta do primeiro microscópio ótico no século 17, o que tornou possível a visualização de células individuais. As suas poderosas lentes de magnificação alicerçaram muitas revoluções na biologia [23]. Desde então, o surgimento de novos microscópios nos tem permitido observar sistemas cada vez menores, indo desde componentes subcelulares até moléculas individuais. Indubitavelmente, elucidar as estruturas tridimensionais de proteínas, ácidos nucléicos e conjuntos dessas macromoléculas a nível molecular, é decisivo no ganho de conhecimento sobre as funções biológicas. Usando técnicas como difração de raios-X, ressonância magnética nuclear (NMR) e microscopia eletrônica, uma riqueza de informações sobre a estrutura e a função de biomoléculas individuais tem sido adquiridos. Contudo, todas essas ferramentas também têm suas limitações, quais sejam: dificuldades na cristalização de proteínas, que podem limitar

o uso geral da difração de raios-X; estudos em NMR de estruturas macromoleculares dinâmicas têm uma restrição de tamanho que limitam as estruturas que podem ser estudadas; o contraste em microscopia eletrônica de materiais biológicos é baixo, sendo necessária uma preparação adicional da amostra [24].

Sob esse ponto de vista, uma considerável atenção foi recentemente focada às aplicações biológicas e biomédicas do microscópio de força atômica, e, em particular, sua habilidade de "olhar" diretamente para a dinâmica e arquitetura das biomoléculas, em nível de uma única molécula, com excelente resposta do sistema em relação ao seu ruído intrínseco.

Inicialmente aplicado como técnica para ciências dos materiais [25], atualmente o AFM tem cruzado os limites dessas áreas de aplicação tradicionais e é rotineiramente utilizado como ferramenta de investigação de biomateriais. A intensificação da utilização do AFM em estudos biológicos veio com o desenvolvimento da célula líquida, o que permitiu a observação das amostras em ambiente aquoso [26]. As primeiras imagens de moléculas de DNA obtidas com o AFM em modo contato foram encorajadoras, mas muito difíceis de reproduzir devido ao movimento dessas pequenas moléculas sob a sonda.

O potencial do AFM para fazer imagens de amostras biológicas com resolução molecular (ou até mesmo submolecular), sob condições fisiológicas de forma não invasiva, onde a função e estrutura originais das biomoléculas sob investigação sejam preservadas, torna essa técnica muito atrativa para os biólogos.

A célula é a peça fundamental em todos os organismos. No início, os biólogos enxergavam as células como simples sacos membranosos, contendo líquido com poucas partículas flutuantes. Sabemos, atualmente, que as células são infinitamente mais complexas. São muitos os tipos, tamanhos e formas, cada uma possuindo uma função única no corpo. Todas as células são envoltas por uma membrana plasmática, que possui uma organização dinâmica multifuncional de bicamadas lipídicas e de proteínas. O papel da membrana não é somente manter a integridade da célula, mas também realizar de forma satisfatória uma variedade de importantes funções fisiológicas. A

membrana, juntamente com as proteínas que a constituem, realiza todas as comunicações da célula com o ambiente externo. Ela atua como um sítio receptor, controla o transporte de moléculas para dentro e fora da célula e mantém os sinais de transferência entre células, como, por exemplo, as do sistema nervoso [24]. Contudo, se disfuncionais, as membranas podem ser a causa de muitas doenças [27, 28].

As membranas são modeladas como estruturas bidimensionais essencialmente compostas de lipídios e proteínas organizadas em domínios (Fig. 1.10) [29]. Elementos do citoesqueleto são outros componentes envolvidos na organização da membrana plasmática.

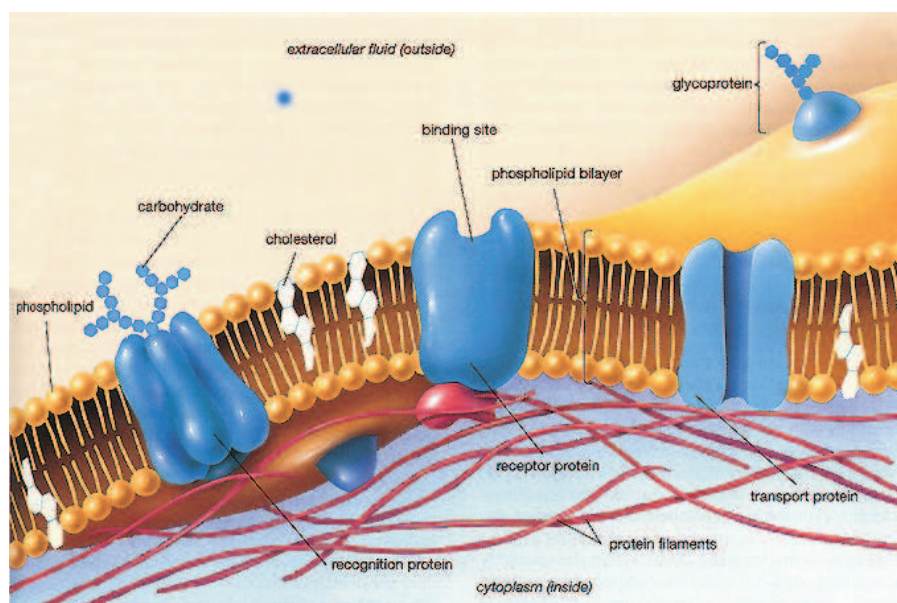


Figura 1.10: Esquema da membrana celular composta pela dupla camada lipídica e proteínas [30].

O primeiro requisito para obtenção de imagens de células é comum a todas as categorias de amostras. Em princípio, o AFM somente pode fazer imagem de materiais que aderem ou que são fixos a um substrato. Assim, células em suspensão podem ser empurradas para longe pela sonda no momento da varredura, logo suas imagens não podem ser realizadas por meio desta técnica. Entretanto, algumas células, mediante processo de fixação ou até mesmo espontaneamente, podem aderir à superfície de lâminas de vidro ou mica, substratos mais utilizados em imagens de células [31]. O vidro

é suficientemente plano para fazer imagens de células, mas é geralmente muito rugoso para visualização de DNA, especialmente sob fluido. As imagens de DNA e proteínas são usualmente feitas em mica, que possui baixa rugosidade, entre $0.06 \pm 0.01\text{nm}$ [32].

Um método bastante conhecido entre biólogos celulares consiste em cobrir uma lâmina de vidro com um material de carga positiva, ajudando a fixar um grande número de células a uma superfície lisa [21]. Usando um AFM acoplado com um microscópio ótico invertido, facilmente a sonda é posicionada em cima do corpo da célula [33]. Para os microscópios de força atômica tradicionais, com um sistema piezelétrico localizado abaixo da amostra, encontrar células dispersas freqüentemente requer paciência, ao passo que trabalhar sob líquido impõe proteger o piezo de vazamentos.

A investigação de mecanismos celulares é realizada com três das principais características do AFM, que são: a combinação de uma alta sensibilidade em aplicar e medir forças, a alta precisão no posicionamento da sonda em relação à amostra nas três dimensões e a possibilidade de operar em líquidos, especialmente meios fisiológicos.

Tecnicamente, isso foi feito primeiramente usando o método de modulação de força, que veremos em melhor detalhe *a posteriori*. Contudo, para se determinar as propriedades elásticas de células de forma quantitativa e reprodutível, curvas de força são elaboradas, armazenadas e analisadas como uma função da posição da célula. Propriedades mecânicas de diferentes tipos de células, tais como as plaquetas humanas, têm sido investigadas [34]. Essas propriedades desempenham um papel importante nos processos celulares e podem servir como indicadores desses processos [35], porém, somente um limitado número de técnicas está disponível para a investigação de tais propriedades [36, 37, 38, 39, 40]. A microscopia de força atômica realiza a investigação dessas propriedades, com a vantagem de um controle preciso das forças que são aplicadas sobre as células (da ordem de pN), e da posição em que essas forças são aplicadas. A técnica de investigação de propriedades mecânicas de células por meio de AFM será discutida com mais detalhes oportunamente.

1.4 Imagens AFM em meio líquido

A observação de imagens de amostras em líquido é uma aplicação crescente da tecnologia do AFM que pode ter sido estimulada pelo desejo de minimizar as forças de superfície em amostras delicadas e pela necessidade de observar espécimes biológicos em seus ambientes naturais e ou pela necessidade de se fazer, em tempo real, observações das amostras que se submetem às reações eletroquímicas.

Observar amostras sob o líquido elimina as forças atrativas devido à tensão de superfície [41]. Isto permite que a superfície da amostra seja estudada com um mínimo de força aplicada pelo *cantilever*, o que representa uma vantagem quando espécimes biológicos e materiais delicados são observados.

Essencialmente, o procedimento para observar amostras sob o líquido é idêntico aos das modalidades do contato ou *tapping* no ar, já comentados anteriormente. Entretanto, são necessários alguns acessórios especiais para confinar o líquido sobre a amostra. Além disso, ajustes adicionais devem ser feitos para corrigir efeitos refrativos devidos à interface ar-líquido no caminho do feixe de laser.

A célula líquida (Fig. 1.11) consiste em um pequeno vidro com um grampo para prender a sonda AFM. Sua superfície de vidro lisa possibilita que o feixe de laser possa passar pelo líquido sem ser distorcido pela superfície fluida instável.

1.4.1 Métodos básicos para obtenção de imagens AFM com célula líquida.

Para se examinar a topologia das células ou qualquer material biológico, as sondas AFM devem operar preferencialmente em fluido (soluções fisiológicas) e podem fazê-lo sob os dois modos de operação já citados: contato ou *tapping*. No modo contato, a sonda fica em contato direto com a superfície da amostra e a varredura é feita com uma força vertical constante. Apesar das melhores resoluções de imagens serem obtidas com esse modo de operação, a informação gerada da altura da amostra pode não ser

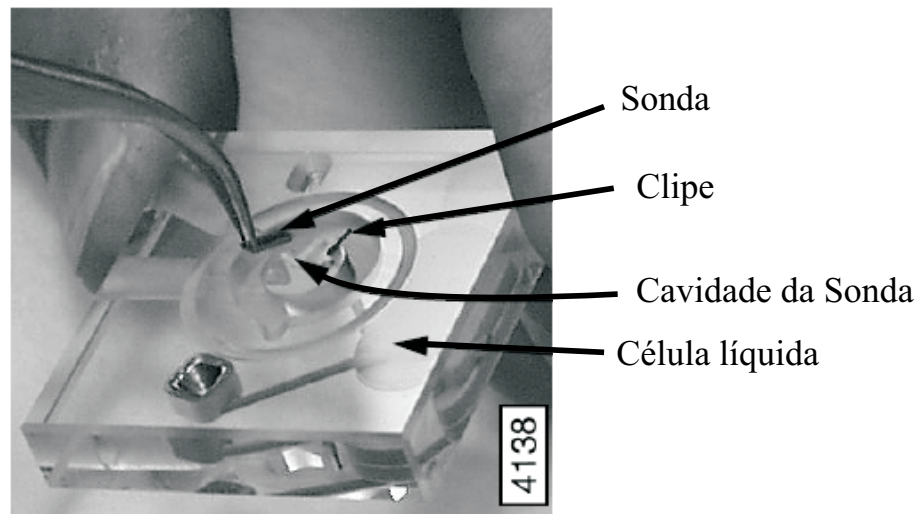


Figura 1.11: Parte de baixo de uma célula líquida sendo carregada por uma sonda [42].

precisa, pois a força vertical deforma a superfície macia da célula. Por outro lado, no modo *tapping*, o *cantilever* é posto para ressonar, e a sonda faz breves contatos com a amostra. Em ambos os modos de operação, a taxa de varredura da sonda sobre a amostra desempenha um importante papel na qualidade da imagem. Devido ao fato de as células serem estruturas macias, uma alta taxa de varredura influencia na qualidade da imagem final. Conseqüentemente, um movimento lento da sonda sobre a superfície celular seria ideal e resultaria em distorções mínimas e imagens melhor definidas [21].

Geralmente, usando as condições padrões de engate da sonda em líquido, as curvas de força *versus* distância possuem um aspecto limitado. Uma histerese considerável entre as curvas de aproximação e retração é observada, sendo muito difícil, mas não impossível, determinar o início da interação entre a sonda e a amostra, e, conseqüentemente, a quantidade de força aplicada à superfície durante a varredura. Tais curvas revelam que, para o comprimento total da distância vertical z , a sonda que está em contato com a superfície é progressivamente empurrada para baixo. Isso ocorre muito provavelmente devido à maciez da superfície da célula. A realização de imagens sob condições onde uma larga histerese entre as curvas ocorre, resulta para a célula, assim como para qualquer material, numa imagem de altura com pobreza de informações. Imagens de deflexão da superfície de células podem ser obtidas sob essas condições, mas

devem ser criticamente analisadas devido à ausência de controle na força de varredura [43].

A realização de imagens em fluidos sem a utilização de um *O Ring* é o método padrão para muitos microscópios de varredura por sonda e torna a obtenção de imagens mais simples. O *O Ring* é um anel de borracha utilizado para confinar o líquido sobre a área de varredura (Fig. 1.12). A sua não utilização é um método opcional quando se opera com um SPM MultiMode[®]. Imagens em fluido podem ser feitas por aproximadamente uma hora antes da evaporação do fluido.

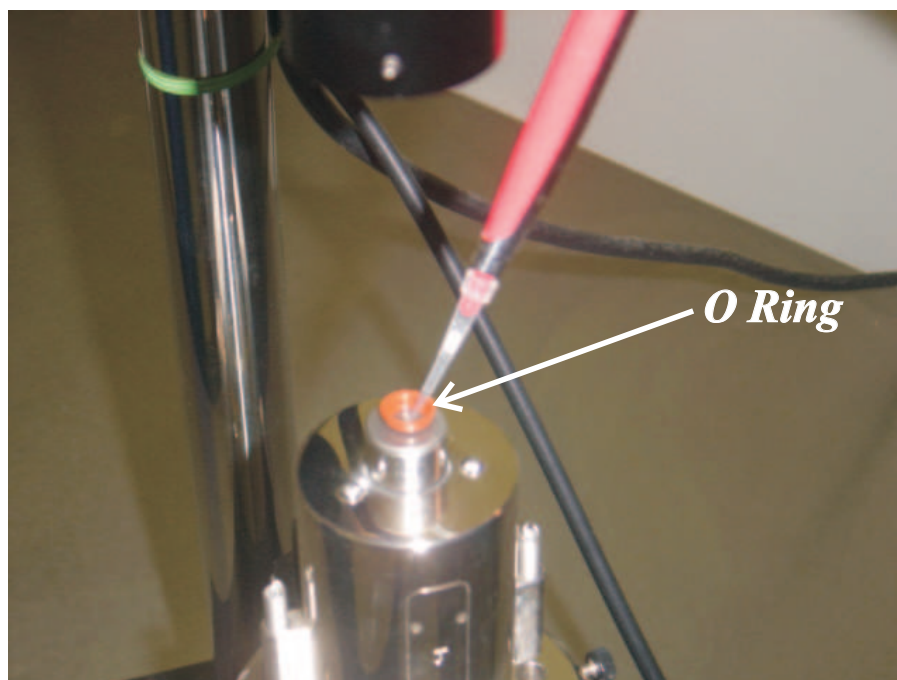


Figura 1.12: *O Ring* onde fica depositado o líquido no qual é imersa a sonda e a amostra durante a varredura.

Se existe a necessidade de mudar o fluido enquanto a amostra está sendo varrida, é usualmente recomendável trabalhar com *O Ring*, mas podemos limitar a quantidade de fluido sem a necessidade deste acessório, desde que utilizadas duas seringas nas entradas da célula líquida (Fig. 1.13), uma vazia para sugar o líquido a ser substituído, e a outra contendo o líquido novo que se deseja injetar. Fazendo isso repetidas vezes, temos uma completa troca dos fluidos. No entanto, deve-se tomar muito cuidado para

não injetar muito fluido, pois este pode sair do limite da amostra e escoar em direção ao *scanner*, danificando-o.

Para o modelo de AFM MultiMode[®], o qual utilizamos neste trabalho, o *O Ring* é indispensável. Uma melhora pode ser feita no *O Ring* cortando-se a borda de fora com um bisturi ou lâmina para lhe diminuir o diâmetro externo. Com a utilização do *O Ring* para vedar a célula líquida, o fluido somente deve ser injetado por meio de seringas, através das entradas destinadas para esse fim (Fig. 1.13).



Figura 1.13: Célula líquida com sistema de injeção de fluido.

Existem pelo menos duas maneiras de preparar amostras para imagens em fluidos. Frequentemente, podemos simplesmente colocar uma gota de $30\text{-}35\ \mu\text{m}/l$, do fluido de interesse, sobre o *cantilever*, já posicionado na célula líquida, virando-o rapidamente e colocando-o no AFM, tomando-se cuidado para que a amostra esteja suficientemente longe do *cantilever*, a fim de não danificar a sonda. Outra maneira é fazer a aproximação do *cantilever* já associado à célula líquida em direção a amostra, e, somente depois, adicionar o líquido.

Se houver necessidade de fazer imagens por mais de uma hora, devem-se adicionar

poucos microlitros da solução de análise na célula líquida periodicamente. Isso pode ser feito por meio de seringas ou micropipetas, inserindo diretamente no espaço entre a célula líquida e a amostra ou, se o equipamento utilizado é um AFM MultiMode[®], o fluido é injetado em uma das aberturas para entrada de seringa da célula líquida. A amostra deve ser bem lavada para remover os biomateriais que não aderiram ao substrato, antes que a sonda seja posicionada em cima dela.

As bolhas de ar, que eventualmente aparecem quando trabalhamos em meio fluido constituem um problema quando posicionadas sobre o *cantilever*. Geralmente quando há defeitos nas imagens em líquidos, é recomendável verificar a presença de bolhas. Muitas vezes, essas bolhas podem ser removidas simplesmente pela elevação e abaixamento da sonda. Também é possível com remoção da célula líquida, nela se batendo levemente para que as bolhas possam ser desalojadas. Outra forma é fazer o fluido correr para dentro e para fora da célula líquida por meio das seringas.

1.5 As plaquetas humanas

As plaquetas são formadas pela fragmentação do citoplasma do megacariócito e não possuem núcleo. Têm forma discóide, com um diâmetro normalmente de 2 a 3 μm e espessura em torno de 1.0 μm e volume de 7.0 fl. Após serem liberadas pela medula óssea, as plaquetas são "seqüestradas" no baço por 24 a 48 horas. O baço contém cerca de 30% da massa circulante plaquetária. O período de vida das plaquetas é de, aproximadamente, 8 a 14 dias, sendo removidas da circulação sanguínea pelos macrófagos. Em condições normais, estão em número de 140.000 a 400.000/ μl no sangue periférico. Apesar da aparência simples na microscopia ótica, as plaquetas possuem estrutura funcional complexa, permitindo-lhes rápido reconhecimento da lesão vascular, com o objetivo de iniciar o tampão hemostático.

A membrana celular lipoprotéica é composta de fosfolipídios, entre os quais se encontram o colesterol, glicolipídios e glicoproteínas. A exposição dessa superfície fosfolipídica carregada negativamente durante a ativação plaquetária oferece um ambiente ideal para vários estágios da hemostasia. O citoesqueleto contribui para manter a forma

discóide das plaquetas não ativadas, sendo composto por um sistema circunferencial de microtubulos de constituição protéica e por filamentos de actina.

A plaqueta possui um sistema canalicular aberto que começa na membrana plasmática e permite o intercâmbio de substâncias entre os compartimentos extra e intracelular. O sistema tubular denso, proveniente do retículo endoplasmático, "seqüestra" cálcio, liberando-o na ativação plaquetária.

A membrana plaquetária expressa glicoproteínas que funcionam como receptores de proteínas de adesão, envolvidos em diversos estágios da função plaquetária. As glicoproteínas são representadas principalmente pelo grupo das integrinas e das glicoproteínas ricas em leucinas. O termo "integrina" é utilizado pelo fato desse receptor integrar diversas atividades biológicas de compartimentos extras e intracelulares. A maior parte das proteínas da membrana pode ser encontrada em outros tipos de células. A nomenclatura para designar as glicoproteínas não é única. A mais comumente utilizada é baseada na mobilidade eletro-forética em gel de poli-acrilamida, na qual as proteínas de maior peso molecular possuem menor mobilidade (Tab. 1.1) [44].

Tabela 1.1: Principais Glicoproteínas plaquetárias e proteínas de adesão [44].

TABELA 1.1	
Glicoproteínas.	Principais proteínas de adesão.
Integrinas	
GPIIb/IIIa	Fibrinogênio, fvW, Fibronectina, Vitronectina
GPIa/IIa	Colágeno
GPIc/IIa	Fibronectina
VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$)	Laminina
Receptor da Vitronectina	Vitronectina, Trombospondina
Glicoproteínas ricas	
Leucina	
GPIb/IX	fvW

As células podem tolerar impactos físicos como estresse ou pressão que vêm do ambiente, modificando seus componentes estruturais. Conseqüentemente, adaptam-se dinamicamente às diferentes circunstâncias. As proteínas estruturais, presentes no citoesqueleto, juntamente com os receptores de adesão e a resistência intrínseca da bicamada de lipídio da membrana celular, permitem que a célula mantenha sua forma e função específica [45]. Isto é bem ilustrado pelos eritrócitos, os quais, muitas vezes, passam por capilares com somente metade do seu diâmetro. Isso é possível devido à grande resistência elástica de suas membrana que os protege de quaisquer rupturas. [34].

Muitos outros processos fisiológicos dependem das propriedades mecânicas das células, como a citocinese (formação do tubo neural durante o desenvolvimento ou ligação da célula e migração na metástase) [46]. As plaquetas são exemplos de como as propriedades mecânicas das células são precisamente controladas [47], pois são fragmentos de células do megacariócito e, apesar de não possuírem nenhum núcleo, podem mudar dinamicamente a sua forma bem como as suas propriedades funcionais.

Plaquetas não ativadas circulam no sangue como discos biconvexos. Imediatamente após a ativação, mudam seu aspecto para vários formatos dependendo do estímulo. Por exemplo, em superfícies como o vidro, se tornam discos planos, estáveis e bem fixos [48], o que as tornam objetos bem adaptados para a microscopia de força atômica (AFM).

Neste trabalho, o nosso objetivo foi o estudo das propriedades físicas da superfície de plaquetas humanas em combinação com a sua topografia para obter uma melhor compreensão das funções dessas células nos mecanismos de adesão e de agregação.

Para a investigação de tais propriedades, utilizamos a espectroscopia de força realizada por meio de AFM, técnica que foi discutida com detalhes no capítulo 2. A interpretação dos dados gerados com essa técnica e a sua direta aplicação em plaquetas foram abordados no capítulo 3.

Por meio do comando *Force Plot* do *software* do microscópio, realizando *zooms* nas regiões de interesse, curvas de força foram obtidas para cada uma dessas regiões, a partir das quais os valores de módulo elástico foram calculados, valendo-se de um

modelo teórico apropriado, como visto no capítulo 4. Além disso, no mesmo capítulo, imagens de modulação de força foram feitas em uma região do substrato contendo uma plaqueta, a fim de obter de dados qualitativos a respeito de suas propriedades elásticas.

No capítulo 5, imagens de volume de força (*Force Volume*), foram obtidas, e curvas de força igualmente distribuídas na superfície da célula foram realizadas, permitindo um estudo mais detalhado do comportamento dessas células quando submetidas a um *stress* mecânico, e de suas propriedades físicas.

As conclusões e perspectivas foram apresentadas no capítulo 6, no qual confirmamos a utilidade do AFM como ferramenta investigativa das propriedades físicas de plaquetas humanas e apresentamos a interpretação dos resultados obtidos nos capítulos anteriores.

2

Espectroscopia de Força via AFM - Técnicas e análise.

*Os gráficos de força são usados para medir as interações entre a sonda e a amostra e determinar melhores valores de **setpoints** que se devem aplicar nas medidas. Mais recentemente, os microscopistas começaram a esboçar medidas de força através de superfícies inteiras a fim de revelar novas informações sobre a amostra. Esta área em SPM promete abrir novos tópicos na ciência de materiais, na biologia e em outras áreas investigativas.*

2.1 Uma analogia a respeito das curvas de força.

Uma curva de força é resultante de interações entre a sonda de AFM e a amostra estudada, produzindo diversas informações a respeito dessa amostra.

Para entender este processo, suponhamos que um pesquisador é incumbido de determinar quão poderosos são dois diferentes tipos de ímãs. Um dos ímãs é feito de ferro e o outro, bastante forte, é um ímã conhecido como "terra rara". Uma maneira simples de medir o poder de cada ímã seria puxá-los para cima ou, desce-los em direção a uma placa de aço com o objetivo de medir a força de interação entre os dois. Poder-se-ia pendurar cada ímã em um dinamômetro, ajustar sua escala para o zero e começar então a abaixá-lo em direção a placa de aço. Em distâncias regulares da placa, a quantidade de tração que é mostrada na escala é anotada. Em alguma altura acima da placa, cada ímã seria atraído fortemente a ela. O comportamento da razão entre a altura h e a tração magnética nestas distâncias escolhidas, daria um índice comparativo do poder de cada ímã. Similarmente, poderíamos puxar cada ímã para longe da placa medindo quando o ímã desprende-se dela. O ponto de desprendimento de cada ímã daria um índice de seu poder. Uma representação do caso em que o ímã é baixado em direção à placa é mostrada na Fig. 2.1.

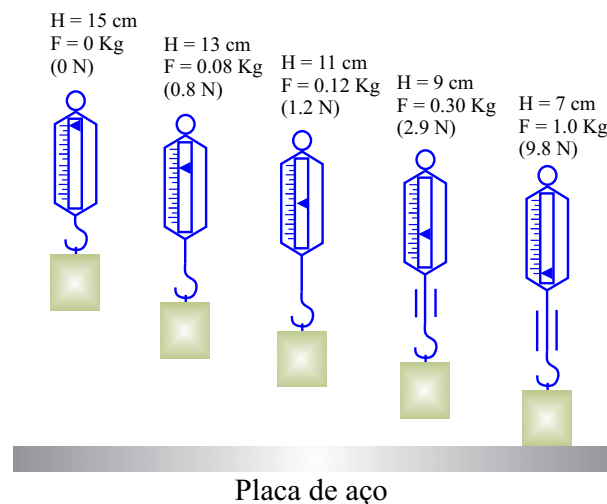


Figura 2.1: Valor da força medida em intervalos regulares durante o ciclo de abaixamento do ímã.

O ímã é baixado em intervalos controlados e a força com que é puxado pela placa para baixo é medida em intervalos de altura de 1 cm. Um gráfico desse experimento que usa dois ímãs é mostrado na Fig. 2.2. Ele mostra a atração de cada ímã enquanto se aproximam da placa, e a tenacidade enquanto retirados da região de contato. Supondo que ambos os ímãs possuem o mesmo tamanho, este revela, pelo menos, duas assertivas sobre o poder de cada ímã. A primeira é que o ímã 1 é mais forte, unindo-se à placa de aço com 1 Kg em 11 cm, e que o ímã 2 é mais fraco, unindo-se em 7 cm com somente 0.6 Kg. A segunda é que a inclinação dos gráficos revela algo sobre a escala e a densidade do campo de cada ímã. O ímã 1 exibe uma rápida anexação e desprendimento da placa, com uma curva bastante íngreme, enquanto o outro apresenta uma anexação e desprendimento mais lento e sua curva é menos inclinada, devido, talvez, a um campo magnético mais fraco [49].

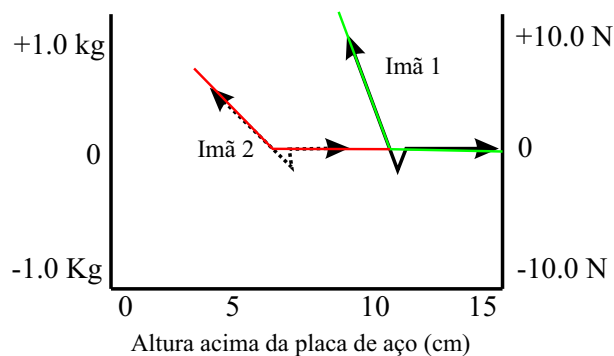


Figura 2.2: Representação gráfica da força com que o ímã é puxado para baixo. Adaptado de [49].

O exemplo supramencionado almeja simplificar o que ocorre na interação da sonda de SPM quando aproximada da superfície da amostra analisada. Na realidade, os gráficos de força obtidos quando fazemos medidas com um SPM revelam muito mais. Por exemplo, combinando a curva de força em intervalos regularmente espaçados sobre a amostra, é possível gerar um mapa de força das propriedades elétricas da amostra, do módulo elástico, das forças químicas de ligação, etc.

2.2 Forças que atuam no AFM.

Para entender o funcionamento de um microscópio de força atômica devemos ter conhecimento das forças que interagem entre os sistemas microscópicos em distâncias muito pequenas, sendo a referida interação o princípio de funcionamento desse microscópio.

Como o AFM realmente obtém as suas imagens e como nós podemos nos assegurar que são de boa qualidade? Sabemos que tais imagens são obtidas a partir do "*feeling*" entre a sonda e a superfície da amostra e que a intensidade dessa interação varia ao longo da varredura. Dependendo do regime em que o *cantilever* opera (forças atrativas ou repulsivas), diferentes modos de imagem podem ser aplicados, como visto na Seção 1.3. A operação com AFM depende basicamente do monitoramento das forças atuantes entre o par sonda-amostra. Nessa Seção, os diferentes tipos de força, que são freqüentemente encontrados em sistemas biológicos serão introduzidos. Como o próprio nome sugere, no microscópio de *Força Atômica*, as interações entre a sonda e a superfície da amostra são produzidas por uma ou mais forças intermoleculares. A seguir, veremos quais são essas forças e como são geradas.

2.2.1 Forças de van der Waals.

Analisando-se por um modelo clássico, os elétrons de um corpo qualquer estão em constante movimento e em altas velocidades. Mesmo que um dado objeto possa parecer eletricamente neutro em períodos de tempo convencionais, em intervalos de tempo extremamente curtos, a distribuição de carga elétrica não é perfeitamente simétrica. Essas mudanças sutis da carga elétricas de um corpo são chamadas de dipolo ou multipolo elétrico.

Cada molécula exibe, para um curtíssimo intervalo de tempo, uma leve diferença na distribuição de suas cargas, que também é dependente do número de elétrons que ela possui. Essa instabilidade das cargas elétricas em uma molécula pode induzir uma instabilidade similar em uma molécula vizinha. Normalmente, esses efeitos são "mascarados" pelas forças eletrostáticas que possuem uma maior intensidade. Con-

tudo, é importante enfatizar que as forças de van der Waals estão presentes em todos os materiais, mesmo quando eles se mostram eletricamente neutros. É possível caracterizar as partes repulsivas e atrativas da relação entre a sonda e a amostra modelando essa interação. Isso envolve a variação da energia potencial de uma partícula (que seria o ápice da ponta de AFM) devido à interação com uma outra da superfície da amostra. A energia potencial para o par sonda-amostra pode ser descrita matematicamente pela função $E^{par}(r)$, que é a energia potencial do par. Um caso específico de função da energia potencial do mencionado par, conhecido como potencial de "Lennard-Jones", é utilizado para modelar esse comportamento [50]:

$$E^{par}(r) = 4\epsilon_0 \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right], \quad (2.1)$$

onde r é a separação entre o par, e ϵ_0 e σ são constantes que dependem do material.

Coincidentemente, σ é aproximadamente igual ao diâmetro dos átomos, sendo frequentemente chamado de "diâmetro de esferas maciças". A Fig. 2.3 mostra a variação da energia potencial entre dois átomos. O termo $1/r^{12}$ na Eq. (2.1) é responsável pelo aumento da energia em $E^{par}(r)$ a pequenas separações, enquanto o fato de $r < \sigma$ acarreta na forte repulsão entre os átomos, em decorrência do princípio de exclusão de Pauli, quando estes átomos aproximam-se demais. O termo $1/r^6$ é responsável pela mudança suave no comportamento atrativo a grandes separações. As forças de van der Waals atuam nessa porção do potencial. Em separações relativamente "grandes" (algumas centenas de nm), qualquer força atrativa é pequena para exercer alguma interação entre os átomos da amostra e aqueles encontrados no ápice da ponteira de AFM. Além disso, a natureza elástica dos *cantilevers* assegura que qualquer deflexão sofrida por eles devido às forças intermoleculares seja aparente. À medida que a separação entre o par é reduzida, as forças aumentam rapidamente. Isso ocorre mesmo se a sonda e a superfície da amostra encontrarem-se eletricamente neutras. As forças atrativas em curtas distâncias fazem com que o *cantilever* se curve em direção à amostra. Após curvar-se, este *cantilever* "aterrissa" na superfície da amostra para dar início a varredura.

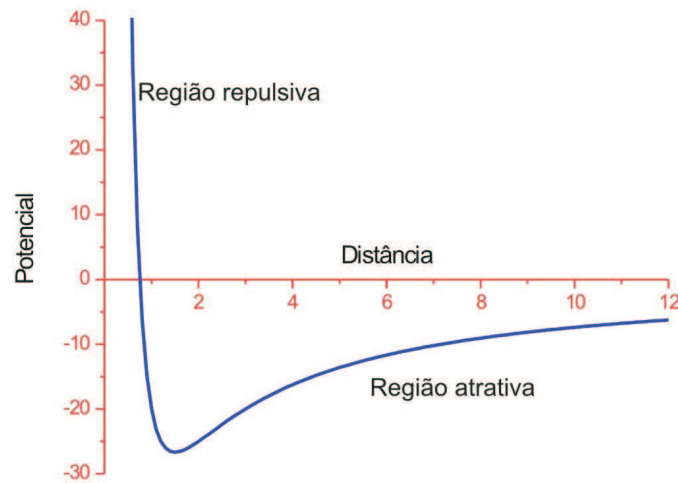


Figura 2.3: Forças entre a sonda e a amostra em função da distância entre elas.

2.2.2 Forças eletrostáticas.

Eletrostáticas ou coulombianas são as forças presentes nas ligações iônicas responsáveis pela principal influência física das forças intermoleculares que atuam em uma medida realizada com AFM. Considerando duas cargas opostas, q_1 e q_2 , no vácuo e a pequenas separações r , elas serão atraídas uma pela outra. A resultante da interação entre essas cargas é a conhecida força da Lei de Coulomb:

$$F_c = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{q_1 q_2}{r^2}, \quad (2.2)$$

onde ϵ_0 é a constante de permissividade do meio.

Na medida em que os íons se aproximam, as forças atrativas entre eles aumentam rapidamente. Eventualmente, a camada externa de elétrons em cada íon interage e forças repulsivas começam a atuar entre eles. Isso se deve a dois efeitos. O primeiro é o princípio de exclusão de Pauli. O segundo é fato de que os elétrons que envolvem o núcleo possuem agora uma função relativamente pobre na interação, a separações muito pequenas, entre os núcleos dos íons.

2.2.3 Capilaridade e forças adesivas.

Um ponto de contato com pequeno raio de curvatura sobre uma superfície atua com sítio ideal para a condensação do vapor de água presente no ar. A camada de água é condensada sobre a superfície da amostra sob condições normais de umidade relativa. Isso significa que, quando realizamos uma medida em ar, a sonda de AFM será "puxada" em direção à amostra devido ao menisco formado pela camada de umidade. Esse efeito é conhecido por força de capilaridade [1].

O principal problema ocasionado pela força de capilaridade é o fato da sonda aderir fortemente na superfície da amostra analisada devido à camada de contaminação. Esse efeito independe dos ajustes do equipamento, sendo bastante difícil de ser compensado pelo operador. Uma consequência das medidas realizadas em ar é que a força de capilaridade pode ser forte o suficiente para destruir ou mover amostras delicadas sobre o substrato.

A presença do efeito de capilaridade também aumenta a necessidade de ajustar os ganhos do equipamento. À medida que a sonda é "aprisionada" pela fina camada sobre a amostra, aumenta sua tendência de oscilar incontrolavelmente quando ganhos incorretos são ajustados. Isso produz um efeito nas imagens conhecido por "*gain ripple*", que ocorre particularmente em dias mais úmidos [51].

Eliminar as forças de capilaridade é, talvez, o passo mais importante para se obter imagens de qualidade em ar de espécimes biológicos. Felizmente, é possível verificar a presença de grandes forças adesivas (como as de capilaridade), gerando-se curvas de força *versus* distância e examinando-se qualquer assimetria das curvas de retração, como mostrado na Fig. 2.4.

2.2.4 Forças de "dupla camada" (*Double Layer*).

Esse tipo de força surge quando realizamos imagem em meio líquido, utilizando mica como substrato. A mica, carregada negativamente, atrai íons com carga oposta provenientes da solução na qual a imagem está sendo realizada. Isso resulta na formação de "*clusters*" na interface sólido-líquido, levando à formação de uma camada posi-

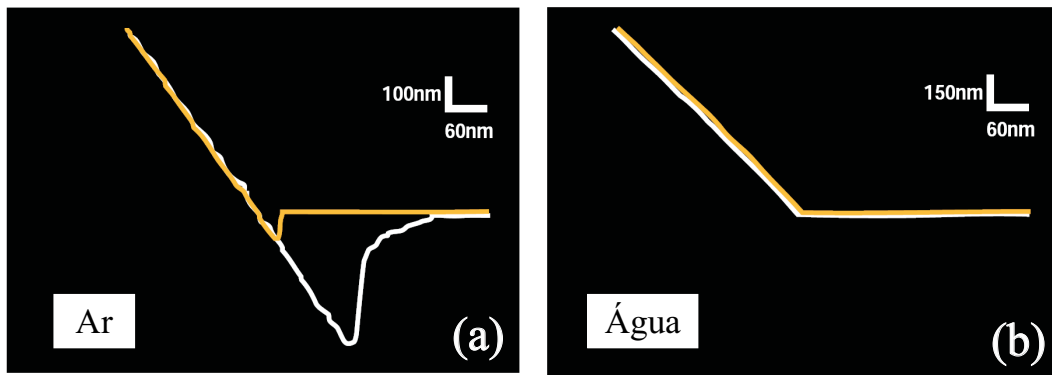


Figura 2.4: Curvas de força *versus* distância realizadas em ar e em meio fluido respectivamente. Em (a) observamos a presença de grandes forças adesivas devido à camada de contaminação que está presente nas amostras examinadas em ar. Em (b), vemos que essas forças são eliminadas quando a imagem é realizada em líquido, como veremos *a posteriori* [17].

tivamente carregada, freqüentemente conhecida como "atmosfera iônica". À medida que nos afastamos da superfície, o potencial de interação decai exponencialmente. A "espessura" dessa atmosfera iônica é conhecida como comprimento de "Debye" ($1/k$). Para superfícies de baixo potencial (ψ_0), este, a uma distância ψ_x é relatado pela aproximação:

$$\psi_x = \psi_0 e^{-kx}. \quad (2.3)$$

2.3 A curva de Força.

A Fig. 2.5 representa uma curva de força AFM obtida no modo contato. Sondas de nitreto de silício com baixa constante de mola são mais recomendadas para obtenção destas curvas, pois são mais moles e portanto, mais sensíveis às interações sonda-amostra, deflexionando-se com maior facilidade.

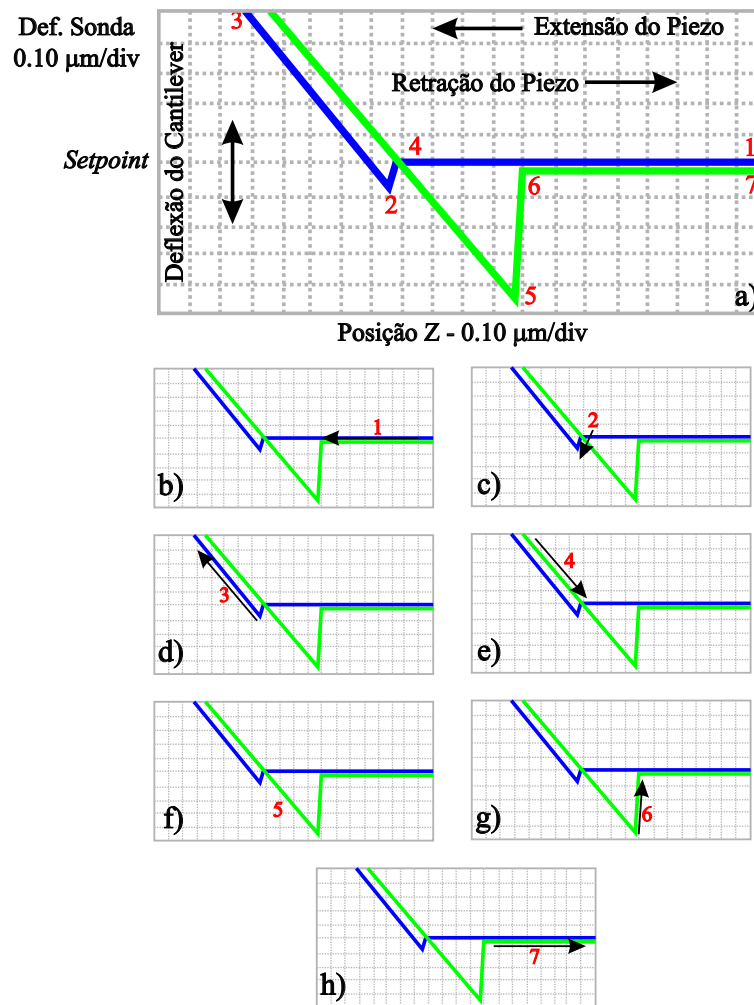


Figura 2.5: (a) Anatomia de uma curva de força, (b) o piezo sofre extensão e a sonda desce em direção a amostra, ainda não há contato com a mesma; (c) a sonda desce bruscamente em direção a amostra devido às forças atrativas; (d) a sonda pressiona a superfície e o *cantilever* é flexionado para cima; (e) o piezo se retrai, a sonda sobe até que as forças estejam em equilíbrio e o *cantilever* relaxa para baixo; (f) o piezo continua se retraindo e a sonda sobe ainda mais, o *cantilever* se curva para baixo devido às forças de atração que prendem a amostra; (g) como a sonda continua subindo, esta se livra da atração da superfície, o *cantilever* se flexiona bruscamente para cima; (h) o piezo continua se retraindo e a sonda permanece em seu movimento ascendente, nesse momento, não há mais contato entre a sonda e a amostra.

O eixo horizontal traça o movimento da sonda relativo à amostra. Enquanto esta desce para a amostra, a distância sonda-amostra diminui. A deflexão do *cantilever* é traçada no eixo vertical do gráfico. O gráfico revela pelo menos dois fatos muito importantes.

O primeiro é a atração sonda-amostra. Como a ponta se aproxima da amostra, várias forças atrativas "agarram" a sonda, o que é evidenciado no ponto 2 na Fig. 2.5. Note-se que a sonda de repente "mergulha" em direção à amostra durante a descida. Isto é comumente chamado de "pulo ao contato", geralmente devido às forças da atração eletrostática e ou de tensão superficial (capilaridade).

A atração é também evidente entre os pontos 3 e 4 (linha inclinada), onde o *cantilever* é empurrado para longe da amostra. Se as forças atrativas forem fortes o bastante, a ponta aderir-se-á à superfície da amostra. Eventualmente, quando a sonda desprende-se da superfície, aquela retorna bruscamente para seu estado de equilíbrio (segmento 6 do gráfico). Sabendo-se a constante de mola do *cantilever*, é possível medir as forças atrativas de interações sonda-amostra com boa precisão.

O segundo aspecto é a elasticidade do material. É possível extrair informações a respeito da elasticidade do material estudando-se a curva de força. Na Fig. 2.5, a ponta está em contato constante com a amostra entre os pontos 2 e 3. Como a ponta é pressionada constantemente no material, o *cantilever* se flexiona. A quantidade de deflexão para uma dada quantidade de movimento descendente da sonda fornece uma indicação da elasticidade do material. Por exemplo, se o material for extremamente duro, pressionar a sonda contra ele resultará numa quantidade relativamente grande de deflexão. Se o material for macio, o *cantilever* vai sofrer menor deflexão durante sua descida.

O formato, a inclinação e o ponto de contato da curva de força dão informação detalhada sobre a elasticidade de superfície. Muitas vezes, é possível obter medidas quantitativas da elasticidade da amostra. Duas técnicas de obtenção de imagem podem ser empregadas para medir e indicar a elasticidade em pontos múltiplos em uma superfície da amostra: modulação de força e imagem de volume de força, que serão

melhor detalhadas nas próximas seções.

2.4 Imagens AFM de Modulação de Força.

A imagem de modulação de força é uma técnica AFM desenvolvida em 1989, que identifica e mapeia diferenças qualitativas na rigidez ou na elasticidade de superfícies, sendo uma entre as diversas técnicas desenvolvidas como extensões da microscopia de força atômica [52]. Esta técnica estuda várias propriedades de superfície com a finalidade de distinguir os diferentes materiais ou características mecânicas que compõem as superfícies heterogêneas (Fig. 2.6).

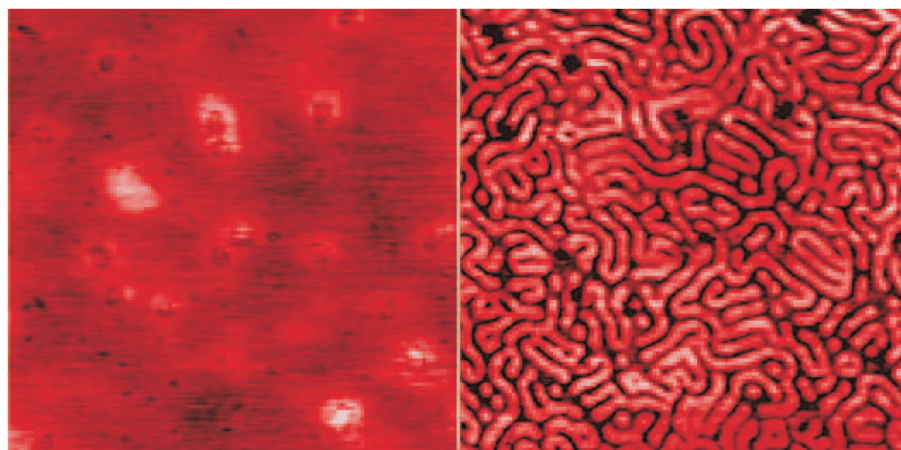


Figura 2.6: A figura da esquerda mostra uma imagem de altura em modo contato, à direita visualizamos uma imagem de modulação de força do mesmo polímero. As regiões mais macias do polímero estão mapeadas em preto. A varredura possui 900 nm de tamanho lateral [53].

A modulação de força possui diversas aplicações, dentre elas as transições localizadas entre diferentes componentes em compósitos, investigação de materiais orgânicos em substratos duros e identificação de contaminantes em várias superfícies.

Classifica-se como uma técnica de varredura secundária, baseada no modo contato, onde, para o nosso caso, a amostra é movida sob a sonda, realizando uma varredura na direção $x-y$. O *feedback loop* mantém constante a deflexão do *cantilever*, e conseqüentemente, a força aplicada sobre a amostra.

Na modulação de força, a sonda se movimenta com uma pequena oscilação vertical

(modulação z), a qual é significativamente mais rápida que a varredura tradicional (Fig. 2.7) [54]. Isto significa que a força sobre a amostra é modulada de tal forma que a força média na amostra seja igual àquela na modalidade de contato.

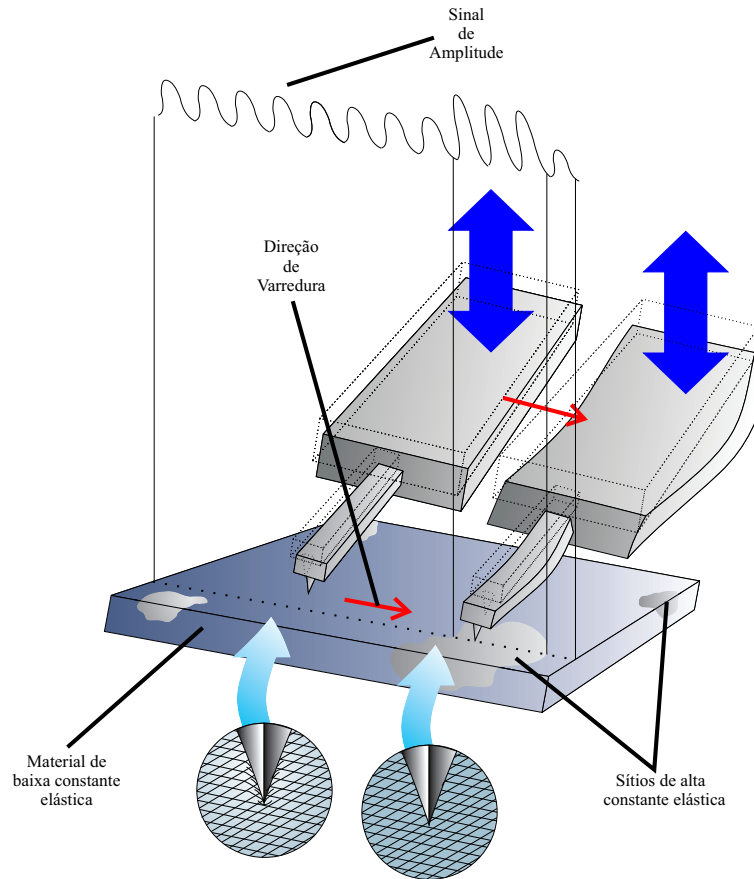


Figura 2.7: Diagrama do princípio de modulação de força mostrando a sonda varrendo um material de baixa constante elástica, da esquerda para direita. O sinal de amplitude aumenta quando a sonda encontra sítios de módulo elástico elevado (materiais duros). Adaptado de [54].

Quando a sonda é modulada com a ponta em contato com a amostra, a superfície da amostra resiste à oscilação e o *cantilever* se curva. Sob uma mesma força, em uma área dura da amostra, o *cantilever* se deforma menos que nas áreas macias, isto é, as regiões de maior rigidez oferecem maior resistência às oscilações verticais, conseqüentemente, produzindo uma maior deflexão.

A variação da amplitude de deflexão sob uma determinada frequência de modulação fornece a medida da rigidez da superfície. Esta técnica obteve algum êxito e

foi extensamente reproduzida, porém, possui alguns inconvenientes que precisam ser observados.

O sinal de modulação de alta frequência pode excitar ressonâncias mecânicas no *scanner* de varredura. Isto pode reduzir significativamente a qualidade das imagens topográficas e de modulação de força. Por esse motivo, foi implementado um atuador piezolétrico adicional que modula a sonda separadamente. Isso reduz, ou até elimina excitações espúrias provenientes da ressonância do *scanner* [54].

Esse atuador trabalha com frequências de 5 a 20 kHz para experimentos de modulação de força [49]. A informação topográfica é coletada simultaneamente com a imagem de modulação de força. Isso é possível por meio de um *tipholder* que possui dois piezos em sua constituição (*tipholder* bimorfo) (Fig. 2.8).

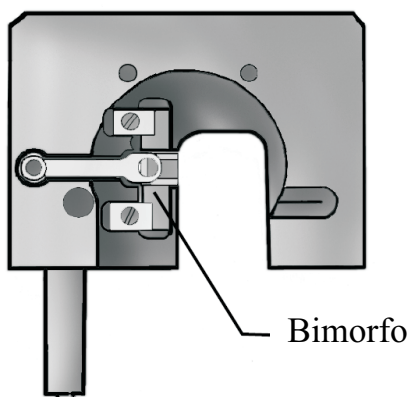


Figura 2.8: *Tipholder* bimorfo de modulação de força para equipamentos MultiMode[®] [54].

O sinal de modulação é gerado por meio de um sintetizador de frequência digital de alta precisão e de um *software*, que permitem ao usuário selecionar a melhor frequência e amplitude de modulação. A amplitude de oscilação do cantilever é detectada com circuitos de alta velocidade que fornecem um nível de ruído menor que 1 Å sobre uma banda de oscilação cuja largura é maior que 1 MHz [49].

2.5 Imagens AFM de Volume de Força.

Devido à grande maioria das superfícies analisadas com AFM não serem homogêneas, é de extrema necessidade se coletar um grande número de curvas de força sobre essas superfícies, a fim de se obter uma análise completa da quantidade de força que atua em cada ponto.

Por exemplo, a utilização de uma sonda eletricamente carregada para investigar uma superfície com sítios carregados, permite localizar e caracterizar esses sítios na superfície. Isso seria extremamente dificultoso utilizando a modalidade *Force Plot*, pois com esse método não conseguimos precisar ou controlar o local na superfície do qual deseja-se obter a curva de força.

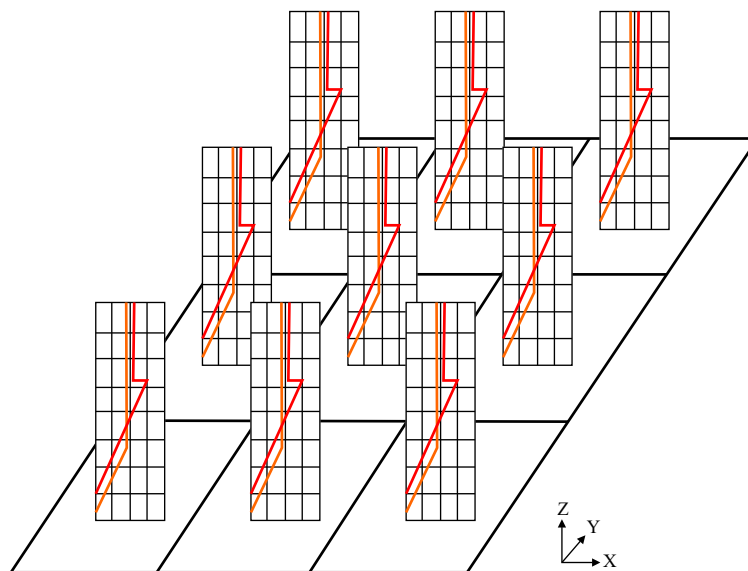


Figura 2.9: Curvas de volume de força. Um conjunto de curvas de força regularmente espaçadas produz uma informação de força tridimensional. Em um conjunto de dados de volume de força, as curvas de força variam com a posição x - y . Adaptado de [55].

Atualmente, coletar um conjunto de curvas de força igualmente distribuídas em um intervalo de varredura é possível por meio da técnica de imagem de Volume de Força (*Force Volume Imaging*) [55].

Uma curva de força simples é obtida pela aproximação e retração da sonda de AFM de um ponto da superfície da amostra. O volume de força contém uma disposição de

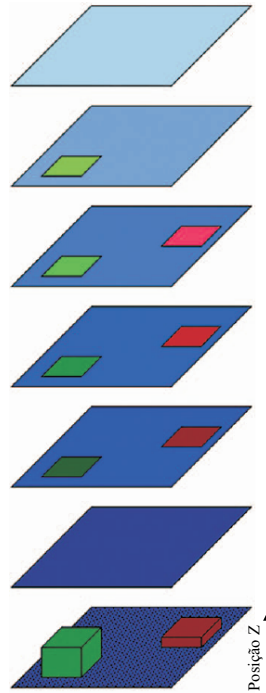


Figura 2.10: Cortes horizontais através dos dados de volume de força mostrando a distribuição dos valores de deflexão em cada posição em z . Na figura acima, as regiões escuras correspondem a grandes deflexões. A fatia superior tem uma distribuição de força baixa e uniforme devido à sonda ainda não estar em contato com a superfície. A fatia inferior tem uma distribuição também uniforme, no entanto, a força é elevada devido o contato máximo da sonda com a superfície [55].

curvas de força sobre uma área inteira da amostra. Cada curva de força é medida em uma determinada posição x - y da amostra, e as curvas de força de um conjunto de pontos x - y são combinadas em uma disposição tridimensional ou "volume" de força (Fig. 2.9). O valor de um ponto (x, y, z) no volume de força corresponde à deflexão (força) do cantilever nessa posição do espaço.

A técnica de volume de força é usualmente obtida em modo contato e pode ser coletada em qualquer ambiente, como ar ou líquido. Quando a sonda estabelece contato com a superfície durante o ciclo da curva de força, o ponto de contato propicia a imagem topográfica da amostra. Este ponto pode ser usado para produzir uma imagem de altura da superfície com baixa resolução lateral, que pode ser extremamente útil quando tentamos desacoplar dados das forças de interação da imagem topográfica. Uma vez

que a sonda não é "arrastada" sobre a amostra para produzir a imagem, as forças laterais, que podem danificar a amostra, tornam-se muito pequenas.

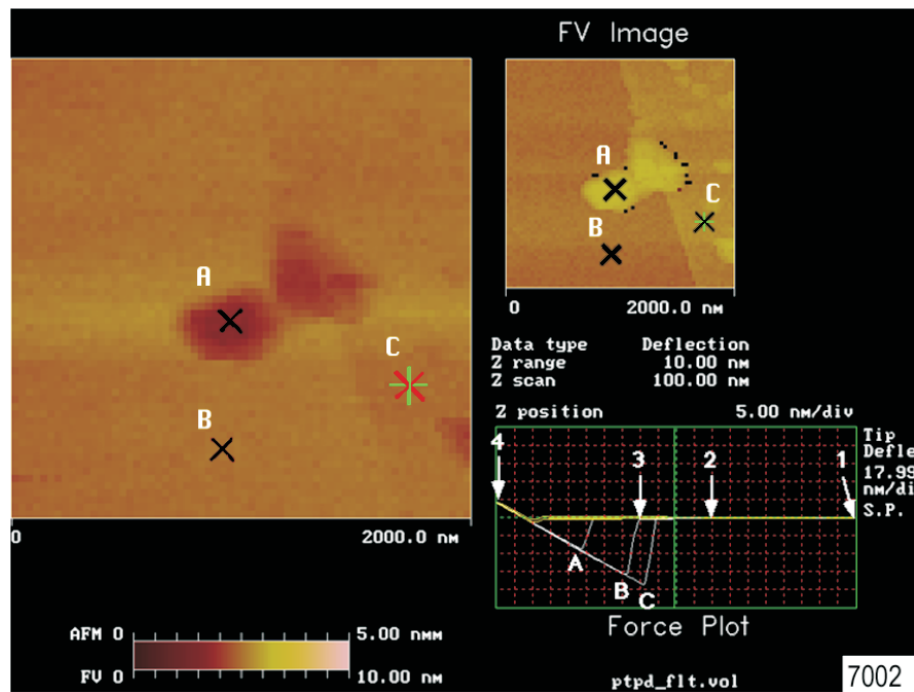


Figura 2.11: Interface de uma medida de volume de força obtida com o software NanoScope. A imagem é de uma interface de vidro-platina [54].

Existem diversos métodos para investigar os dados tridimensionais produzidos pela imagem de volume de força, como por exemplo, um simples *click* em um *pixel* correspondente a uma posição $x-y$ sobre a imagem de volume de força da superfície analisada, mostra a curva de força individual correspondente a esse *pixel*. Cortes horizontais da imagem de volume de força estão disponíveis nessa técnica, mostrando a distribuição dos valores de deflexão em cada posição z do piezo (Fig. 2.10).

A interface gráfica de uma medida de volume de força é mostrada na Fig. 2.11. A janela maior na esquerda mostra a imagem topográfica de altura. Outros modos de imagem como fricção e fase podem ser mostrados nessa interface (Tab. 2.1). A janela retangular no canto inferior direito mostra as curvas de força que são coletadas em tempo real. A janela no canto superior direito mostra a imagem de volume de força. As curvas de força de posições particulares na imagem podem ser obtidas por meio de

um *click* no *pixel* correspondente na imagem de volume de força. Após a coleta dos dados, as imagens e curvas podem ser processadas por meio de um *software*.

Tabela 2.1: Variações das imagens de volume de força. A matriz sumariza cada um dos principais tipos de obtenção de imagens de volume de força com AFM. Adaptada de [54].

TABELA 2.1		
Tipo de Sinal	Modo contato	Modo <i>tapping</i>
Amplitude		X
Deflexão	X	X
Fricção	X	
Fase Frequência		X
Potencial		X
		X

A maioria das imagens de volume de força são realizadas com sondas de AFM convencionais, contudo, sondas modificadas por tratamentos químicos ou por anexação de partículas e moléculas permitem que uma grande quantidade de interações em nanoescala sejam investigadas, gerando mapas eletrostáticos [56], de adesão [57], e de elasticidade [58].

A adesão entre a sonda e amostra pode ocorrer por inúmeras razões. Sob condições ambiente de varredura, a presença de efeito de capilaridade entre a sonda e a camada de umidade ou contaminação da amostra é predominante na origem de adesão. Mapas de adesão podem ser utilizados para estudar a distribuição de regiões hidrofílicas ou hidrofóbicas em uma superfície a qual pode diferir na quantidade de hidratação, e conseqüentemente, adesão (Fig. 2.12) [57].

As curvas de volume de força também são utilizadas para investigar as propriedades elásticas dos materiais através da medida da força requerida para indentar ou deformar a superfície estudada. O volume de força pode, conseqüentemente, produzir mapas de microelasticidade que mostram a variação local da rigidez da amostra (Fig. 2.13).

Diferentes processos de fabricação e tratamentos de materiais podem resultar em

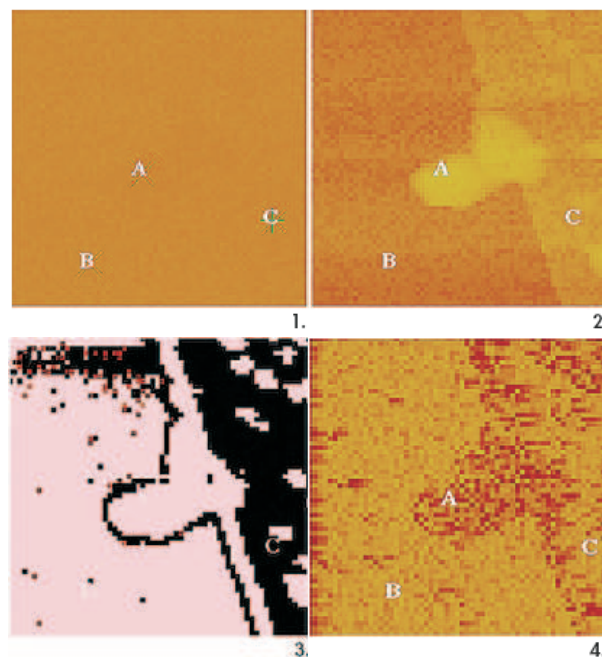


Figura 2.12: Cortes horizontais retirados dos dados de volume de força da Fig. 2.14. Cada imagem possui tamanho de 2 μ m, e foram retirados das regiões 1, 2, 3 e 4 mostradas na Fig. 2.14. A distribuição das forças de adesão são mostradas a partir dos dados extraídos da curva de retração do volume de força [54].

inomogeneidades de suas superfícies, produzindo diversos valores de módulo elástico sobre ela. Os mapas de elasticidade podem auxiliar na identificação desses defeitos. Similarmente, medidas de elasticidade em células biológicas podem mostrar mudanças na rigidez dessas células ocasionadas por diversos fatores, podendo localizar por exemplo, reorganizações em citoesqueletos e os diversos componentes celulares [58].

Interações eletrostáticas entre duas superfícies em líquido podem ser investigadas com o auxílio de excelentes modelos teóricos. Esses modelos predizem a força que atua quando uma partícula carregada se aproxima de uma superfície também carregada. As curvas de força de uma sonda carregada interagindo com uma superfície carregada podem ser ajustadas a esses modelos, fornecendo informações a respeito das propriedades eletrostáticas da superfície (Fig. 2.14). O conhecimento da densidade de carga de uma superfície pode, por exemplo, fornecer dados sobre o comportamento de adsorção de interfaces heterogêneas, bem como auxiliar na caracterização de domínios em membranas e estruturas biológicas [56].

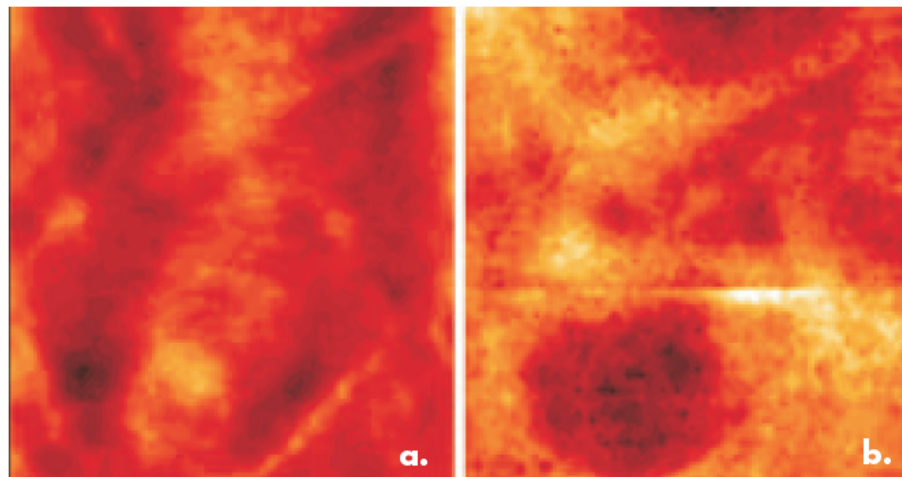


Figura 2.13: (a) Imagem de altura de células MDCK sobre vidro, obtidas por meio de volume de força. (b) Mapa de elasticidade da célula MDCK construído com dados do volume de força. Os pixels mais claros mostram regiões de maior rigidez na célula. A imagem possui 30 μ m de tamanho [54].

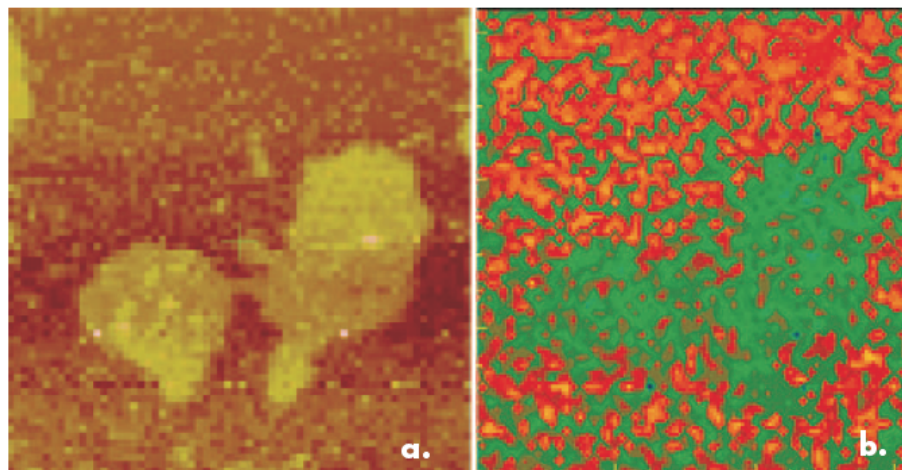


Figura 2.14: (a) Imagem de altura em líquido da membrana de uma bactéria adsorvida em mica, realizada por meio de volume de força. (b) Mapa da densidade de carga relativa da superfície obtido com o ajuste das curvas de volume de força por meio de um modelo baseado na teoria de Gouy-Chapman de uma esfera de aproximando de um plano. A imagem possui 3 μ m de tamanho [54].

3

Aplicação e interpretação das curvas de força obtidas com AFM

As curvas de força obtidas com as medidas AFM carregam inúmeras informações a respeito das propriedades físicas das amostras analisadas. Para extrair e interpretar essas informações, é necessário o emprego de um modelo teórico adequado. A obtenção dos valores de elasticidade das plaquetas humanas, tornou-se possível com o desenvolvimento de um algoritmo baseado no modelo de Hertz. Neste capítulo, explicaremos com mais detalhes a anatomia de uma curva de força, a informação que cada porção dela fornece, suas aplicações e como a partir da teoria Hertziana podemos calcular o módulo elástico de células.

3.1 Curvas de força aplicadas à Biofísica.

O interesse da comunidade biofísica na potencialidade do AFM não se limita somente na obtenção de imagens em alta resolução, mas também engloba a possibilidade de estudar forças intra e intermoleculares. A ferramenta operacional escolhida para esta investigação é a curva da força [59].

Na Fig. 3.1, uma típica curva de força é mostrada. Pode ser dividida em diversas regiões. A partir da direita (região I), a sonda AFM está longe da amostra e nenhuma interação é detectada. Movendo-se para o lado esquerdo do gráfico (curva pontilhada), a sonda está aproximando-se da amostra e nenhuma interação é detectada até que o *cantilever* se flexione devido às forças de van der Waals (região II). São por meio dessas forças que a sonda fica em contato com a amostra.

O "pulo ao contato" é o ponto que corresponde à posição onde o gradiente de força de interação excede a constante de mola do *cantilever*. Em cada posição na curva de força o *cantilever* é deflexionado até que a força restauradora se iguale à força de interação com a amostra, fazendo com que o sistema esteja sempre em equilíbrio. Após o contato, aproximando a sonda cada vez mais em direção à superfície, uma deflexão positiva do *cantilever* ocorre (região III) devido às forças repulsivas. Esta é a região de contato da curva de força, em que as propriedades elásticas da amostra podem ser medidas.

Geralmente, o *cantilever* é movido em direção à amostra até que um pré-ajuste do ponto inicial de força seja alcançado. Depois que isto acontece, o sentido do movimento é invertido e o *cantilever* começa a se movimentar para longe da amostra (curva contínua). Inicialmente, o comportamento do *cantilever* durante o recuo é igual ao descrito para a aproximação, mas, devido à adesão entre a ponta e a amostra, o *cantilever* começa a se deflexionar negativamente (região IV) até que a força de adesão é superada pela força restauradora e o contato é quebrado.

A histerese das curvas medidas no ar é, em maior parte, devido às forças de capilaridade, oriundas da camada de contaminação que fica sobre a amostra. Diante disso, parece claro que uma alta adesão limita a escala de informação que pode ser obtida de

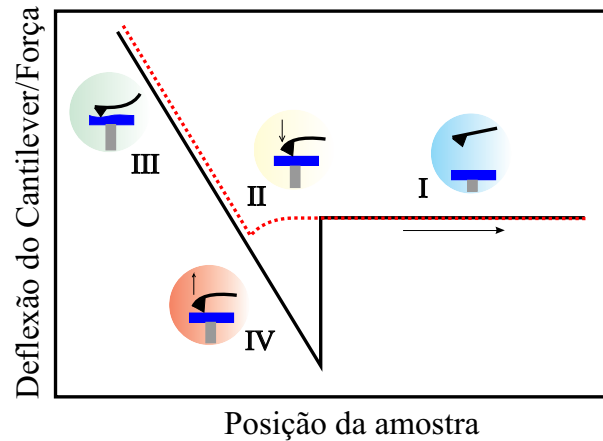


Figura 3.1: Esquema de uma curva de força com as diferentes regiões das porções destacadas de aproximação e retração.

uma curva de força, especialmente na região de grande interesse localizada na pequena separação entre a sonda e a amostra. Entretanto, as forças de capilaridade podem ser reduzidas extremamente se executadas as medidas em líquido, com a vantagem de preservar, ao mesmo tempo, o ambiente fisiológico de amostras biológicas [60].

Em um ciclo de uma curva de força, a deflexão do *cantilever* é medida, podendo ser convertida em quantidades de força usando-se a lei de Hooke:

$$F = k_c \cdot d, \quad (3.1)$$

onde F é a força, k_c é a constante da mola do *cantilever* e d é a deflexão. Diferentes métodos de medida da constante de mola de um *cantilever* têm sido independentemente desenvolvidos.

Essencialmente, os métodos podem ser divididos em quatro categorias:

- 1) baseados em fatores geométricos do *cantilever* [61];
- 2) abalizados na medida de uma deflexão estática, aplicando-se uma força conhecida ao *cantilever* [62];
- 3) fundamentados em medidas das propriedades dinâmicas com massas diferentes no *cantilever* (método da adição de massa) [63];
- 4) baseados em ruídos térmicos dos *cantilevers*.

Este último é o mais usado e nele o *cantilever* é tratado como um oscilador harmônico simples excitado pelo ruído térmico [64]. Entretanto, a melhor exatidão na medida da constante da mola é em torno de 15 a 20 %. Utilizando-se um *cantilever* com uma baixa constante de mola, que pode alcançar valores em torno de 10 mN/m, uma definição de 10 pN pode ser obtida na medida das forças de interação.

3.2 Interações obtidas através das curvas de força.

As curvas de força podem ser ricas em informações do ponto de vista biofísico [64]. Uma classificação útil dos dados que podem ser extraídos das curvas de força considera separadamente as informações derivadas da curva de aproximação e retração.

3.2.1 A curva de aproximação.

A informação da elasticidade em uma amostra biológica pode ser obtida explorando-se a porção de aproximação da curva de força. Tendo os valores aproximados das constantes elásticas do *cantilever* e da amostra analisada, e uma vez estando a sonda em contato com essa amostra, um acréscimo de força submete esta a uma indentação, tendo por resultado uma menor deflexão do *cantilever* para o mesmo movimento em z do piezo com respeito a uma amostra não deformável (Fig. 3.2).

Medindo a indentação em uma dada força, a elasticidade local da amostra em termos do módulo de Young pode ser extraída, supondo-se um modelo para o contato mecânico entre a sonda e a referida amostra [65]. Um modelo simples e bastante utilizado é o modelo de Hertz, a ser mais bem elucidado na próxima seção [66].

Em geral, o eixo ao longo do qual a força é aplicada pela sonda de AFM não é perpendicular à superfície da amostra; forças laterais podem atuar e, geralmente, as amostras observadas não são isotrópicas. Quando a amostra estudada é uma célula, nas regiões muito finas, como nas bordas, os modelos matemáticos são falhos, pois a

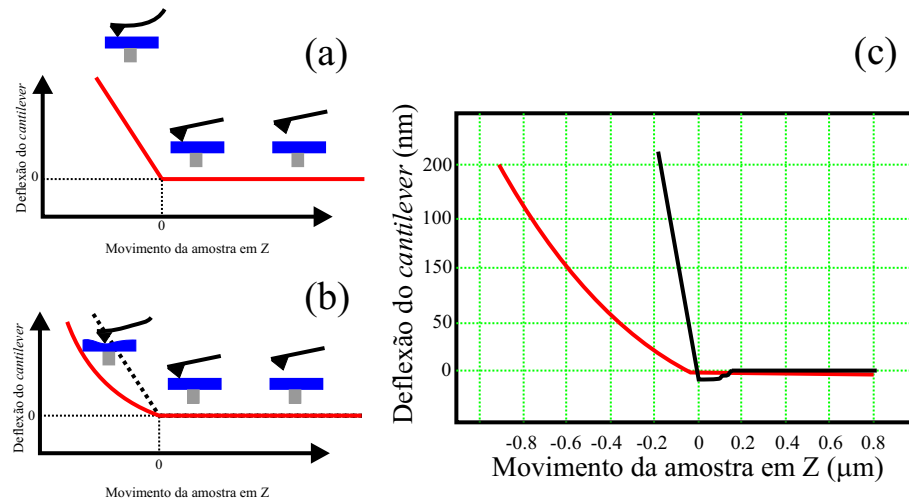


Figura 3.2: Medida de indentação pela análise da curva de força. (a) Curva da força em uma amostra rígida; (b) curva da força em uma amostra macia. Neste caso a amostra é indentada e para a mesma deflexão do *cantilever* o movimento em z do piezo é mais elevado do que para o caso de uma amostra rígida. (c) A comparação entre duas curvas da força realizadas em uma célula viva (curva vermelha) e no vidro (curva preta). As duas curvas foram alinhadas a fim ter o mesmo ponto de contato.

sonda pode "sentir" o substrato duro ou regiões com fibras que representam áreas muito heterogêneas.

Mesmo se a obtenção de dados quantitativos for particularmente difícil, devido ao excesso de critério na escolha do modelo adequado para analisar a interação sonda-amostra e à heterogeneidade das amostras biológicas, informações úteis, tais como as variações espaciais e temporais das propriedades mecânicas, podem ser obtidas. Além disso, mapas da elasticidade local podem ser construídos pelo mapeamento das forças e por mudanças espaciais e temporais da elasticidade em consequência de tratamentos químicos, o que é possível de se sopesar em tempo real.

Não somente a rigidez de amostras biológicas pode ser medida, mas também a sua viscoelasticidade [67]. Nesse caso, a amostra sob investigação pode rapidamente ser indentada e sua lenta recuperação em um determinado período de tempo é medida [58].

O uso de curvas de força *versus* tempo, preterindo-se as de força *versus* deslocamento, tornou possível distinguir as contribuições elásticas das viscoelásticas da deflexão *cantilever*. Valendo-se de uma taxa baixa de força no momento da obtenção das

curvas, o comportamento elástico se torna predominante, visto que, em altas taxas, as propriedades viscoelásticas são mais significativas [58]. Um grande número de amostras biológicas foi caracterizado do ponto de vista mecânico por meio de AFM. Variam de proteínas [68] e cromossomos [69] às células [70].

Como já esboçado, atrelando-se alta precisão nas medidas de força com a elevada definição lateral de posicionamento da sonda de AFM, mostra-se possível mapear as interações sonda-amostra em uma superfície. O mapeamento pode ser realizado explorando-se as curvas de aproximação e retração, atendo-se às aplicações que usam a curva de aproximação. A aplicação mais importante é o mapeamento bidimensional das propriedades elásticas de células vivas [71]. Regiões diferentes de uma célula apresentam geralmente diferentes comportamentos elásticos que podem ser mapeados com uma resolução lateral abaixo de 100nm.

O valor baixo para definição lateral em células vivas, comparado aos potenciais de alta resolução do microscópio de força atômica, é uma consequência dos baixos módulos elásticos dessas células. A baixa rigidez das células conduz a uma indentação elevada da sonda na sua membrana e a uma grande área de contato que limita o alcance de uma boa definição.

Explorando-se as informações obtidas com a curva de força, uma imagem de altura das células sob força nula pode ser reconstruída. Infelizmente, determinar o ponto de contato da sonda com a superfície da amostra na curva de força é extremamente complicado, em se tratando de amostras macias, pois não há aumento pronunciado na deflexão do *cantilever*. Para superar esse problema, as equações que descrevem a relação entre a altura da amostra, deflexão do *cantilever* e os outros parâmetros da amostra podem ser exploradas a fim de obter um outro conjunto de equações, desta vez utilizadas para calcular o módulo elástico e a altura que a sonda toca a amostra (ponto de contato). Com os devidos ajustes em cada curva de força por meio de um modelo que calcula o ponto de contato entre a sonda e a amostra, este pode ser extraído e usado para reconstruir uma imagem com força zero [56].

O efeito de uma droga no citoesqueleto de fibroblastos foi avaliado por meio desse

método. A desagregação da rede de actina do citoesqueleto pelo efeito da droga conduziu a uma redução da rigidez da célula, mostrando que a rede de actina desempenha um papel crucial na manutenção das propriedades mecânicas das células [56]. A Fig. 3.3 ilustra uma seqüência cronometrada de mapas de elasticidade, junto a imagens topográficas (as imagens de altura e de deflexão para destacar a presença das fibras de *stress*) que mostram o efeito da droga na célula.

Os mapas da elasticidade são mostrados em escala de cinza com as áreas mais escuras correspondentes às regiões com o módulo elástico mais baixo. Observamos claramente que 60 minutos após a administração da droga, a rigidez média da célula é extremamente reduzida.

3.2.2 A curva de retração.

A porção retrativa de uma curva de força pode dar acesso a uma larga escala de interações intermoleculares, como, por exemplo, o reconhecimento de eventos de adesão entre pares biológicos e as interações intramoleculares ao nível de uma única molécula, tais como propriedades mecânicas de DNA e desdobramentos de proteínas.

Como descrito anteriormente, a curva de retração pode fornecer informações com relação à força de adesão entre a sonda e a amostra e mapas de adesão da superfície podem ser obtidos por meio de uma aproximação chamada microscopia de força química [72]. Se na superfície da amostra houver receptores e a sonda estiver funcionalizada com o respectivo ligante, a fim de expor um par apropriado com interação específica fora da superfície, a atração entre o par receptor-ligante pode ser medida explorando o valor da força de ruptura no segmento de retração da curva.

Quando a sonda e a superfície estabelecem contato, os pares moleculares interagem. Sob a retração do *cantilever*, as ligações anteriormente formadas são quebradas e a força de ruptura é medida. Em todos esses experimentos, é imprescindível que a força de ligação intermolecular estabelecida entre os pares seja mais fraca do que aquelas usadas para anexar as moléculas à superfície.

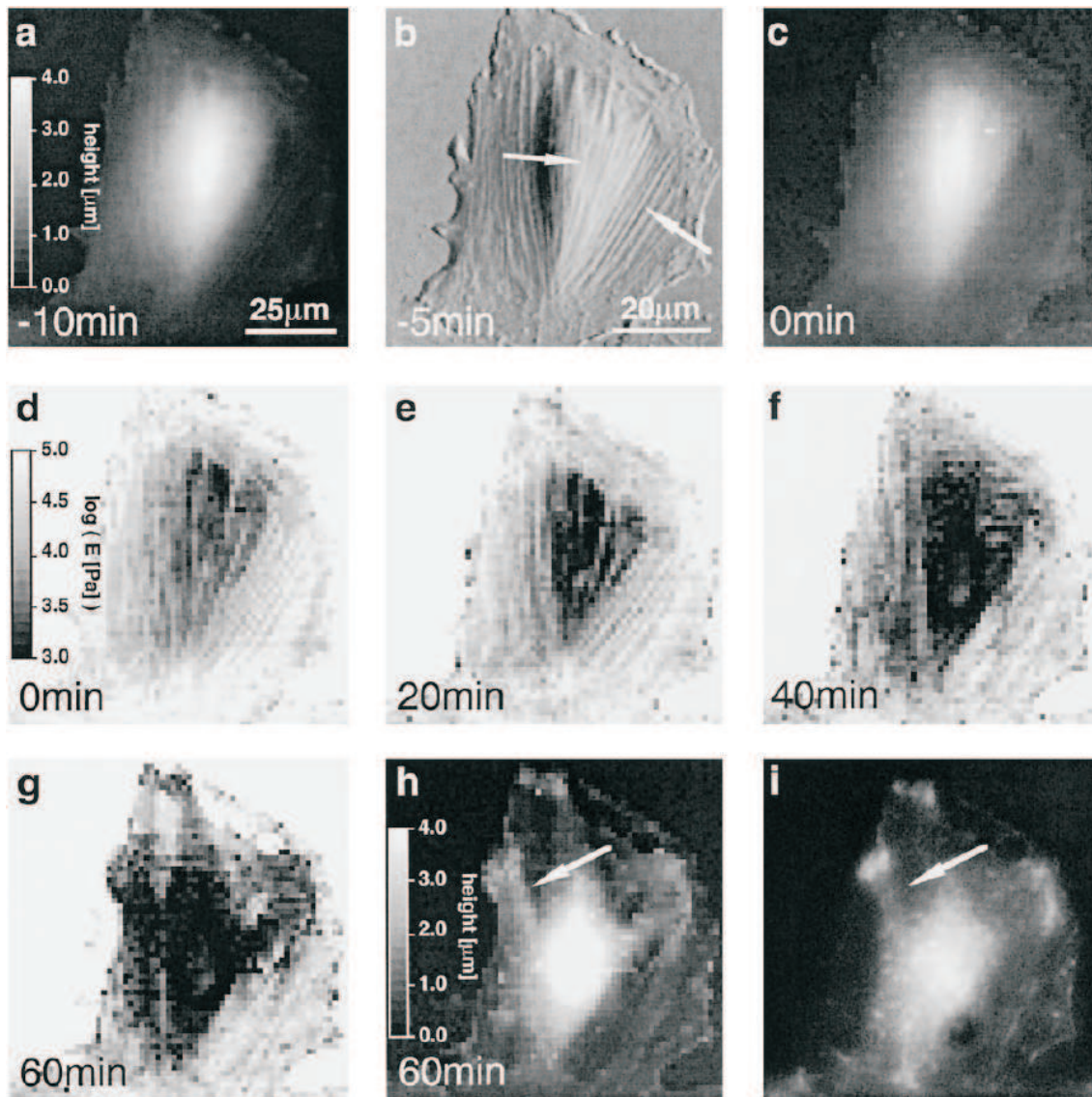


Figura 3.3: Série cronometrada de mapas de elasticidade de um fibroblasto de NRK que mostra a desagregação da rede de actina, com imagens de AFM e microscopia de fluorescência. (a) Imagem de AFM em modo contato. (b) Imagem de deflexão (AFM); as fibras de stress são descritas pelas setas. (c) Reconstrução da imagem de altura com força nula. (d) Mapa de elasticidade. (e), (f) decréscimo gradual do módulo de Young em um intervalo de 40 minutos. (g) Mapa de elasticidade e (h) imagem da altura com força nula obtida após 60 minutos mostrando uma forte segmentação do citosol. (i) Imagens correspondentes de fluorescência para identificar estruturas em (g) e (h) como redes de actina. A seta em (h) aponta a uma região muito plana (500 nanômetro) que mostra uma região desprovida de fibras [56].

Com essa finalidade, técnicas específicas têm sido desenvolvidas para imobilizar biomoléculas em superfícies pela bioconjugação química que resguarda suas potencialidades de reconhecimento [73]. Em um experimento bastante elaborado, Grandbois *et al* mediram a força de uma única ligação covalente [74].

A análise estatística dos dados é de grande importância para a obtenção de informações sobre a interação entre moléculas. Em regra, a distribuição do número de eventos de ruptura é obtida em função da força de ruptura. Demais disso, quando uma curva de retração apresenta diversos eventos de ruptura, o último representa muito provavelmente uma única ruptura de ligações. Para se evitar o estabelecimento de demasiadas ligações entre as moléculas da sonda e da superfície, a densidade de moléculas sobre ambas deve ser minimizada.

Com este objetivo, o uso de sondas de nanotubos de carbono (Fig. 3.4) biologicamente funcionalizados permitirá um avanço notável desta técnica, reservando somente a anexação de poucas moléculas e, possivelmente, apenas de uma única na extremidade da sonda [75].

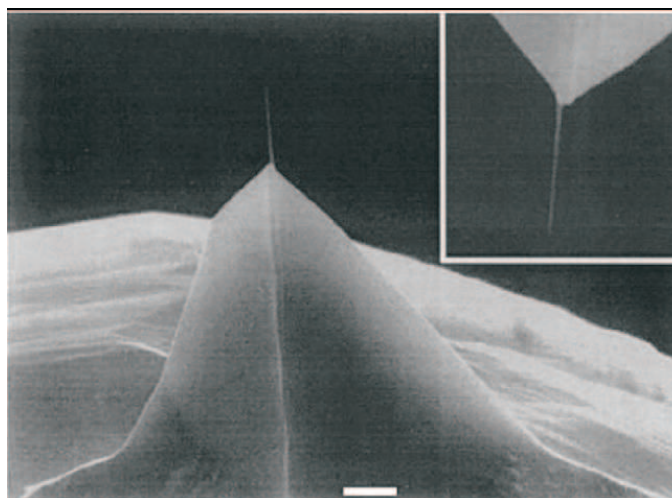


Figura 3.4: Nanotubo de carbono anexado ao fim de uma sonda de silício. O quadro superior é um aumento da imagem, girada de 180 graus (barra = 1 $\mu m/s$) [76].

Diversos pares de receptores-ligantes foram estudados por meio desse método, incluindo biotina/estreptavidina [77], anticorpo-antígeno [78], interação entre as fitas

complementares de DNA e interações entre a proteína da membrana de células e seus pares específicos anexados à sonda de AFM [79] (Fig. 3.5).

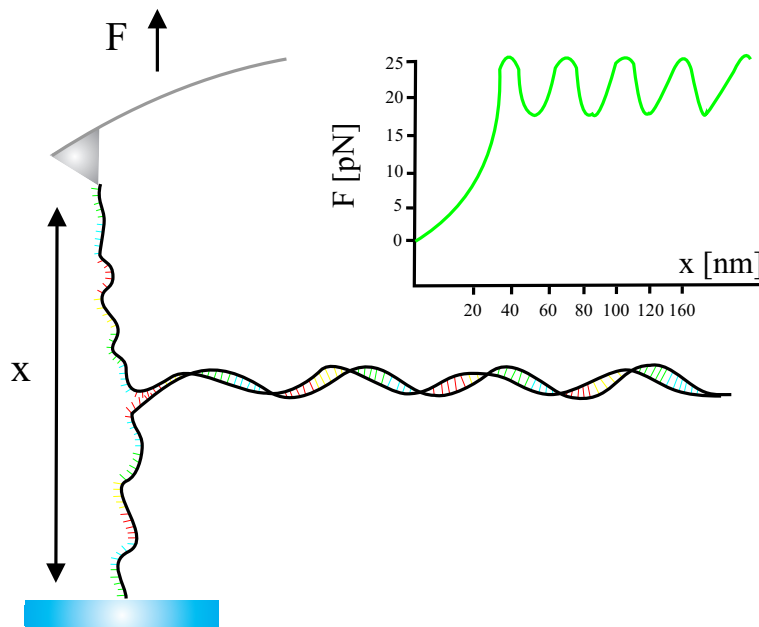


Figura 3.5: Os oligonucleotídeos complementares do DNA são quimicamente unido a sonda do AFM e a uma superfície de vidro. Quando a sonda é trazida ao contato com a superfície, as fitas duplas de DNA são formadas, podendo ser subsequentemente desfeitas pela retração da sonda. Adaptado de [80]

Ainda se analisando a parte retrativa da curva de força, a habilidade do AFM de detectar interações biológicas específicas e eventos de identificação de pares pode ser emparelhada com as potencialidades de imagem para mapear, ao mesmo tempo, a distribuição lateral de sítios de ligação bem como as características dessa ligação, obtendo-se desta forma, um modo de imagem bastante conhecido, qual seja, o "modo de adesão" ou de afinidade [81]. Em aplicações particulares, também as forças que resultam desses eventos específicos podem ser empregadas como um parâmetro de contraste [82].

O AFM pode ser muito vantajoso no estudo de interações intramoleculares, que, em geral, são mais fracas que as associadas com as quebras de ligações. Propriedades mecânicas e informações a respeito da conformação de moléculas podem ser extraídas por meio de ligações moleculares entre a sonda e a amostra [83]. As teorias mostram que

a termodinâmica de polímeros pode ajustar dados experimentais e extrair informações a respeito da elasticidade de moléculas [84] (Fig. 3.6). Os parâmetros obtidos do ajuste podem ser aproveitados para estabelecer se uma única ou mais de uma molécula foi esticada. A elasticidade do polímero é evidenciada quando este é esticado entre a sonda e a amostra e as forças restauradoras aparecem [85]. A estrutura modular de proteínas parece ser uma estratégia geral para resistir à tensão mecânica, não somente em fibras naturais mais também no citoesqueleto [86].

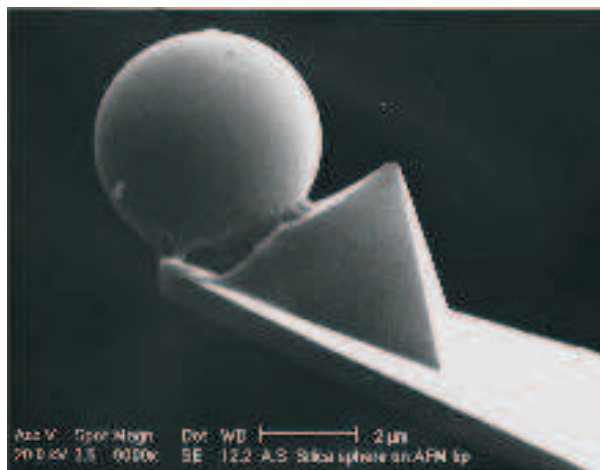


Figura 3.6: Sonda funcionalizada com polímero [87].

Uma das proteínas mais abundantes no citoesqueleto é a espectrina. Nos eritrócitos, moléculas de espectrina são parte de uma rede bidimensional que proporciona à célula vermelha características elásticas especiais [21]. Muitos experimentos têm demonstrado que o estiramento de certas proteínas quando submetidas a uma tensão pode ser atribuído ao desdobramento de alguns domínios individuais dessa proteína [88].

Proteínas dobradas podem ser esticadas em mais de 10 vezes o seu comprimento. As curvas de força mostram um padrão diferenciado, onde cada pico é atribuído à interação com cada proteína individualmente (Fig. 3.7) [89].

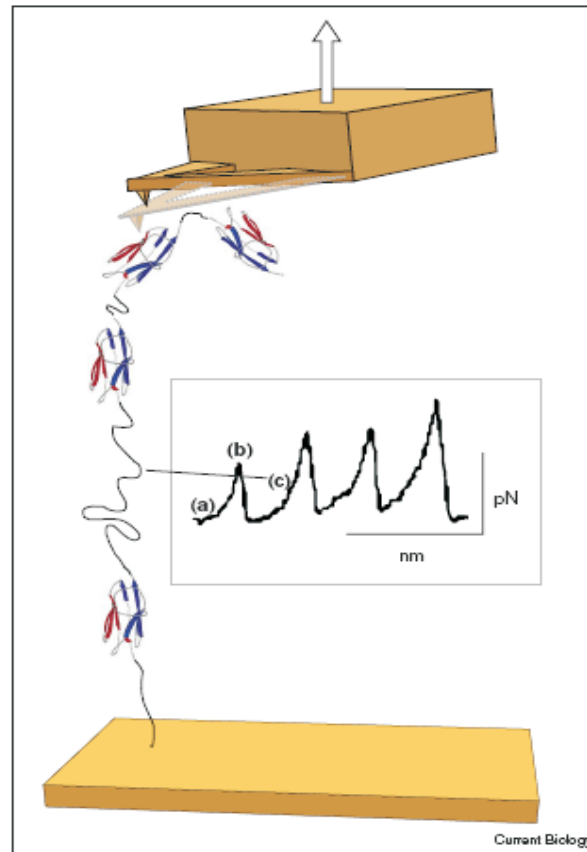


Figura 3.7: Poliproteína presa entre uma sonda de AFM e um substrato sólido. Enquanto a extremidade é movida para cima, as forças requeridas para puxar e separar a estrutura da proteína faz o *cantilever* se deflexionar possibilitando assim com que elas sejam armazenadas. Uma típica curva da força-extensão é mostrada. No ponto (a), a sonda se retrai e um domínio da proteína é prolongado. Em (b), uma força crítica é alcançada onde o domínio mecanicamente menos estável se rompe. A tensão é quebrada pelo prolongamento máximo do domínio desdobrado e o *cantilever* retorna a sua posição de descanso. Em (c), porque as extremidades da proteína são movidas cada vez mais distantes, o domínio desdobrado é prolongado e o acréscimo da força aplicada faz com que um segundo domínio seja desdobrado [89].

3.3 Modelo para análise das medidas de indentação.

Como já visto, através das curvas de força obtidas por meio das medidas AFM, podemos extrair grandezas físicas tais como elasticidade, adesão e viscosidade. Porém, essas curvas de força não podem ser comparadas com nenhum gráfico de potencial de mesma natureza, já que nelas estão presentes alguns fatores vinculados ao próprio equipamento, como por exemplo, a deflexão do cantilever devido às forças intermoleculares entre a sonda e as moléculas da superfície indentada, bem como características ligadas ao tipo de rigidez da amostra (que pode ser pouco ou muito indentável).

Tipicamente, as curvas de força são analisadas em um dado intervalo da força aplicada à amostra. Para isso, os valores de deflexão devem ser primeiramente convertidos em valores de força. Sabendo que os *cantilevers* são considerados molas lineares para pequenas deflexões, a lei de Hooke pode ser aplicada [Eq. (3.1)] [21].

Experimentalmente, a deflexão não é necessariamente nula quando o *cantilever* está livre, ou seja, quando ele está fora de contato com a amostra. Isso pode ocorrer devido a vibrações ou estresses no *cantilever*, que se deformará mesmo sem a atuação de forças externas.

Para tanto, um ajuste dos valores de deflexão quando o *cantilever* esta fora da amostra é realizado e subtraído dos valores totais de deflexão. Esse ajuste pode ser facilmente obtido pelo cálculo da média da deflexão do cantilever livre da amostra. Em princípio, deveríamos encontrar um único valor de deflexão para essa região, porém, devido ao ruído, o ajuste é melhor realizado tomando uma média. Então, a Eq. (3.1) fica:

$$F = k_c \cdot (d - d_0). \quad (3.2)$$

Em curvas de força para amostras muito rígidas se comparadas com a constante de mola do *cantilever*, a deflexão d do *cantilever* será igual a altura z da amostra,

$$z = d. \quad (3.3)$$

Para o caso de amostras macias que são deformadas pelo *cantilever*, a indentação δ é dada pela diferença entre a altura z da base da amostra e a deflexão d do *cantilever*,

$$\delta = z - d. \quad (3.4)$$

Novamente, ajustes devem ser considerados, deixando a Eq. (3.4) na forma:

$$\delta = (z - z_0) - (d - d_0) = z - z_0 - d + d_0, \quad (3.5)$$

onde d_0 é o ajuste da deflexão e z_0 é a posição onde a sonda tocou a amostra.

Para quantificar as propriedades elásticas de uma amostra, um intervalo de dados da curva de força é analisado e um modelo apropriado para a análise deve ser escolhido.

O modelo que utilizamos é bastante simples, baseado no trabalho de Heinrich Hertz [66], o qual foi ampliado por Sneddon [90]. O modelo de Hertz descreve a resposta elástica de uma amostra infinitamente macia quando comparada com o indentador, que nos casos das sondas AFM possuem formato cônico ou parabólico. As Eqs. (3.6) e (3.7) descrevem a força aplicada por esse indentador de acordo com a sua geometria:

$$F_{cone} = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^2 \tan(\alpha), \quad (3.6)$$

$$F_{parabola} = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^{\frac{3}{2}} \sqrt{R}, \quad (3.7)$$

onde F_{cone} é a força necessária para deformar uma amostra elástica com um indentador cônico, enquanto $F_{parabola}$ é a força necessária para deformar uma amostra elástica com um indentador parabólico. Para pequenas deformações, um indentador esférico pode ser aproximado ao parabólico.

Na Eq. (3.6), a indentação é denotada por δ , enquanto E é a resposta elástica, ou módulo de Young, ν é o raio de Poisson, α é o ângulo de abertura do cone, e R é o raio de curvatura da parábola ou, para o caso da aproximação esférica R será o raio dessa esfera. Quando calculamos a elasticidade em células, consideramos a amostra virtualmente incompressível e o valor do raio de Poisson utilizado é 0.5 [91]. Para o

nosso caso, em que a sonda utilizada possui geometria cônica, combinando as Eqs. (3.5) e (3.6), obtemos:

$$z - z_0 = (d - d_0) + \sqrt{\frac{k_c \cdot (d - d_0)(1 - \nu^2)}{(\frac{2}{\pi} \cdot E \tan(\alpha))}}, \quad (3.8)$$

que é a forma matemática mais conveniente para se utilizar no modelo.

A maioria das quantidades na equação acima é conhecida ou podem ser obtidas experimentalmente. A constante de mola k_c e o ângulo de abertura α são fornecidos pelo fabricante das sondas ou podem ser determinados no experimento [92]. A deflexão d e a altura z são as quantidades extraídas das curvas de força obtidas com o AFM. O valor de d_0 é obtido pela média dos valores de d fora da amostra (geralmente os primeiros 100 nm), como já explicado. O módulo de Young E , caracterizado por tensão versus deformação, ou seja, parâmetro mecânico que proporciona uma medida da rigidez de um material, é a quantidade de interesse nesse modelo. Esse coeficiente de elasticidade pode variar em torno de 100 GPa para materiais muito duros, 100 MPa para polímeros, e 1 MPa para materiais macios, tal como gel. Os valores típicos para células variam entre 1-100 kPa.

Tabela 3.1: Propriedades elásticas de diversos materiais. Adaptada de [57].

TABELA 3.1	
Material	Módulo de Young
Aço	200 GPa
Vidro	70 GPa
Osso	10 GPa
Colágeno	1 GPa
Proteínas Cristalizadas	0.2 – 1 GPa
Borracha	1.4 MPa
Células Vivas	1 – 100 kPa

A Tabela 3.1 mostra valores de módulo de Young de materiais biológicos e outros materiais [57].

O procedimento para a obtenção do ponto de contato z_0 é um pouco mais elaborado. Em uma amostra rígida, o ponto de contato separa dois regimes lineares com diferentes inclinações na curva de força (Fig. 3.8(a), linha contínua).

A partir desse comportamento, o ponto de contato pode ser obtido facilmente pelo ajuste linear de cada um dos regimes ou calculando a curvatura, somente observando o ponto de descontinuidade da curva.

Porém, nas amostras macias, a deflexão aumenta discretamente a partir do ponto de contato não existindo uma mudança visível entre os dois regimes, a curva ocorre de forma contínua (Fig. 3.8(a), linha pontilhada).

Contudo, uma segunda derivada poderia mostrar uma descontinuidade e conseqüentemente, o ponto de contato para amostras macias, porém, em curvas com muito ruído, essa descontinuidade passaria despercebida.

Outra forma simples, porém bastante eficaz de se obter o valor do modulo elástico é obtido pelo ajuste da Eq. (3.8) tomando somente um intervalo de deflexão na curva de força, que corresponderia a região de indentação [56].

Além disso, tomando E como um parâmetro de ajuste, o ponto de contato z_0 também pode ser tomado como parâmetro. De fato, isso produz ótimos valores para z_0 , tornando esse método o mais eficaz para a obtenção do ponto de contato na curva de força. A Fig. 3.9 ilustra esse método com mais detalhes.

Um intervalo de análise é escolhido definindo valores máximos e mínimos de deflexão (d_1 e d_2), que correspondem a um intervalo de forças F_1 e F_2 , dados por $F_1 = k_c \cdot d_1$ e $F_2 = k_c \cdot d_2$. Isto também define um intervalo de análise em termos da altura z , dados por z_1 e z_2 . Pelo emprego de um *fit* de Monte Carlo, valores otimizados de E e z_0 , que ajustam melhor os dados, são obtidos. Contudo, o valor de z_0 na maioria das vezes é encontrado fora do intervalo de análise.

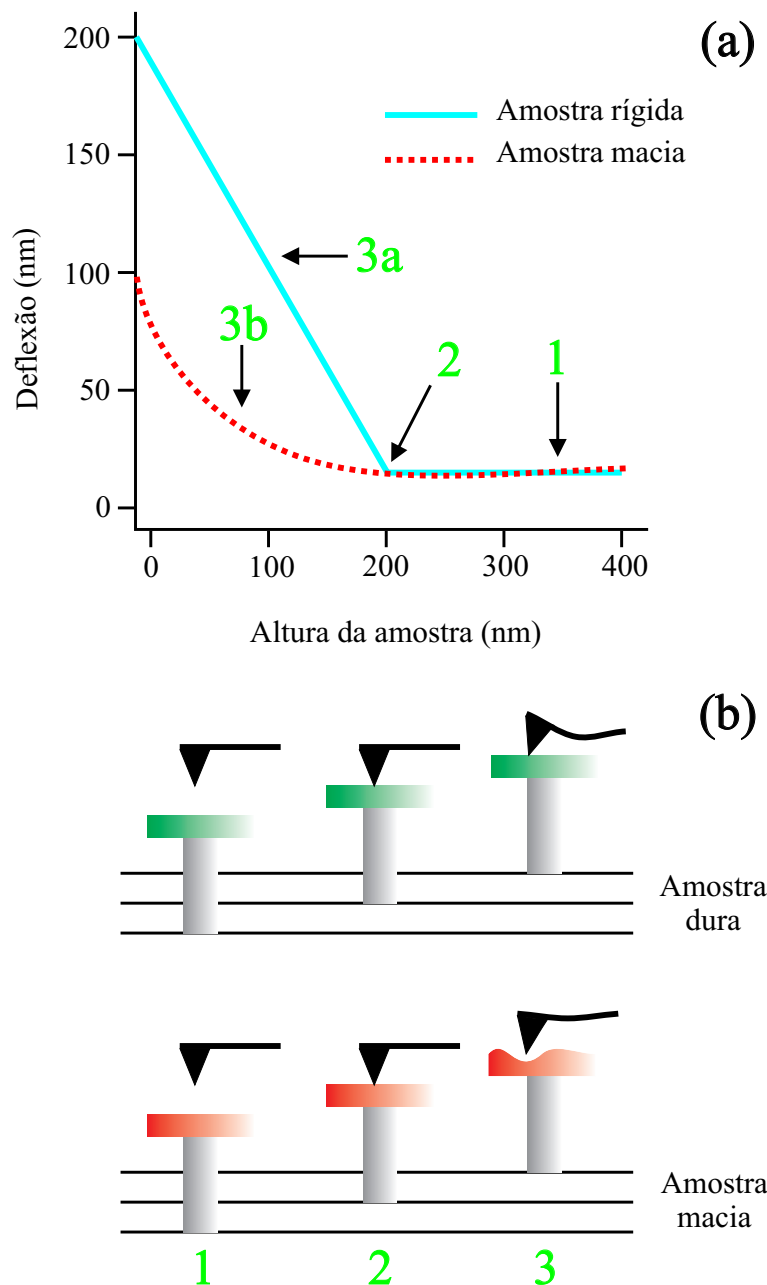


Figura 3.8: Diferenças nas curvas de força de amostras rígidas e macias. Na curva de força em (a), a deflexão do cantilever é traçada em função da altura da amostra. Em amostras duras, as curvas de forças possuem dois regimes lineares distintos. O primeiro a sonda ainda não está em contato com a amostra e a deflexão é constante (visível entre os pontos 1 e 2 na figura (a) e na posição 1 da figura (b)). No segundo a sonda toca a amostra e a deflexão é proporcional a sua altura (entre os pontos 2 e 3a). em amostras macias, contudo, devido a deformação de sua superfície, a deflexão será suave, não evidenciando os dois regimes (região da curva entre os pontos 2 e 3b em (a) e posições 2 e 3 em (b)). A resposta elástica da amostra levará a uma relação não linear entre a deflexão e a altura. A diferença entre as curvas na figura (a) corresponde a indentação da amostra.

Existem duas principais vantagens nesse processo:

1) Devido o ponto de contato ser obtido pelo ajuste de um intervalo de dados, as possíveis contribuições negativas do ruído serão eliminadas;

2) Também, o fato de o intervalo de análise estar na região em que a sonda faz contato com a amostra, faz com que o ruído possa ser considerado mínimo quando comparado com a região em que a sonda está livre da superfície.

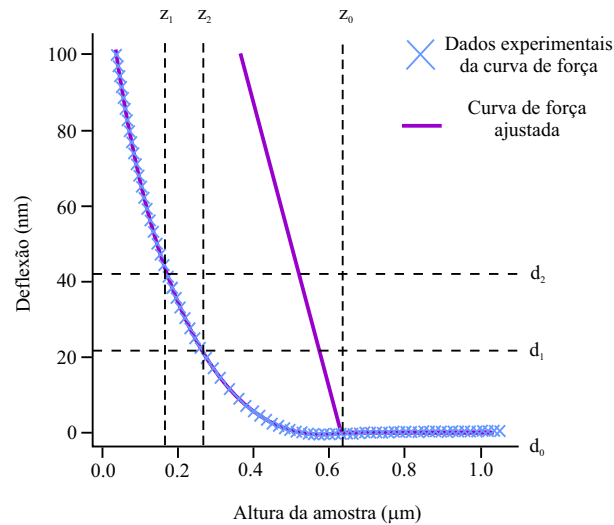


Figura 3.9: Exemplo do procedimento de ajuste das curvas e obtenção de z_0 . A partir dos dados experimentais (curva de x) o ajuste da deflexão pode ser obtido pela média de d na região reta da curva de força correspondente ao cantilever fora da amostra. O intervalo de análise é definido pelos valores de d_1 e d_2 . O modelo de Hertz é ajustado para os valores do intervalo, resultando em valores de E e z_0 . Como pode ser visualizado no gráfico acima, a curva ajustada se aproxima muito bem da curva experimental. O ponto de contato encontrado está em torno de 610 nm. O módulo de Young encontrado para o caso acima é $E = 5100$ Pa.

3.4 Microscopia de força atômica em plaquetas humanas.

Como dito anteriormente, as plaquetas humanas desempenham um importante papel na coagulação sanguínea e na cicatrização de ferimentos. Normalmente, existem na corrente na forma "relaxada", na qual as células possuem uma forma discóide.

Danos causados aos vasos sanguíneos promovem a ativação dessas células, ocasionando uma drástica mudança na estrutura do seu citoesqueleto, levando a uma notável alteração de sua forma. A ativação também pode ser induzida pelo contato com superfícies, tornando possível obter imagens AFM de plaquetas ativadas sobre uma superfície de vidro, sob condições fisiológicas em tempo real [93] (Fig. 3.10). Na Fig. 3.10(A) é possível observar que uma plaqueta em sua forma quase discóide, com a presença de alguns *filopodia*, começa a aderir ao substrato. No início os *filopodia* parecem ser pontos de saliências (imagem (A), setas azul e vermelha). Na etapa seguinte, grânulos aparecem no córtex da célula. (figuras (B) e (C), setas verdes e azuis). Em (B) um grande e plano *lamellipodium* é formado (seta vermelha) entre as saliências, o qual é livre de grânulos. Um minuto mais tarde, em (C) o *lamellipodium* é preenchido com grânulos (seta vermelha) e dois *filopodia* (imagem (B), seta azul) fundiram-se para dar forma a um *lamellipodium* preenchido com grânulos. Durante a seqüência (B-F) alguns grânulos se movem em direção ao córtex e desaparecem quando a área da célula é aumentada (setas verdes e azuis). Na imagem (E) a mudança da forma está quase completa: alguns grânulos permanecem distribuídos sobre o *lamellipodium* (setas vermelhas e verdes). Os grânulos desvanecem gradualmente (imagem F, setas vermelhos e azuis) e desapareceram em (G). Em (H) as estruturas ásperas do citoesqueleto são visíveis (seta verde)

Em seu estado "relaxado", a plaqueta pouco se adere ao substrato, tornando muito difícil a execução de sua imagem. Contudo, com o tempo, devido à sua ativação, mudanças podem ser visualizadas: inicialmente, um fino *filopodium* é visto saindo do interior da célula, o qual fica cheio de grânulos transportados do centro da célula, eventualmente formando os *lamellipodia* [51].

Os estudos em AFM proporcionam suporte para observar que, durante a ativação, os grânulos se fundem diretamente com a membrana plasmática. Detalhes do citoesqueleto e das mudanças ocorridas durante a ativação podem ser monitoradas com o objetivo de melhor compreender essas células.

Em plaquetas não totalmente fixas, a sonda deforma a célula durante a varredura

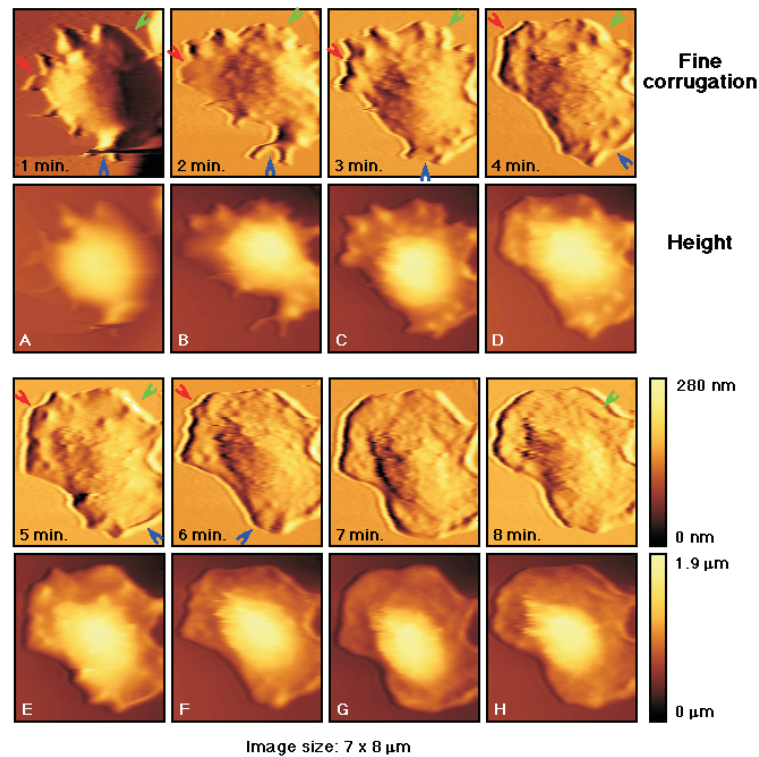


Figura 3.10: Curso temporal da ativação de uma plaqueta humana sobre vidro [93].

para diferentes alturas, dependendo da região do interior da célula pressionada pela sonda e da magnitude da força aplicada (Fig. 3.11).

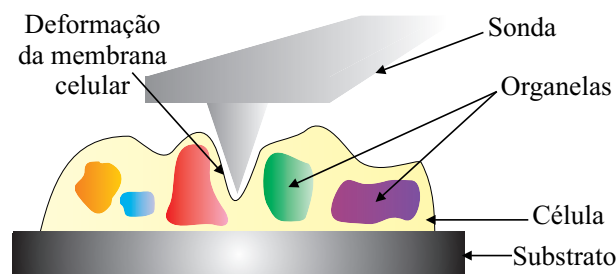


Figura 3.11: Representação pictórica da sonda de AFM deformando a membrana de uma célula.

Plaquetas que estão fixas em uma superfície por meio de algum tratamento químico, mas não ativadas, podem ser observadas com AFM sob baixas quantidades de força sem nenhuma mudança notável em sua forma durante o tempo. Contudo, se forças de maior valor forem aplicadas a essas plaquetas, pode-se promover a ativação das mesmas

[94]. A deformação da célula permite obter informações a respeito da elasticidade de suas estruturas [95].

Com técnicas de mapeamento de força, como já vimos, é possível gerar mapas de topografia e elasticidade simultaneamente, de células vivas ativadas [95] (Fig. 3.12). A variação das propriedades elásticas ao longo da célula pode estar relacionada com as diferentes regiões da mesma. Sondas modificadas podem também ser usadas para evidenciar áreas específicas na membrana de plaquetas [96].

A identificação de características da superfície da membrana plaquetária pode ser efetuada por meio de ligantes específicos aderidos às sondas. Esferas de ouro coloidais, de tamanho nanométrico, conjugadas com receptores de fibrinogênio têm sido utilizadas para mapear a distribuição desses sítios na superfície da célula. Os estudos em AFM são validados com esta técnica através de microscopia de varredura eletrônica [97].

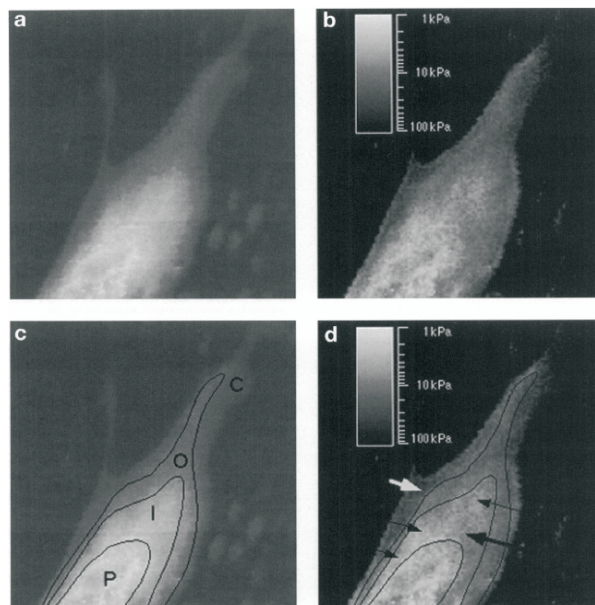


Figura 3.12: Mapa topográfico (a) e elástico (b-d) de plaquetas humanas. O tamanho da imagem é de $4.3 \times 4.3 \mu\text{m}$. A escala cinza na imagem (b) é de $2 \mu\text{m}$. Na imagem (b) o módulo elástico é mostrado de tal forma que as regiões mais escuras correspondem a 100 kPa e as regiões mais claras a 1 kPa. Diferentes regiões da plaqueta são identificadas na figura (c): *P* é o pseudonúcleo, *I* é o tecido interno, *O* é o tecido externo e *C* o córtex. Em (d), observamos que o pseudonúcleo é a região mais macia, variando de 1.5-4 kPa, o tecido interno possui elasticidade de aproximadamente 4 kPa, e o externo varia de 10-40 kPa, as áreas do córtex são as mais duras, com aproximadamente 50 kPa [95].

4

Medidas de microelasticidade em plaquetas humanas.

No capítulo anterior discutiu-se a teoria, bem como o aparato experimental necessário (no caso o microscópio de força atômica) à determinação do módulo de elasticidade (também conhecido como módulo de Young) em sistemas microscópicos. Como já mencionado, a chave mestra desta análise é o estudo da curva de força extraída do comportamento da deflexão do cantilever quando submetido ao chamado ciclo de força. Neste capítulo, esta técnica é aplicada à obtenção e comparação do módulo microelástico de diversas regiões das células do sangue objetos de investigação deste trabalho, as plaquetas humanas. Também é possível encontrar aqui, todo o procedimento e material utilizado no experimento acima citado.

4.1 Função plaquetária e análise via AFM.

Por serem fragmentos provenientes do megacariócito, as plaquetas não possuem núcleo. Apesar de serem células relativamente pequenas e simples, e com um metabolismo limitado (devido ao fato de não possuírem núcleo e por não serem capazes de sintetizar proteínas), apresentam uma extensa variedade de processos bioquímicos, que desempenham um papel central na regulação hemostática e na trombose. Durante a trombose, numerosos receptores na membrana da plaqueta desencadeiam a sua ativação, levando à adesão e agregação dessas células. Sob condições hemostáticas normais, as células endoteliais, que formam o tecido do vaso sanguíneo, provêm a interface hemocompatível com o sangue, enquanto as plaquetas circulam na corrente sanguínea em seu estado relaxado. Danos causados aos vasos sanguíneos ou algum estado de doenças crônicas relacionadas a eles expõem a matriz extracelular subendotelial. Isto inicia uma alteração do balanço hemostático, levando à formação do trombo sanguíneo [98].

Nesse processo, as plaquetas são ativadas e aderem à superfície trombogênica. Essa adesão é mediada por proteínas presentes no plasma sanguíneo tais como o fibrinogênio, vitronectina, fibronectina e o fator de von Willebrand (vWF), que se ligam aos receptores da membrana plaquetária, quais sejam as glicoproteínas GPIIb/IIIa (Tabela 1.1). A anexação dessa célula ao fibrinogênio é necessária para que a agregação plaquetária ocorra. Sob condições de alta pressão, que ocorre frequentemente em algumas artérias estenóticas, a agregação e adesão das plaquetas são mediadas pela ligação do vWF às glicoproteínas GPIb α e GPIIb/IIIa [99].

Seguindo a adesão na superfície, a morfologia da plaqueta ativada muda drasticamente sua conformação (seu diâmetro pode variar de $3\mu\text{m}$, em seu estado não ativado, a $7\text{-}10\mu\text{m}$ de diâmetro após a ativação [100]) para formatos variados, dependendo da superfície de estímulo. Essa reorganização estrutural das plaquetas faz delas um exemplo de como as propriedades das células são precisamente controladas [47]. Em superfícies eletricamente carregadas como o vidro, as plaquetas ficam fortemente aderidas, possibilitando assim, a investigação dessas células por meio da técnica AFM.

Em seu estado relaxado, a plaqueta possui um grande número de vesículas e mi-

crotúbulos em sua membrana. Durante o processo de ativação, após a estimulação por agonistas, tais como a trombina, algumas dessas vesículas se fundem com a membrana plasmática. Estas vesículas secretam substâncias químicas que aumentam a superfície da plaqueta [101]. Outra população de vesículas se concentra no centro da célula formando o granulômero ou pseudonúcleo [102]. As plaquetas podem secretar esses grânulos por uma invaginação da membrana plasmática [103], ou fusão da mesma [104].

Os fatos acima citados justificam o interesse na comparação do módulo de Young de diferentes regiões ao longo da superfície de uma plaqueta ativada. Para tanto, a aplicação de pequenas forças na parte exterior da célula sobre essas regiões de interesse auxilia no traço do perfil elástico das referidas células. O instrumento adequado à aplicação destas forças é o microscópio de força atômica. Todas as células analisadas nesse estudo, foram coletadas de doadores livres de ácido acetilsalicílico (ASPIRINA), para que a plaqueta não fosse comprometida.

4.2 Metodologia e material utilizado.

O método aplicado pode ser dividido em dois momentos: coleta e preparação das células e análise no AFM.

4.2.1 Coleta e preparação das células.

As células foram preparadas para o experimento obedecendo a metodologia descrita a seguir:

1. O sangue foi coletado através de um pequeno furo no dedo dos voluntários feito com um lancetador, equipado com lancetas descartáveis [Fig. 4.1(a)];
2. Então, uma gota de sangue total foi depositada sobre uma lamínula de vidro com 13 mm de diâmetro, dimensão exata do porta-amostra do microscópio [Fig. 4.1(b)];

3. Após a deposição esperou-se 30 s para que as plaquetas aderissem ao vidro [Fig. 4.1(c)];
4. Feito isto, a lamínula foi lavada vigorosamente em solução tampão PBS (145mM NaCl e 5mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,4), a fim de remover todas as outras células do tecido sanguíneo, bem como as plaquetas que não aderiram fortemente ao substrato de vidro [Fig. 4.1(d-f)];
5. Lavada a lamínula, foi aplicado um leve jato de nitrogênio para reforçar a fixação das células [Fig. 4.1(g)];
6. Finalmente, a lamínula foi montada no porta-amostra e levada ao AFM para análise [Fig. 4.1(h-j)].

4.2.2 Análise no microscópio de força atômica.

É importante lembrar que as medidas foram realizadas em meio líquido, cujo fluido de operação era solução tampão PBS [95]. Assim, fez-se necessária a utilização de uma célula líquida equipada com um *O-Ring*, já mostrados no capítulo anterior. Vale mencionar o fato de que, após decorrido um tempo de aproximadamente 40 min do início da obtenção das curvas de força, estas passavam a se comportar de maneira instável, o que acarretava numa medida pobre, com a curva de força seriamente comprometida por ruídos. Observando este fato diversas vezes, notou-se que tal fenômeno ocorria devido à evaporação do líquido de operação (PBS), tornando necessária a injeção de nova quantidade de fluido na célula líquida (aproximadamente 50 μl de PBS).

A análise AFM pode ser dividida em três momentos distintos:

1. Obtenção de uma boa imagem de altura e deflexão;
2. Zoom sobre a região de interesse;
3. Obtenção da curva de força.

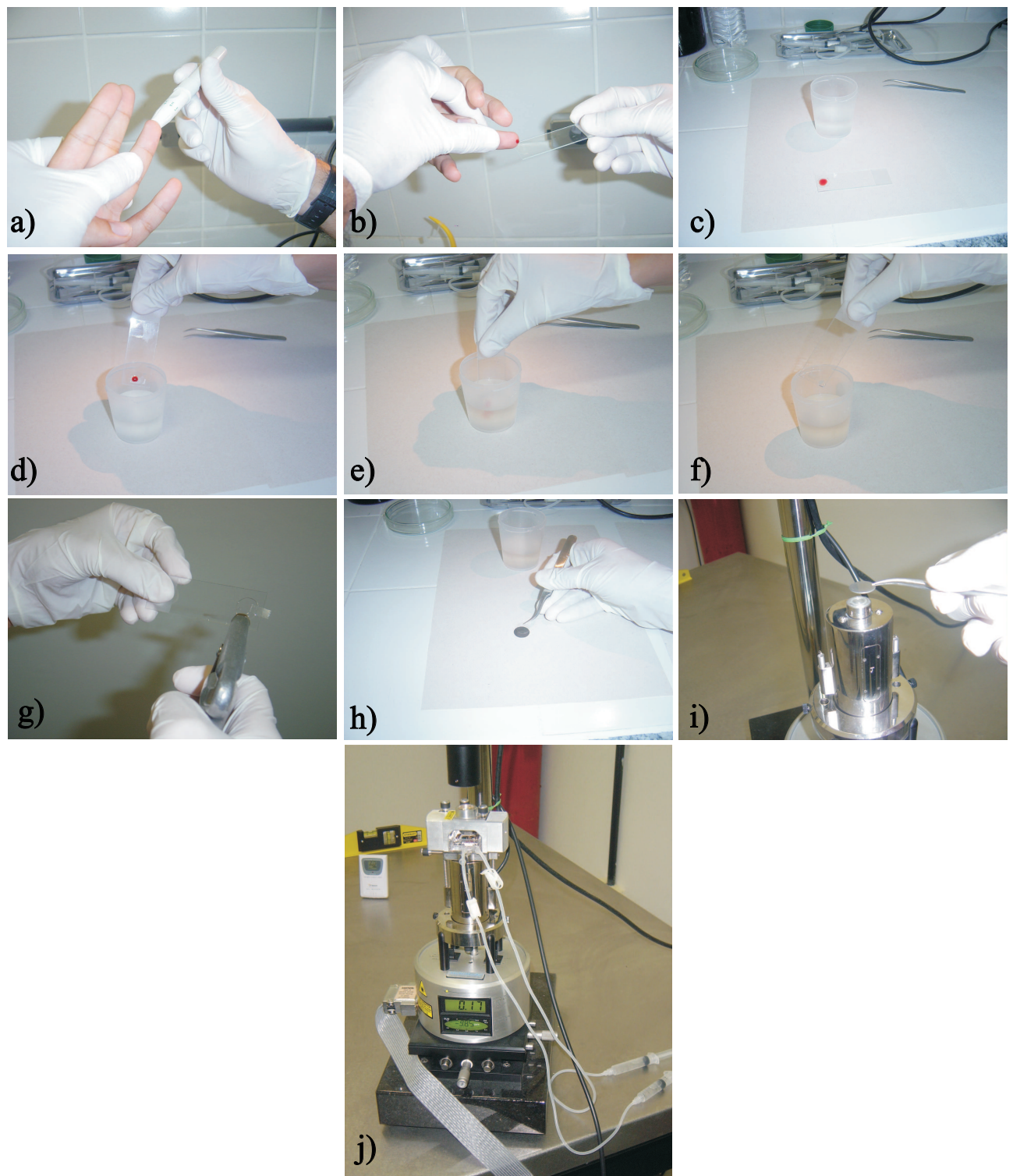


Figura 4.1: Esquema de preparação das plaquetas para análise por AFM.

Em todo o processo foi utilizada a mesma sonda, não sendo necessária a sua troca para a realização das três diferentes etapas.

Antes de ser montada na célula líquida a sonda passou por um processo de lavagem em etanol 100% e foi submetida à irradiação ultravioleta (UV) durante 1 h, com o objetivo de remover possíveis contaminantes (Fig. 4.2). A Tabela 4.1 mostra as especificações do *cantilever* utilizado.

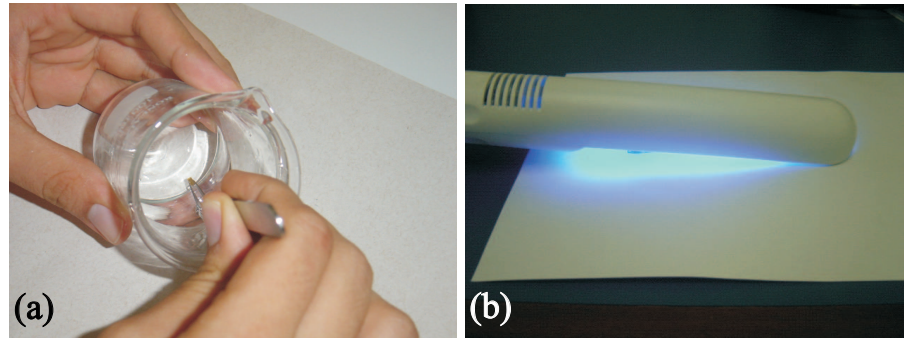


Figura 4.2: (a) Processo de lavagem da sonda AFM em etanol e (b) posterior exposição ao ultra-violeta por 1 hora.

Tabela 4.1: Especificação do *cantilever* utilizado na obtenção das imagens de altura e curvas de força.

TABELA 4.1												
	Comprimento (μm)			Largura (μm)			Frequência (kHz)			K (N/m)		
Forma D	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.	Nom.	Min.	Max.
triangular	196	180	196	23	18	28	18	12	24	0.06	X	X

As especificações da ponta foram as seguintes:

Forma: triangular;

Altura: 2.5 - 3.5 μm ;

Ângulo de abertura: 35°;

Material da sonda: nitreto de silício.

O microscópio de força atômica empregado foi um Nanoscope IIIa Multimode, fabricado pela Digital Instruments, Santa Bárbara - CA. Os parâmetros relevantes relacionados ao AFM para a aquisição das imagens estão descritos a seguir:

Modo de varredura: contato;

Tipos de imagens: altura e deflexão;

Numero de linha por imagem: 512;

Scanner: tipo "J", com amplitude lateral de 120 μm ;

Taxa de varredura: 3 Hz.

A temperatura ambiente onde se realizaram as medidas era de aproximadamente 22°C. Os canos de silicone, os *O-Rings*, os conectores da célula líquida e a própria célula líquida foram lavados sucessivas vezes com etanol e água destilada, e secos com um jato de nitrogênio antes das medidas.

4.2.3 Resultados.

A Fig. 4.3 mostra uma imagem AFM de uma plaqueta ativada sobre um substrato de vidro. Algumas regiões da célula podem ser facilmente identificadas. A região mais alta (P) corresponde ao pseudonúcleo ou granulômero, alguns *filopodia* (F) se espalham em várias direções. Também é possível visualizar uma região mais plana denominada *lamellipodium* (L).

Outra característica interessante que pode ser observadas nas imagens AFM de plaquetas humanas é a presença sobre o substrato, na periferia da célula, de pequenos grânulos (em torno de 200 nm), que são secretados através sua membrana no momento de sua ativação, como podem ser observado na Fig. 4.4.

A Fig. 4.5 mostra gráficos de curvas de força obtidas em três regiões distintas da amostra: substrato, *filopodium* e pseudonúcleo. A curva de força no substrato (curva vermelha) basicamente apresenta duas regiões: (1) a porção onde a sonda está fora de contato com a superfície, na qual a deflexão do *cantilever* é proporcional à altura da

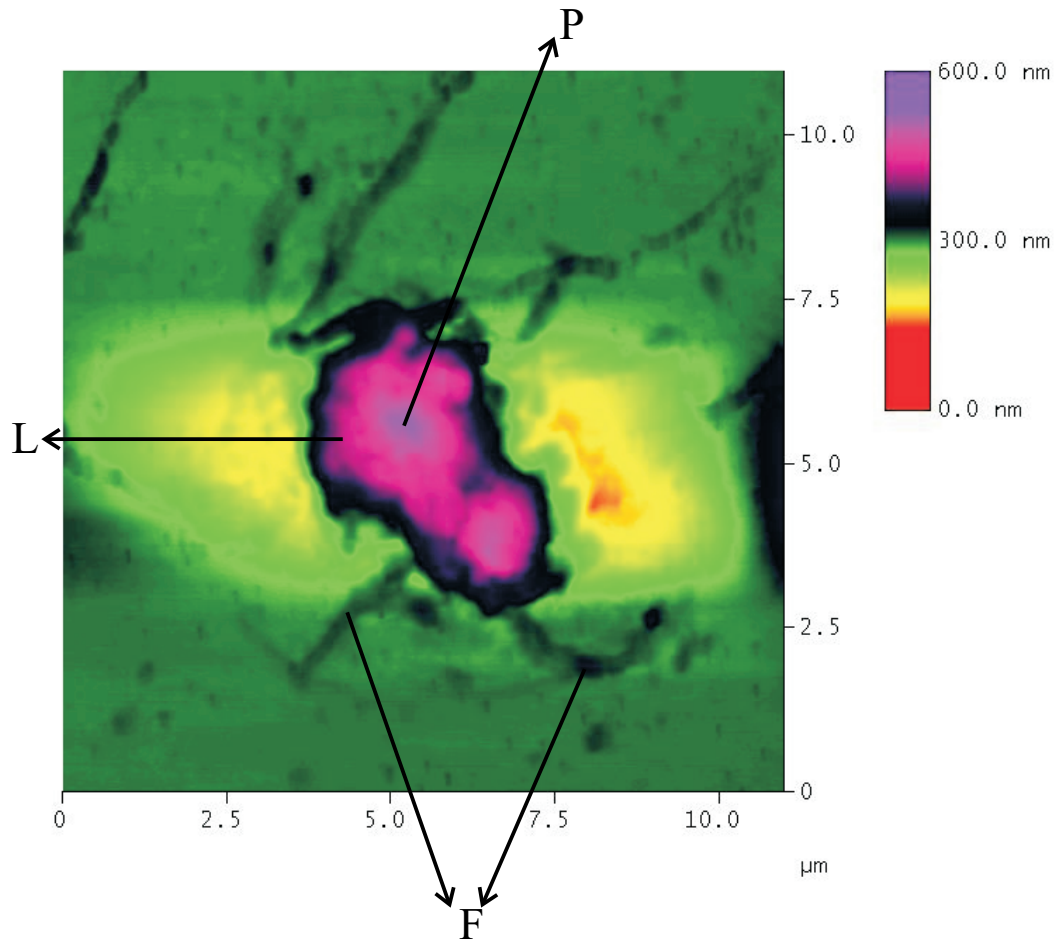


Figura 4.3: Imagem de altura de uma plaqueta ativada sobre vidro. (P)-Pseudonúcleo, (F)-*Filopodium* e (L)-*Lamellipodium*

amostra permanecendo constante (lado esquerdo da curva); (2) região de contato, onde a deflexão do *cantilever* é basicamente proporcional à altura da amostra, resultando na porção direita da curva. No caso de regiões macias da amostra, a medida da deflexão é menor devido à indentação, como vemos na curva obtida sobre o pseudonúcleo (curva azul) (Fig. 4.5).

A análise das curvas mostradas na Fig. 4.6 revela que a indentação produzida na célula é de natureza elástica, isso se deve ao fato de que a curva de retração é bastante semelhante a de aproximação, o que indica que a superfície da célula volta à sua forma original após o término do contato com a sonda.

Numa curva de força a deflexão é proporcional à força que a sonda aplica na amostra

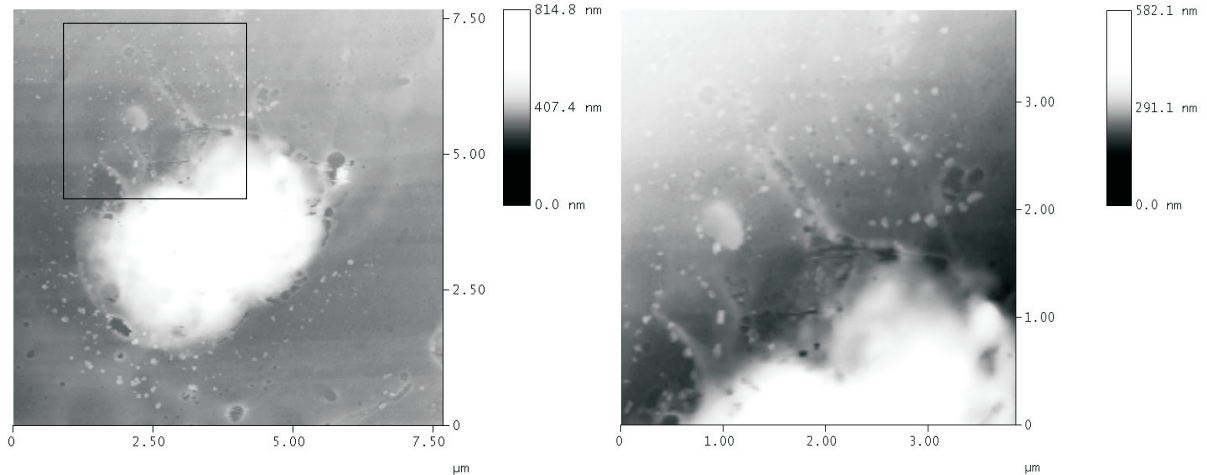


Figura 4.4: Possíveis partículas liberadas pela célula durante a ativação.

[Eq. (2.6)]. Assim, a diferença entre a curva obtida sobre o substrato duro e aquela obtida sobre uma região macia, corresponde à indentação nessa região. A indentação elástica na membrada da plaqueta resulta em uma curva de força não linear que pode ser analisada como discutido na Seção 3.3, considerando o indentador (sonda AFM), infinitamente mais rígido que a amostra. A sonda de nitreto de silício possui módulo elástico em torno de 150 GPa [58].

Como mostrado no capítulo anterior, os valores de módulo de Young para cada região da célula foram obtidos utilizando-se o modelo de Hertz (Fig. 4.5). O baixo valor encontrado do módulo de elasticidade para o vidro, 810.6 kPa, quando comparado aos valores conhecidos, que giram em torno de 50 GPa [99], sugerem a presença de algum material macio depositado na superfície da lamínula durante a preparação das plaquetas, que pode ser restos de material orgânico (células) ou o resquícios do próprio plasma sanguíneo.

Na Fig. 4.5, a curva de força tomada sobre *filopodium* mostra um comportamento intermediário entre as curvas no substrato e no pseudonúcleo da célula. Sob baixas quantidades de força, que correspondem a pequenas deflexões do *cantilever*, o comportamento não linear da curva na região do *filopodium* é visível, como ocorre no pseudonúcleo. Já em valores de força muito altos, correspondentes as deflexões acima de 40 nm,

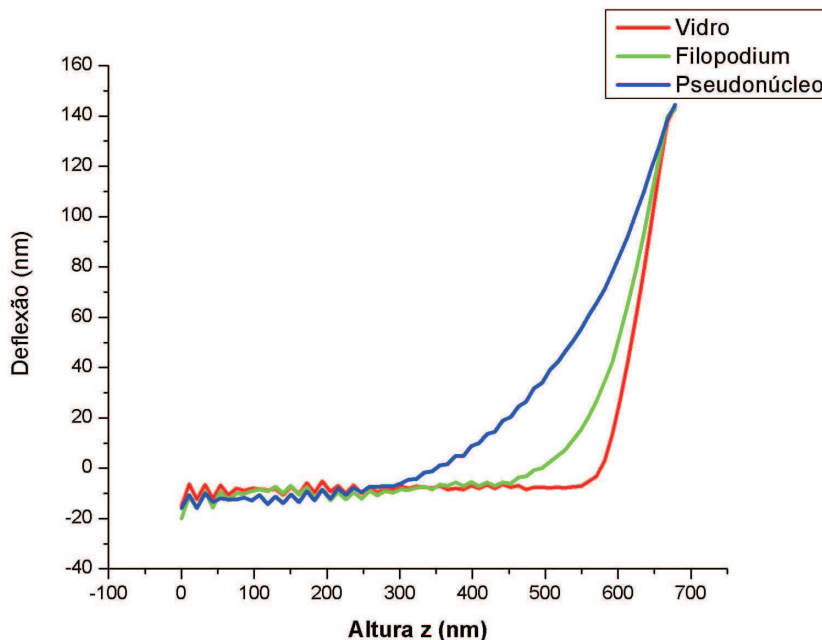


Figura 4.5: Curvas de forças típicas obtidas sobre diferentes regiões morfológicas da plaqueta e sobre o substrato (vidro). O módulo de Young de cada região foi calculado com base nestas curvas utilizando o modelo de Hertz para uma sonda cônica: 810.6 kPa - vidro, 66.1 kPa - filopodium e 13.7 kPa - pseudonúcleo.

a curvatura do gráfico se assemelha àquela obtida sobre o substrato, mostrando que a amostra nesse momento passa a ser rígida como este. Esse comportamento sugere que a célula foi completamente pressionada de forma que a dureza do vidro pôde ser sentida.

A histerese observada na maioria das curvas de aproximação e retração realizadas em meio fluido (Fig. 4.6) sugere que existe uma resistência hidrodinâmica devido ao líquido no qual, amostra e *cantilever* estão imersos, fazendo com que os *cantilevers* mais macios se curvem drasticamente, principalmente sob altas taxas de varredura. No entanto, quando trabalhamos com as duas curvas simultaneamente, uma média entre essa separação pode ser calculada, com o objetivo de eliminar tal histerese [95].

O cálculo da indentação e do módulo de elasticidade na membrana das plaquetas leva em conta somente a curva de aproximação, pois é nessa porção do gráfico que essas informações estão disponíveis. Já a curva de retração poderia nos fornecer al-

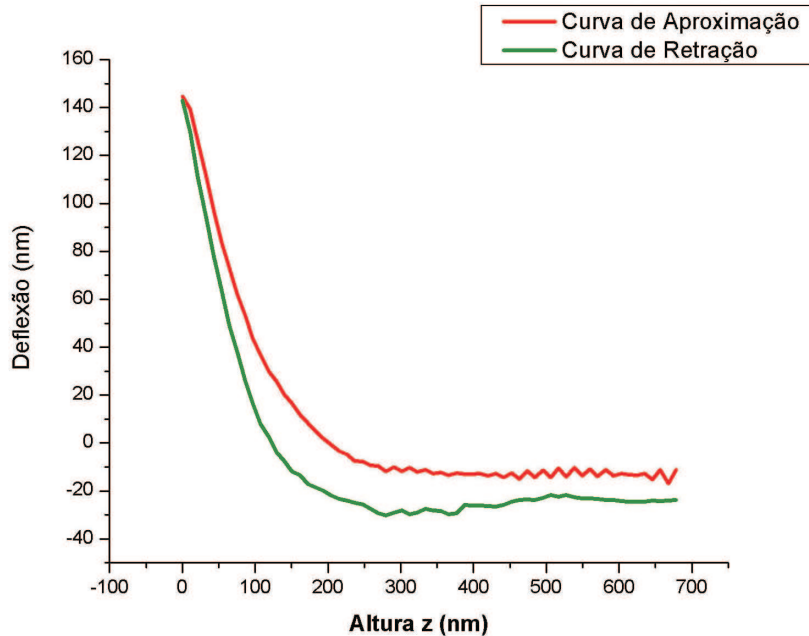


Figura 4.6: A semelhança entre as curvas de aproximação e retração vista nesta figura mostra a natureza elástica da membrana de uma plaqueta. A histerese entre as curvas é causada pela resistência hidrodinâmica do fluido de operação.

guma informação a respeito da adesão ou viscoelasticidade da célula. Contudo, como mostrado na Fig. 4.7, onde diversos gráficos da retração da sonda em diferentes regiões da plaqueta foram sobrepostos, concluímos que as células reagem principalmente elasticamente e que nenhum comportamento viscoso é observado.

Considerando cônica a geometria da ponta AFM utilizada, podemos obter um gráfico da indentação *versus* a força aplicada à plaqueta (Fig. 4.8), mostrando que, ao passo que em a força aumenta, aumenta também a indentação produzida na célula. Observamos que existe uma excelente concordância entre a curva obtida através do modelo utilizado e a curva experimental, o que torna confiável os valores de módulo de Young obtidos por meio dele.

O modelo teórico desenvolvido para análise elástica (Seção 3.3) fornece primeiramente um gráfico de deflexão *versus* altura que destaca a região de indentação, a partir do cálculo de z_0 . O valor de z_0 e E são obtidos através de um *fit* de Monte Carlo [95],

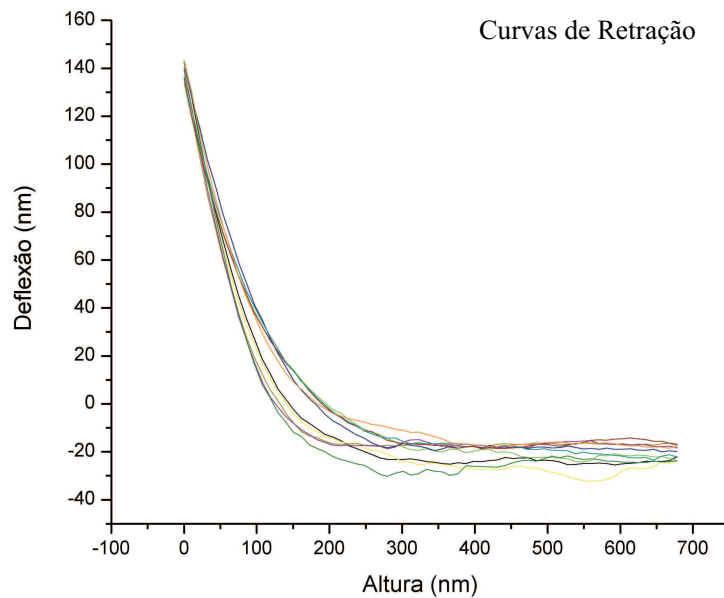


Figura 4.7: Diversas curvas de retração atestando a ausência de adesão entre a sonda AFM e membrana da plaqueta.

como mostrado na Fig. 4.9. Neste cálculo poucos pontos da curva experimental são utilizados, de forma que uma região de 20 nm corresponda à indentação. Isso é feito considerando que a membrana das células em geral possuem aproximadamente essa espessura. A Fig. 4.10 destaca em vermelho a região de indentação em uma plaqueta humana, calculada a partir deste modelo. Esse procedimento fornece o melhor ajuste para um intervalo da curva de força, permitindo estimar a altura em que a indentação inicia.

A discordância que ocorre entre o modelo e a curva experimental, para maiores intervalos de força, deve-se ao fato de que o modelo prevê uma amostra macia, e experimentalmente para uma carga maior de força, a curva passa a se comportar como uma amostra rígida Fig. 4.11. Com isso, observamos que considerando-se pequenas quantidades de força sobre a plaqueta, a influência do substrato pode ser desprezada.

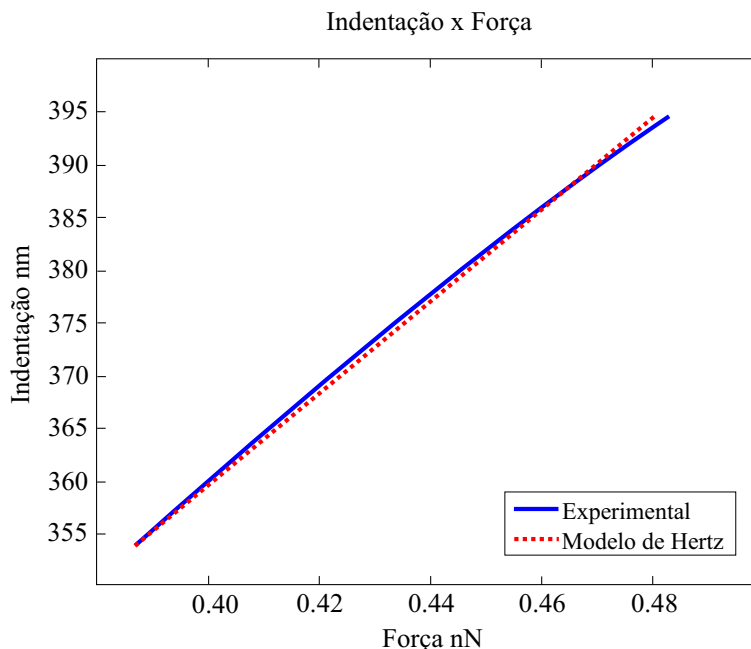


Figura 4.8: Curva de indentação *versus* força obtida sobre a membrana de uma plaqueta. Para pequenos intervalos de força, há uma grande concordância entre os dados experimentais e aqueles gerados pelo modelo

4.2.4 Modulação de força com piezo bimorfo.

Os dados extraídos através do modelo desenvolvido a partir da teoria Hertziana e das curvas de força obtidas com o modo *Force Plot*, são dados quantitativos. No entanto, imagens que fornecem informações qualitativas a respeito do comportamento elástico da amostra sob análise podem ser geradas através da técnica *Force Modulation* (modulação de força).

No capítulo anterior esta técnica já foi discutida em detalhes. Aqui, apresentamos alguns resultados da aplicação da mesma ao estudo das plaquetas. A Fig. 4.12 mostra uma imagem de modulação de força de uma plaqueta humana obtida com um *tipholder* bimorfo. As regiões mais claras da imagem representam as áreas de menor deflexão do *cantilever*, ou seja, áreas mais macias da amostra.

Observamos claramente sobre o substrato a presença de um material mais macio, que justifica o baixo valor de módulo de Young obtido com o modelo nessa região. Na Fig. 4.13, visualizamos a presença de impurezas sobre a superfície da amostra, que

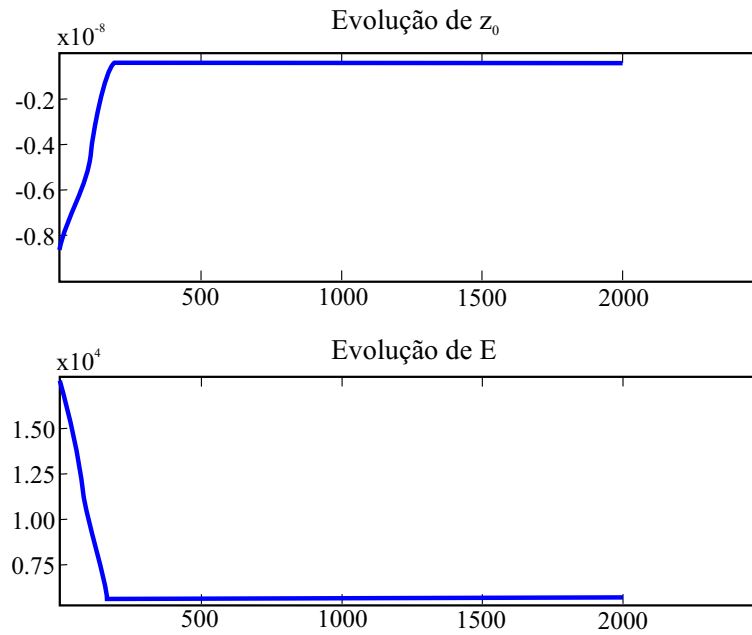


Figura 4.9: Obtenção dos valores de E e z_0 a partir do *fit* de Monte Carlo. Os valores são definidos após a sua estabilização com a evolução do ajuste.

pode ser, para o caso desta imagem, um cristal da solução tampão (nota-se o formato da impureza). É interessante identificar essas impurezas na superfície da célula, pois, na imagem de altura, essa região seria facilmente confundida com o pseudonúcleo (por se mostrar a região mais alta), o que produziria altos valores de E para essa região.

A desvantagem desta técnica é a impossibilidade de observação das células em meio fisiológico. Um vez que o *cantilever* é excitado por um piezolétrico bimorfo localizado no próprio *tipholder*, a imersão da sonda em meio líquido torna-se proibitiva, pois isto danificaria o piezo, fazendo-se necessária a operação do *Force Modulation* em ar. Assim, a preparação da amostra para este tipo de análise segue os mesmos passos já descritos na Seção 3.2.1., com diferença de que o processo é interrompido quando secamos a amostra com o jato de nitrogênio, sem a posterior utilização da célula líquida.

No próximo, introduziremos uma nova técnica que nos permitiu a obtenção de dados qualitativos e quantitativos a respeito da elasticidade da membrana das plaquetas em meio fisiológico.

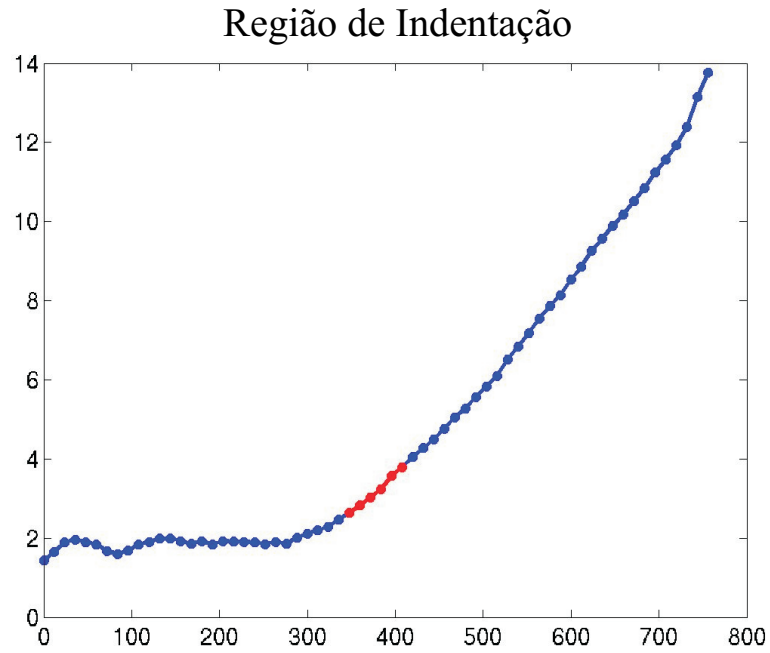


Figura 4.10: Curva de força com região de indentação destacada em vermelho.

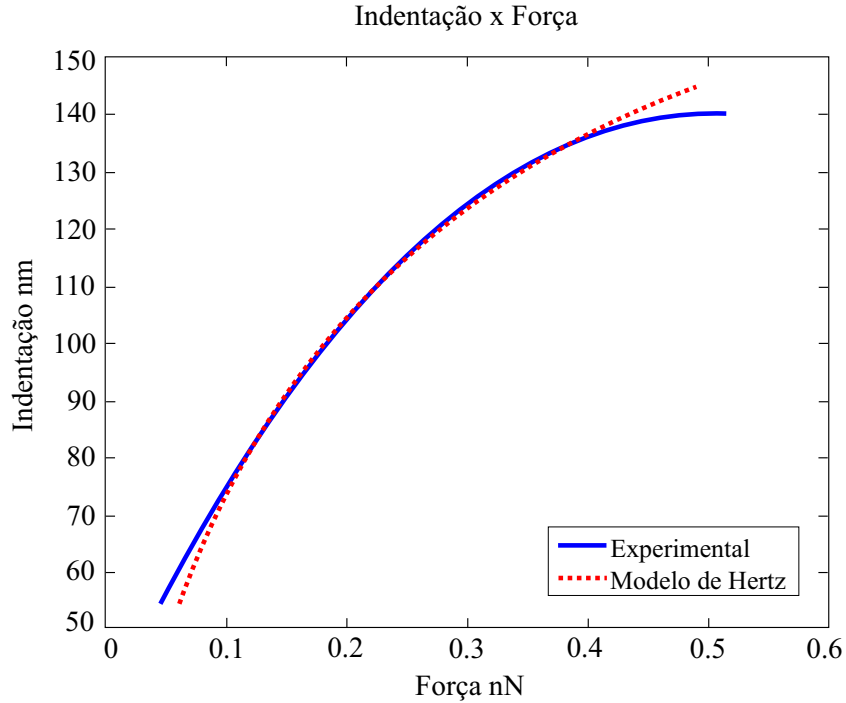


Figura 4.11: Discordância entre a curva teórica e experimental para altos valores de força.

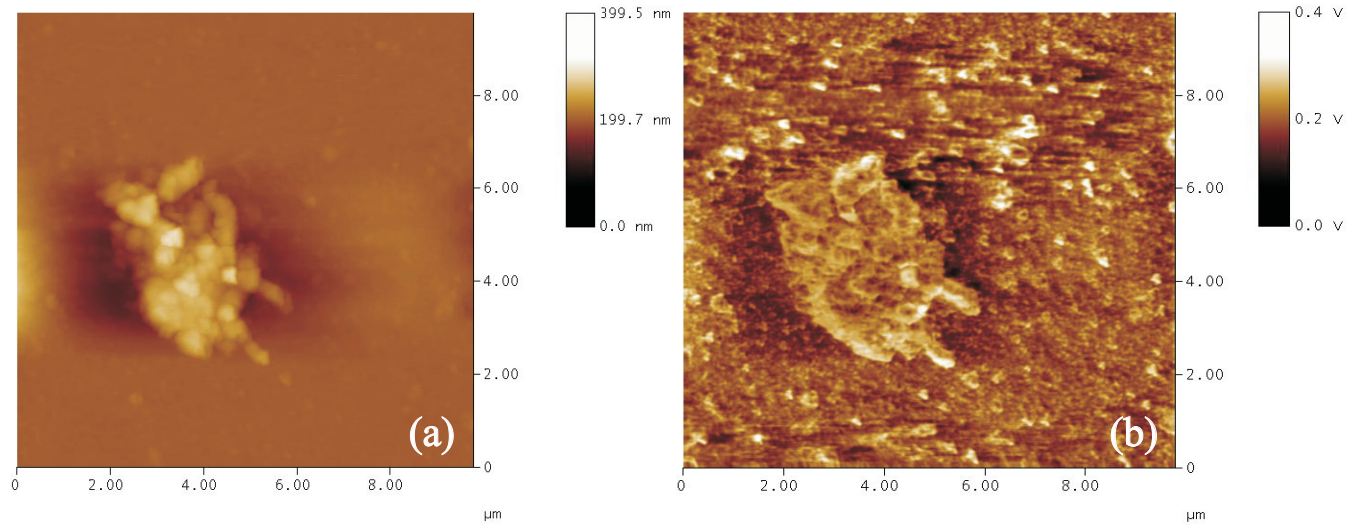


Figura 4.12: (a) Imagem de altura de uma plaqueta, (b) imagem de modulação obtida com *tipholder* bimorfo.

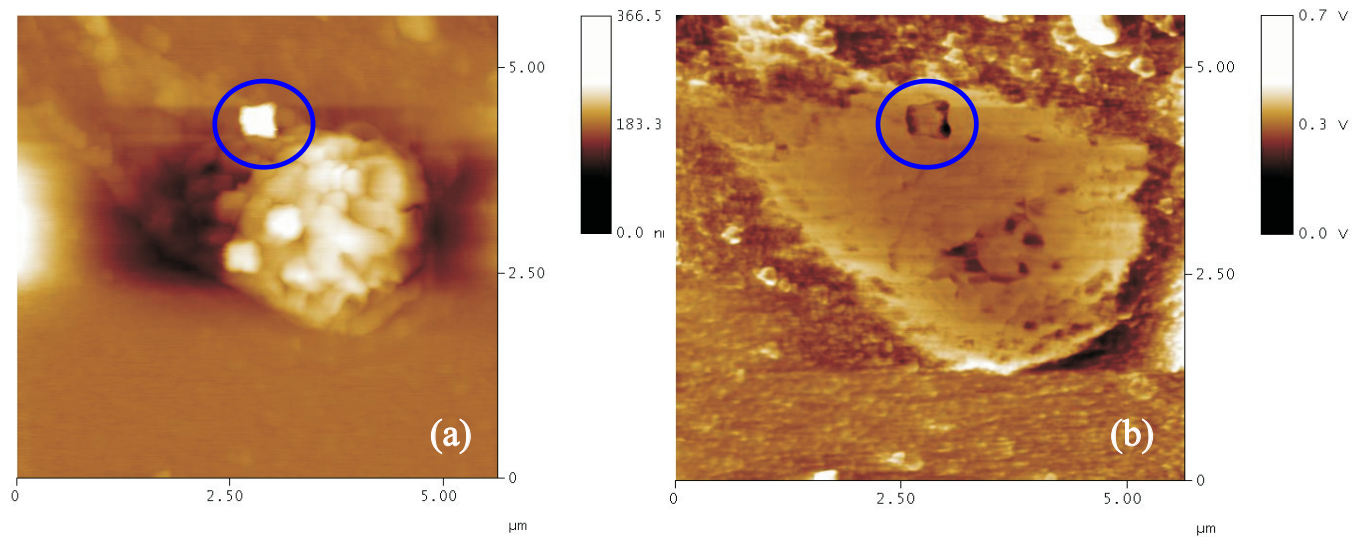


Figura 4.13: (a) Imagem de altura e (b) imagem de modulação de força evidenciando impurezas sobre a área varrida.

5

Volume de Força.

Um volume qualquer definido no espaço real é composto pelo produto das três dimensões: x , y e z . Assim, uma imagem tridimensional de um objeto é obtida das suas coordenadas no plano cartesiano (x,y) mais sua altura (z) . Neste capítulo, introduzimos um novo conceito de volume, específico à aplicação em AFM: o volume de força (Force Volume). Neste capítulo, a imagem de volume de força foi utilizada na análise do comportamento de plaquetas humanas quando submetidas à forças aplicadas pela sonda AFM, possibilitando a dedução de algumas propriedades físicas relevantes desta superfície.

5.1 Introdução.

A técnica *Force Volume* (ou volume de força), já discutida em detalhes na seção 2.6, fornece a possibilidade de gerar imagens bidimensionais ou tridimensionais, que contenham informações a respeito, por exemplo, das características elásticas, adesivas, ou eletrostáticas da amostra analisada.

Nesta técnica, com o sistema operando no modo contato, várias medidas de deflexão do *cantilever* são realizadas sobre determinados *pixels* da imagem (escolha que discutiremos mais adiante). Cada medida desta deflexão é precedida por um degrau de variação na distância sonda-amostra. Realizada a medida, esta é armazenada num local de memória do sistema. Quando todas as medidas para um determinado *pixel* forem completadas, o processo é repetido para o próximo *pixel* e assim sucessivamente para toda a área de varredura desejada.

Os dados tridimensionais resultantes podem ser pensados como um conjunto de "camadas" da imagem. Cada camada horizontal é uma imagem representativa das medidas feitas através da área varrida a uma altura z dada. Como são feitas muitas medidas em cada *pixel*, o conjunto de dados pode também ser processado para a obtenção da curva de força-distância em cada um desses *pixels*.

A utilização desta técnica foi bastante útil no estudo com plaquetas humanas, pois com ela, obtemos simultaneamente todas as curvas de força para o intervalo de varredura escolhido, sem a necessidade de realizar um *zoom* sobre cada uma das regiões de interesse da célula e posterior aquisição do gráfico de força por meio do comando *Force Plot*, o que tornava tal procedimento bastante demorado e impreciso, no que diz respeito a posição da curva na amostra.

O procedimento detalhado para a obtenção das imagens de volume de força em plaquetas humanas está explicado a seguir.

5.2 Metodologia e material utilizado.

A coleta e preparação das células seguiu o mesmo procedimento já descrito na Seção 3.2.1. Os voluntários que tiveram suas plaquetas coletadas não estavam sob efeito de anti-agregantes plaquetários. O objetivo foi chegar a um valor médio de elasticidade para o pseudonúcleo da célula, para uma região intermediária (*filopodia*) entre o granulômero e o substrato de vidro, e finalmente, um valor para o próprio substrato (valor de referência).

O espaço amostral considerado neste processo constituiu-se em:

- 5 voluntários;
- 5 plaquetas de cada um desses indivíduos;
- 2 curvas de força sobre cada região de interesse acima citadas.

Um total de 150 curvas de força foi processado.

Toda a análise AFM foi realizada em líquido e possuiu os seguintes passos:

1. Primeiramente, uma imagem de altura da região de interesse foi obtida. Isto atribui valores para os parâmetros de imagem, inclusive, o tamanho da mesma;
2. Antes da obtenção da curva de força e início da imagem de volume de força, o valor de *setpoint* foi ajustado. Isso minimizou a quantidade de força aplicada na superfície, evitando danos às células e facilitando a obtenção das imagens, pois com grandes cargas de força, no momento da varredura, a célula pode se desprender do substrato.
3. Logo após, uma curva de força padrão foi gerada e ajustada no comando *Force Plot*, com o objetivo de mostrar claramente as porções de não contato e contato da sonda com a amostra. Esta curva foi ajustada por meio de parâmetros como *Z Scan Rate* e *Z scan size*. A sensibilidade da curva foi obtida para determinar a inclinação da região de contato;
4. O modo *Force Volume* foi então selecionado para o início da obtenção da imagem de volume. Na janela de comando desse modo de imagem, selecionamos o número

de *pixels* por linha (*samples per line*), o numero de gráficos de força que se deseja obter por cada linha de varredura (*number of samples*) e o volume de força (*force per line*). A partir disto, os dados começaram a ser coletados;

5. O último passo constituiu-se da captura da imagem.

Abrimos aqui um parênteses para elucidar os termos em itálico do passo acima. Tais são:

Force per line - número de curvas de forças coletadas e armazenadas ao longo de cada linha de varredura que afeta significativamente a velocidade de varredura. Este parâmetro é, eficazmente, a definição do plano *xy* da imagem de volume de força.

Number of samples - é o número de pontos coletados em cada curva de força. Conseqüentemente, é o número máximo de cortes que podem ser obtidos na imagem de volume de força, que seria a resolução em *z* desta imagem. Esse parâmetro não afeta na velocidade de varredura, mas sim no tamanho do arquivo obtido.

Samples per line - é o numero de *pixels* em cada linha de varredura na imagem de altura. O tempo total de aquisição das imagens de volume de força depende deste parâmetro. Ele afeta diretamente a resolução *xy* da imagem de altura

Sensitividade - é a deflexão do *cantilever* medida a partir da voltagem do fotodetector para as curvas de força da imagem de altura.

Setpoint - é a força ajustada entre a sonda e a amostra através de um valor em Volts.

A escolha do modo contato para esse procedimento se deve ao fato de que este modo de varredura produz imagens de resolução superior, sendo assim, melhor interpretadas. As forças encontradas nesse tipo de medida, decorrentes da interação da sonda AFM com a superfície, podem ser tanto atrativas quanto repulsivas, incluindo as forças eletrostáticas, forças de van der Waals, capilaridade, receptor-ligante, interações magnéticas e elasticidade da superfície, que é o objeto do nosso estudo.

As imagens de volume de força de plaquetas humanas obtidas por esse método foram realizadas com taxas de varredura de aproximadamente 15 Hz, tamanho lateral em torno de 10 μm , com resolução de 128 x 128 pixels nas imagens de altura e de 32 x

32 nas imagens de volume de força. O espaçamento entre as curvas de força efetuadas na superfície é de aproximadamente 312.5 nm, valor esse que é obtido pela razão entre o tamanho na imagem e a resolução do volume de força. Para a obtenção desses dados levou-se aproximadamente 20 min por aquisição de imagem. Este tempo é considerado levando-se em conta apenas a varredura, ou seja, cronometrado após a realização de todos os ajustes necessários.

As sondas utilizadas foram as mesmas descritas na Seção 3.2.2, bem como a preparação da célula líquida para a utilização no AFM.

5.3 Resultados.

Na Fig. 5.1 observamos uma medida de volume de força para uma plaqueta humana em líquido. No campo quadrado maior à esquerda, vê-se a célula através da habitual imagem de altura. Já no campo quadrado menor (parte superior direita) observa-se a imagem de volume de força da célula. No caso da célula dessa figura, a imagem de volume é dada pelos dados das curvas de aproximação, num determinado ponto de altura da mesma. O gráfico logo abaixo da imagem de volume de força mostra a curva de força do ponto selecionado na imagem de altura pelo marcador em cruz.

Múltiplos pontos podem ser marcados para que diversas curvas sejam observadas simultaneamente (Fig. 5.2). Apesar de ser mostrada na janela de comando, a imagem de volume de força não é fornecida quando exportamos os dados dessa medida em matrizes. Em vista disso, uma rotina computacional foi elaborada, para interpretar essas matrizes e gerar as imagens e dados desejados.

5.3.1 Resposta elástica qualitativa das plaquetas.

A Fig. 5.3 mostra todas as curvas de força obtidas por meio da análise de volume de força sobre uma única célula dentro do campo de varredura. As curvas de aproximação, que contém os dados de elasticidade, foram alinhadas uma ao lado da outra constituindo um relevo de força.

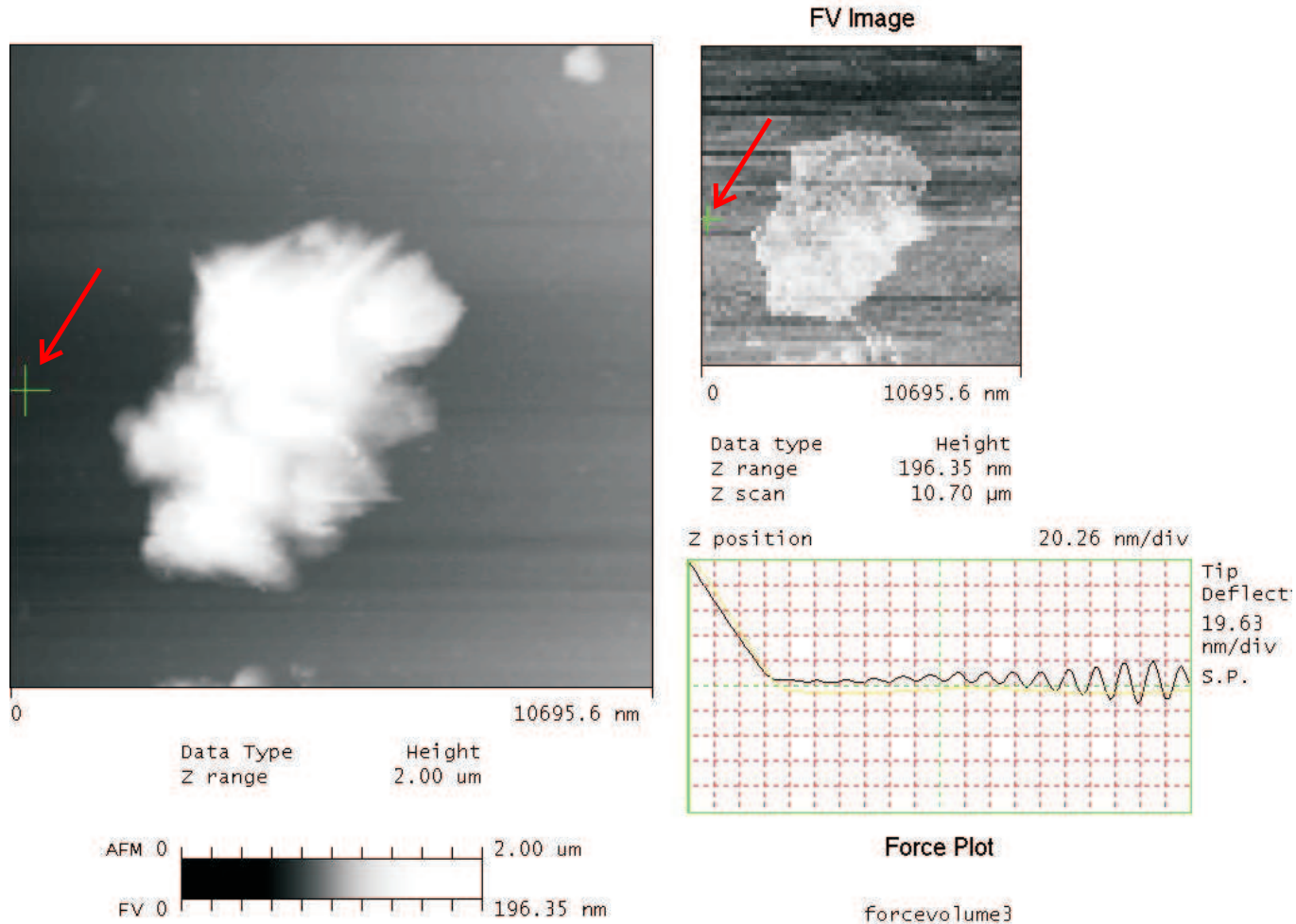


Figura 5.1: Janela de comando de uma medida de volume de força realizada em uma plaqueta humana. A curva de força mostrada no campo *Force Plot* correspondente a uma região no substrato. A histerese observada nas curvas se deve a resistência hidrodinâmica das medidas em solução tampão em taxas de varreduras moderadas. A redução das taxas de varredura até o completo desaparecimento da histerese se torna inviável por conta do elevado tempo de aquisição dos dados de volume de força. Também é observada a presença de algum ruído espúrio na curva de aproximação devido a vibração excessiva do *cantilever* no líquido.

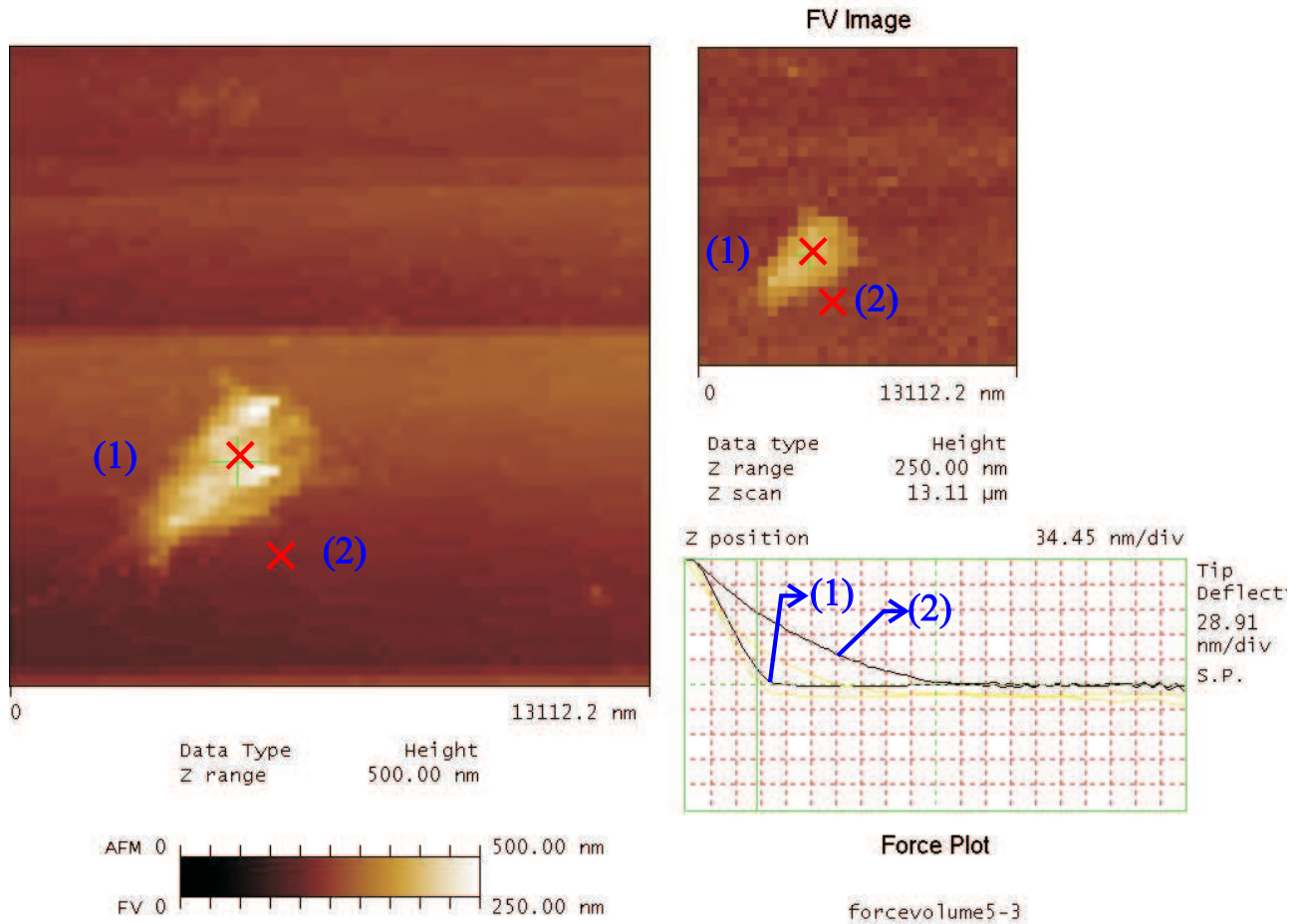


Figura 5.2: Medida de volume de força em outra plaqueta mostrando gráficos múltiplos de força em regiões correspondentes em (1) ao substrato e em (2) ao granulômero ou pseudonúcleo. Uma das vantagens desta técnica é o conhecimento exato do ponto da imagem de onde está sendo retirada a curva de força, bem como a obtenção simultânea da mesma. No gráfico de força, observamos a diferença de maciez das diferentes regiões.

O eixo vertical desse gráfico corresponde à deflexão do *cantilever*, o eixo horizontal corresponde à altura da amostra, e o terceiro eixo corresponde à posição lateral da amostra em que a curva foi realizada. Nesse relevo, algumas regiões podem ser distinguidas, tais como o substrato, o corpo da célula (pseudonúcleo) e uma região intermediária que corresponde aos *lamellipodia* e *filopodia*. As curvas correspondentes ao substrato aparecem com duas regiões lineares. Na primeira delas a deflexão do *cantilever* é constante, o que significa que a sonda ainda se encontra fora de contato com a amostra. Na outra, onde a deflexão é proporcional à altura do substrato, a sonda

encontra-se tocando este.

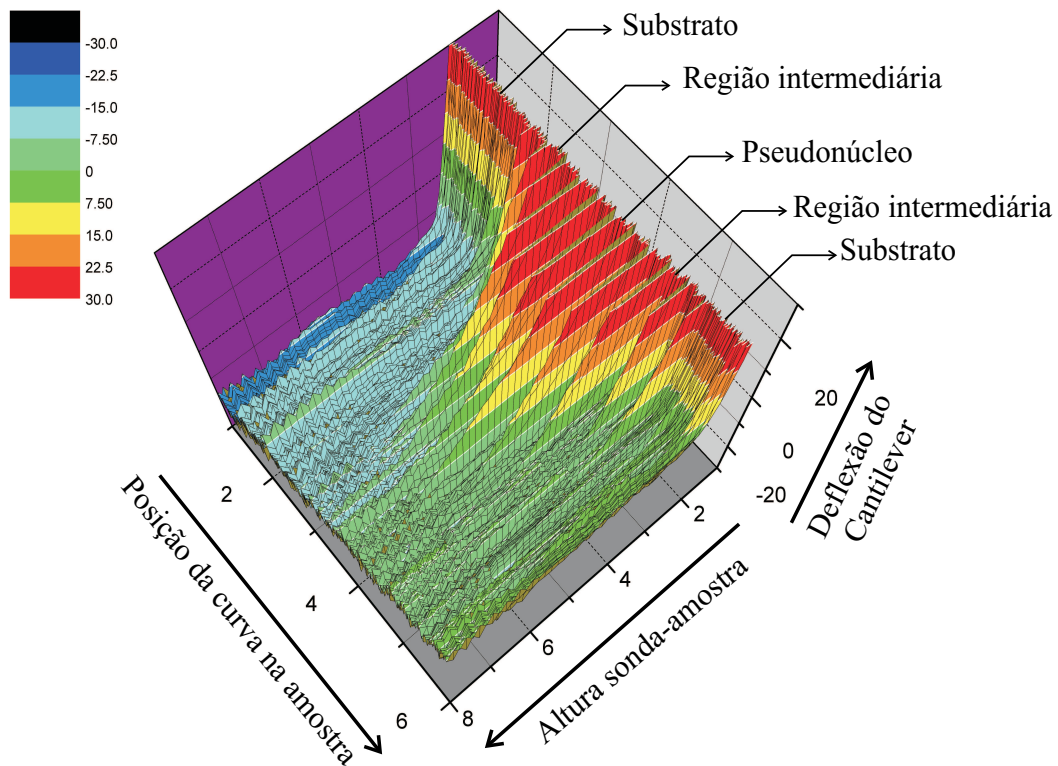


Figura 5.3: Conjunto de curvas de força adquiridas sobre uma área da lamínula que contém uma plaqueta ativada. Esse relevo de força identifica diversas regiões da amostra.

Caminhando na direção crescente do eixo posição da curva na amostra encontra-se um outro conjunto de curvas de força chamado de região intermediária. Algumas curvas desta região mostram que, sob altas cargas de força, a resposta do *cantilever* é similar àquela sobre o substrato. A figura também mostra curvas obtidas no corpo da célula, ou pseudonúcleo, cujo perfil suave indica a maciez do material. Outra característica visível neste gráfico é a diferença na mudança do regime das curvas para cada região, deixando claro a diferença de altura para cada uma delas. Nota-se com isso que a sonda toca primeiro o corpo da célula que às demais regiões. Para melhor compreensão do gráfico citado, esse revelo está colorido com diferentes faixas de cores que correspondem às linhas de deflexão constante, que também são linhas de força constante [Eq. (2.6)].

5.3.2 Superfícies de força constante.

Os dados obtidos com a imagem de volume de força nos fornecem a distribuição das forças a uma determinada altura z . Isso torna possível a obtenção de mapas de superfícies com força constante. Importando os arquivos contendo os dados como matrizes no formato ASCII, a terceira parte deste arquivo, contando com o cabeçalho, por meio de um programa numérico para processar esses dados, são capazes de reproduzir imagens tridimensionais de superfícies com isoforça.

Considera-se que os dados brutos obtidos são quadridimensionais, contendo informações da posição xy na área de varredura (1^a e 2^a dimensão), da deflexão (3^a dimensão) e da altura de cada gráfico de força (4^a dimensão). A fim de obter superfícies submetidas a uma mesma força, a informação da deflexão é mantida constante enquanto a posição xy bem como a informação de altura variam.

A Fig. 5.4 mostra mapas tridimensionais de uma plaqueta humana com diferentes valores de força. A Fig. 5.4(a) é um relevo de força constante, obtido a partir de uma quantidade de força muito pequena, em torno de 3.6 nN. A cada imagem subsequente a carga de força aumenta. Na Fig. 5.4(d) tem-se uma superfície de isoforça com valor de 7.2 nN. Um fato interessante evidenciado por esse conjunto de imagens é o efeito da compressão do *cantilever* sobre célula à medida que a força aumenta, ressaltando o caráter elástico da amostra. Cessada a força aplicada, a célula volta ao seu tamanho original.

Essas imagens assemelham-se àquelas obtidas no modo de altura, porém diferem significativamente em como são geradas e naquilo que representam. Na imagem de altura, a sonda varre a amostra lateralmente enquanto o controle do microscópio mantém a deflexão e, conseqüentemente, a força constante. Nesse modo de imagem, as forças laterais estão sempre presentes, o que pode contribuir para remover a célula do substrato durante a medida. Por esse motivo, é extremamente necessário regular previamente a quantidade de força na amostra através do *setpoint*.

Imagens com forças tão pequenas como as mostradas na Fig. 5.4(a) não podem ser obtidas pelo modo de altura com microscópios de força atômica convencionais,

ao passo que forças como as aplicadas na imagem 5.4(d), pelo método convencional, facilmente destruiria a amostra ou arrancaria a mesma do substrato. Logo, para o método convencional, apenas um pequeno intervalo de força é acessível.

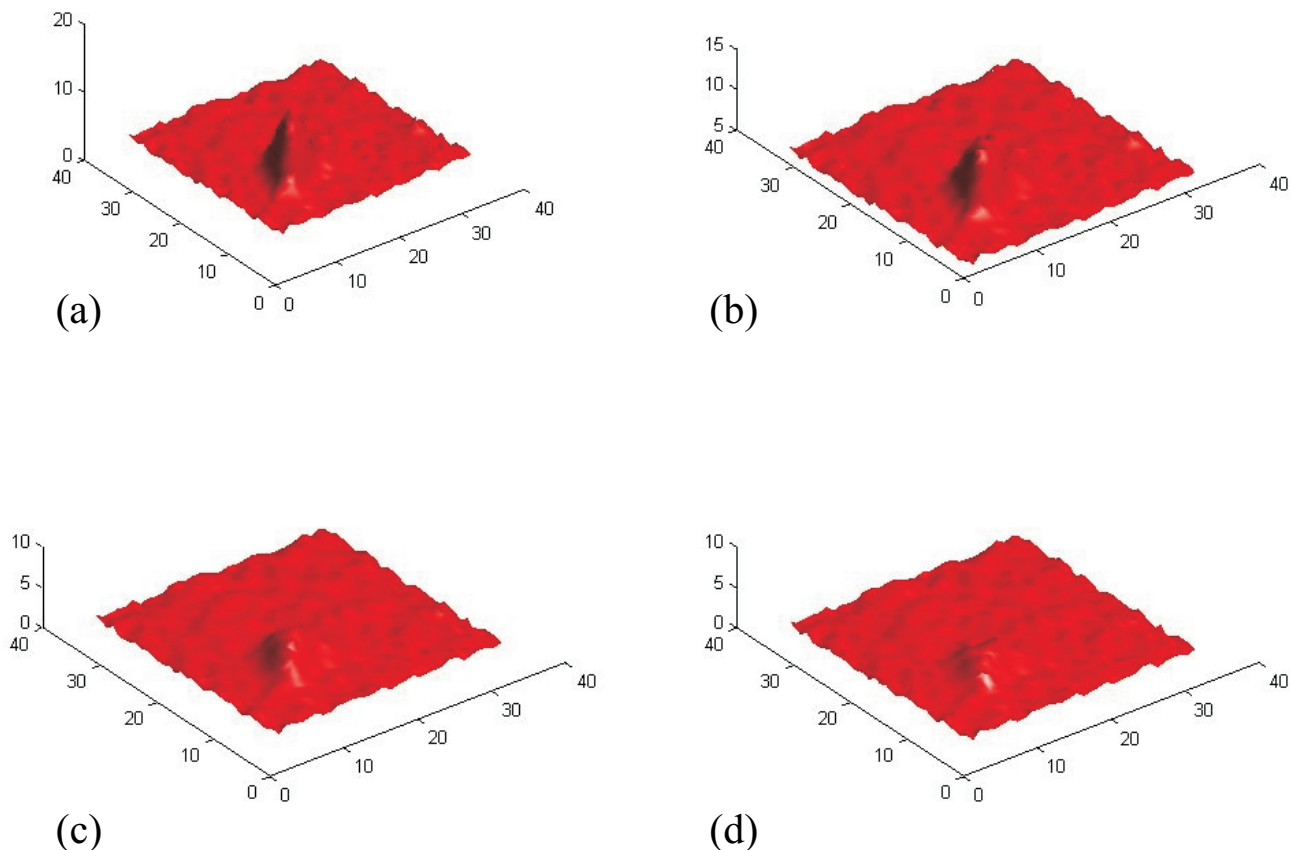


Figura 5.4: Topografia de força constante das curvas de força armazenadas no modo volume de força, enquanto a sonda varre lateralmente uma superfície contendo uma plaqueta humana. As quantidades de força são respectivamente (a) 3.6 nN, (b) 4.8 nN, (c) 6.0 nN e (d) 7.2 nN. Note que a célula é comprimida à medida que a força aumenta. A imagem acima possui uma área de $11 \times 11 \mu\text{m}$.

As forças laterais são eliminadas nos mapas de isoforça obtidos com o modo volume de força. Isso porque a sonda se move para cima e para baixo rapidamente enquanto a amostra é movida lateralmente pelo *scanner* de forma bem lenta. Assim, entre duas posições adjacentes, a sonda torna-se sempre livre da amostra. Entretanto, é surpreendente que a célula possa suportar quantidades de força tão elevadas durante cada curva de força, o que produz uma considerável compressão de sua superfície.

Levando-se em conta a enorme quantidade de curvas de força tomadas sobre a célula (algumas centenas), esse fato se torna mais surpreendente ainda.

A Fig. 5.5 mostra diversos cortes ao longo do volume de força, mantendo-se constante a altura em cada um deles. Todas essas figuras correspondem ao percurso de aproximação entre a sonda e a célula.

Mesmo em alturas onde o *cantilever* ainda não toca a amostra, a sonda já é sensibilizada por forças atrativas, o que pode ser percebido associando-se as imagens da Fig. 5.5 às suas respectivas posições sobre a curva de força da Fig. 5.6(b). Esses cortes ao longo de z são úteis na determinação de uma melhor altura entre o *cantilever* e a amostra e, conseqüentemente, dos melhores valores de força aplicados às células.

5.3.3 Quantificação da resposta elástica plaquetária.

Como mostrado na Seção 4.2, para a análise estatística do modulo elástico, foram analisados 5 voluntários livres de qualquer droga que tenha efeito nas plaquetas, tais como antiagregantes plaquetários. De cada voluntário, 5 células foram submetidas as análises com o volume de força, e de cada região delas, foram tomadas duas curvas, para que o cálculo do modulo de Young de cada uma fosse efetuado numericamente com base no modelo de Hertz (Seção 3.3), em um total de 50 medidas para cada região.

O gráfico mostrado na Fig. 5.7 exhibe o valor médio de E para três diferentes regiões da amostra: o pseudonúcleo, região intermediária (*lamellipodium*), e substrato. A barra de erro mostra a imprecisão em cada um dos casos.

O elevado valor de erro observados nesses resultados nas regiões sobre a célula, deve-se ao fato de que as plaquetas assumem morfologias diversas quando se ativam em uma superfície qualquer, fazendo delas células de superfície não uniforme. Para o substrato, apesar de possuir um elevado valor médio de E quando comparado com os valores tomados sobre a plaqueta, apresenta uma rigidez consideravelmente reduzida para os valores conhecidos (o vidro apresenta valores de E aproximadamente iguais a 50 GPa).

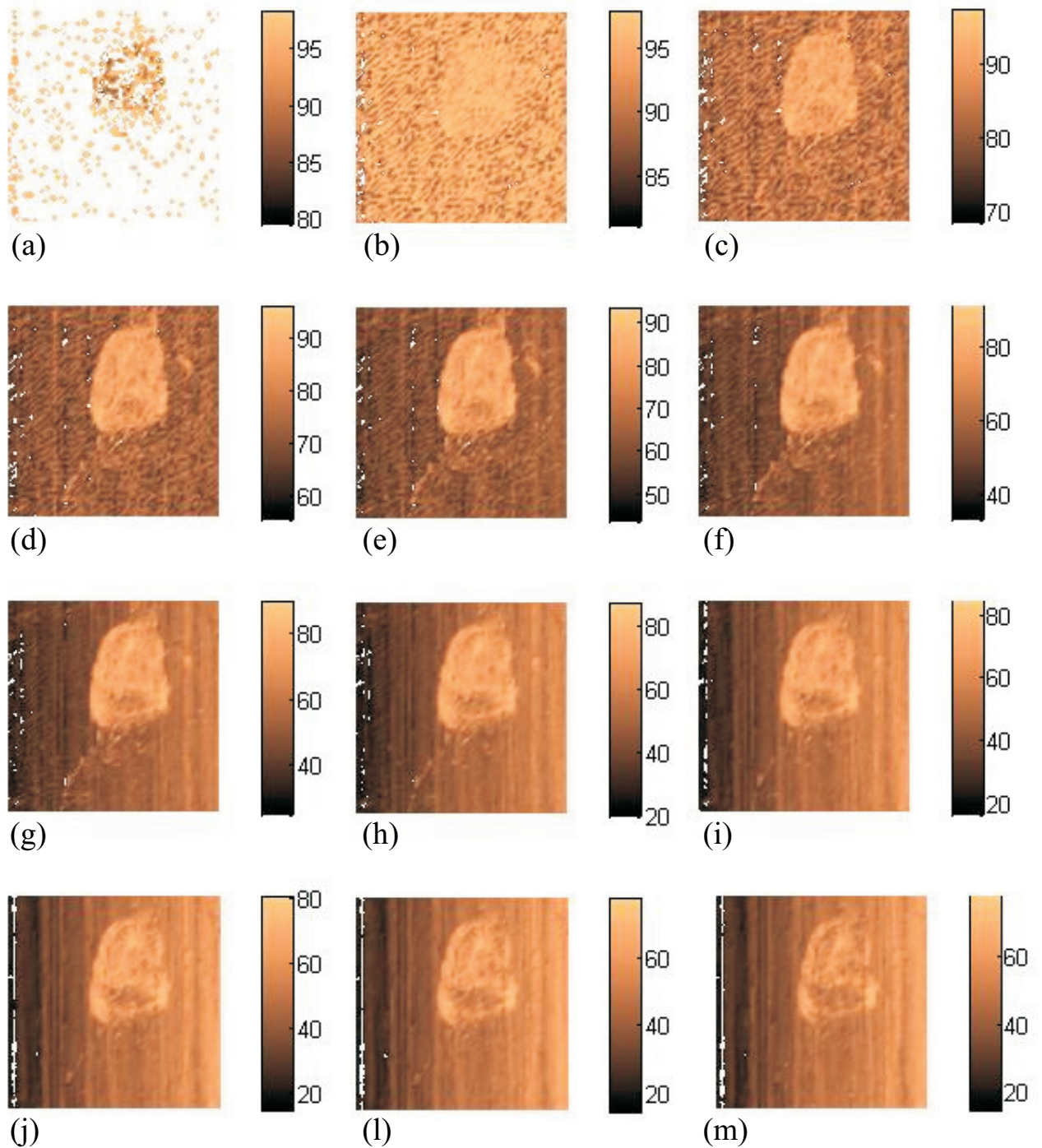


Figura 5.5: (a-m) Cortes horizontais em diferentes alturas obtidos com os dados de volume de força da célula da Fig. 5.6(a). Na Fig. 5.5(a) a sonda está em uma altura muito próxima do substrato e a deflexão do *cantilever* é bastante elevada. A célula está quase que completamente comprimida, comparando-se em deflexão ao substrato. Na Fig. 5.5(m), a sonda encontra-se muito distante da amostra e os valores de deflexão são baixos. Observamos que a plaqueta quase não é percebida pela sonda. A Fig. 5.5(f) apresenta uma altura razoável entre o par sonda-amostra, valor da deflexão mostrado é moderada e a plaqueta pode ser claramente percebida, sem danos visíveis à sua estrutura.

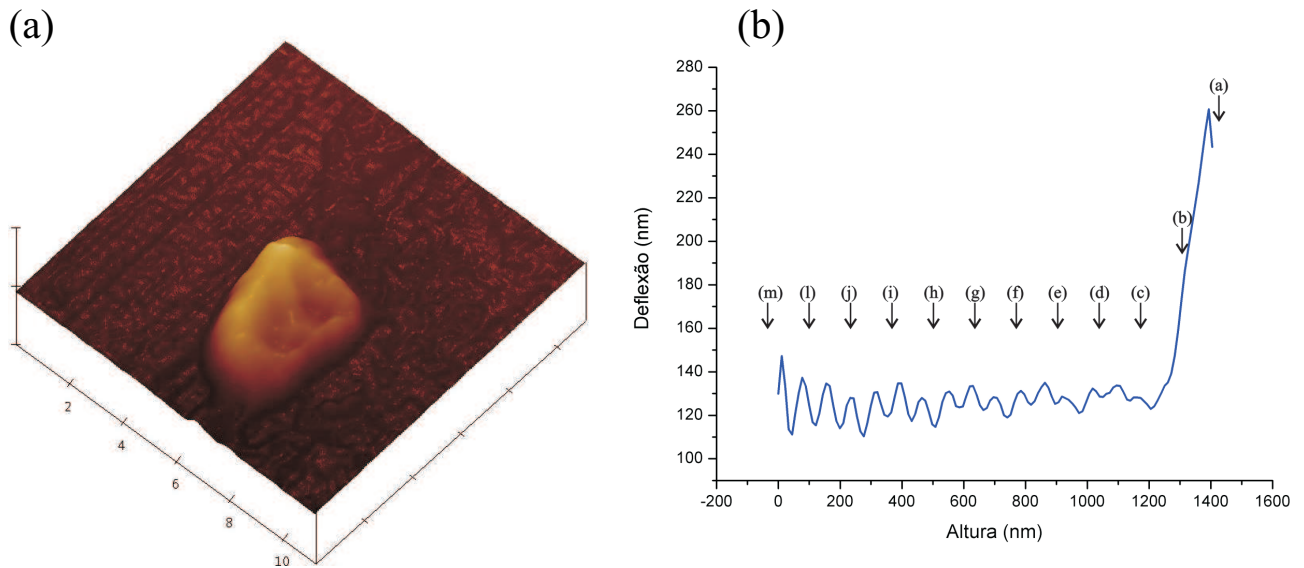


Figura 5.6: (a) Imagem tridimensional da plaqueta da qual os cortes horizontais foram obtidos; (b) curva de aproximação entre o *cantilever* e a amostra para a mesma plaqueta. Os pontos *a-m* indicam as alturas das quais os cortes do volume de força mostrados na Fig. 5.5 foram obtidos.

Isso sugere a presença de um filme de plasma sanguíneo ou restos de materiais orgânicos decorrentes da preparação da amostra, que formam camadas de diferentes espessuras, decorrendo na grande variação de E observada também nas medidas tomadas sobre o substrato.

Mesmo com esses fatores, o gráfico mostra a existência de uma grande diferença entre a elasticidade obtida no granulômero quando comparada com as demais.

O mesmo foi feito para o valor médio da força aplicada à cada região (Fig. 5.8). Como esperado, a força aplicada pelo *cantilever* no pseudonúcleo, *filopodium* e substrato obedecem uma ordem crescente. Um fato que se evidencia com este resultado é a precisão da quantidade de força aplicada pela sonda AFM na amostra (da ordem de pN).

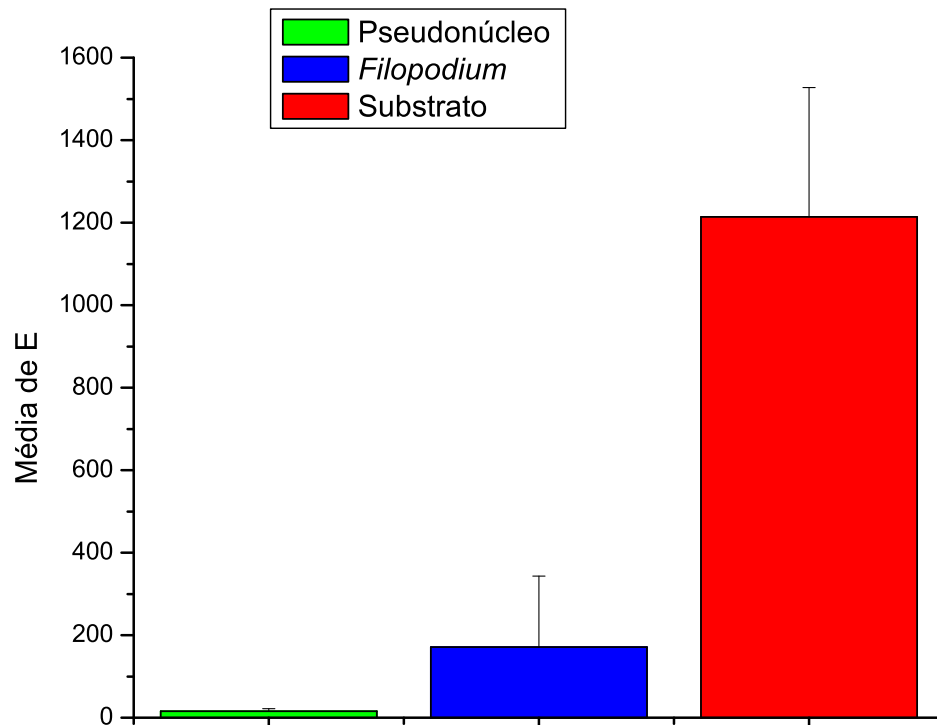


Figura 5.7: O grafico mostra os valores médios de E para para o pseudonúcleo (15.61 kPa), para uma região intermediaria da célula (171.35 kPa) e para o substrato (1213.85 kPa). O valor elevado de erro para E obtido sobre a célula se deve a morfologia variada da mesma.

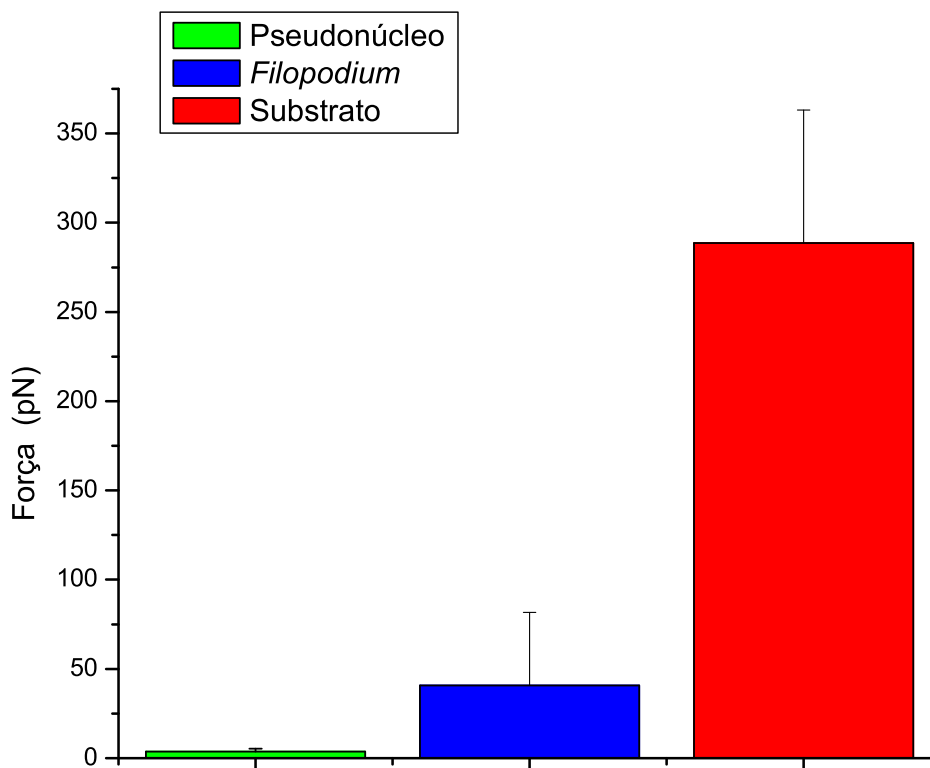


Figura 5.8: O gráfico mostra os valores médios para a força aplicada sobre o pseudonúcleo (3.71pN), sobre uma região intermediária (40.74pN) e sobre o substrato (288.60pN)

Uma das principais dificuldades em se extrair o valor do módulo de Young a partir das curvas de força obtidas das plaquetas humanas em meio líquido se deve a grande quantidade de ruído presente, causado por fatores externos que produzem vibrações nesse líquido em que a medida está sendo realizada, e conseqüentemente, causa uma oscilação espúria no *cantilever*. Isso dificulta a convergência do modelo, uma vez que o mesmo reconhece estas regiões de ruído como uma mudança de regime na curva (da região de não contato para a região de contato), resultando num valor equivocado de E , mesmo que o ajuste para d_0 tenha sido feito, ou seja, que a média da deflexão nos 100 primeiros nanômetros da curva tenha sido excluída.

Este fato dificultou bastante a obtenção do módulo de elasticidade E , pois cada curva de força teve que ser analisada individualmente, impossibilitando a automatiza-

ção do modelo para que todas as curvas fossem trabalhadas de uma só vez.

Esses fatores motivaram a possibilidade de implementação de um ajuste nas curvas, com o objetivo de eliminar tais ruídos.

Três tipos diferentes de ajustes foram considerados: um ajuste Gaussiano (que aproxima a curva a uma gaussiana), um Lorentziano (que aproxima a curva a uma lorentziana), e por fim, um ajuste polinomial de 5^a ordem.

Como pode ser observado na Fig. 5.9, os três ajustes eliminam completamente qualquer ruído nas curvas de força, porém, produzem valores de E distintos para um mesmo intervalo de deflexão. Na mesma figura observamos que o ajuste Gaussiano se mostra mais aproximado da curva experimental.

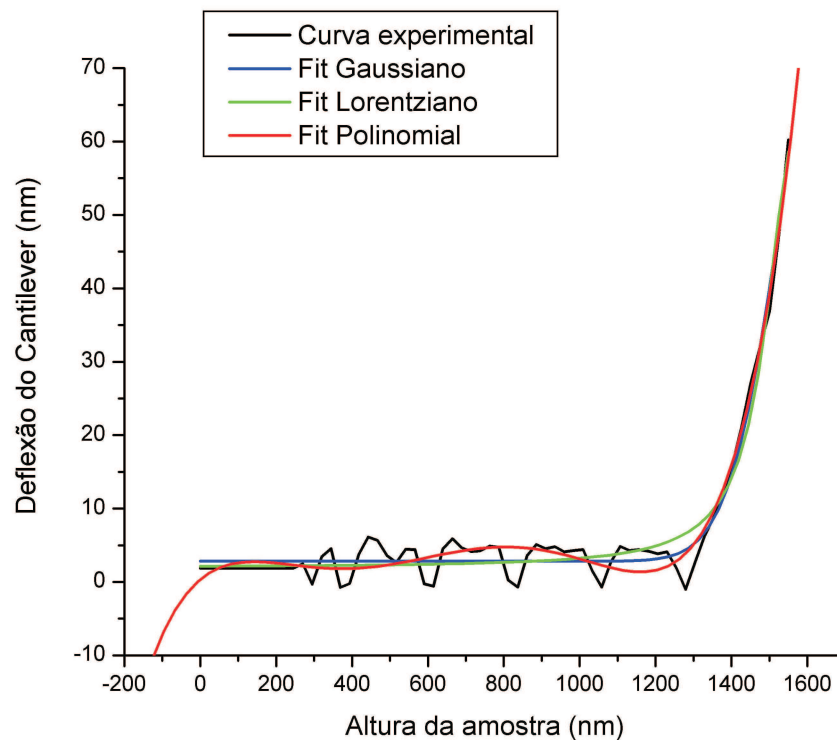


Figura 5.9: Curva experimental (preto) e curvas obtidas com os ajustes Gaussiano (azul), Lorentziano (verde) e o polinomial (vermelhos). Os valores de E obtidos para cada uma das curvas em um mesmo intervalo de deflexão foram 50.1kPa, 50.1 kPa, 46kPa e 0.4kPa, respectivamente.

Esse fato pode ser comprovado observando na Tabela 5.1 que reúne os valores do

modulo de elasticidade (E) e dos pontos iniciais de contato (z_0) para cada um das curvas resultantes dos ajustes empregados. Evidencia-se que o ajuste mais fiel é o Gaussiano.

Tabela 5.1: Valores de E e z_0 para cada uma das curvas ajustadas. Observamos aqui que o ajuste Gaussiano apresenta valores mais aproximados.

TABELA 5.1		
	Valor de E	Valor de z_0
Experimental	50.1 kPa	1230.254 nm
Ajuste Gaussiano	50.1 kPa	1233.504 nm
Ajuste Lorentziano	0.4 kPa	158.779 nm
Ajuste Polinomial	46 kPa	1227.504 nm

Os resultados obtidos neste capítulo fornecem informações quantitativas e qualitativas a respeito da elasticidade de plaquetas sadias. Serão úteis como experimentos controle para estudos comparativos em células doentes, bem como naquelas que foram submetidas ao efeito de algum medicamento que altere as suas funções.

6

Conclusões e Perspectivas

O AFM tem se mostrado uma técnica revolucionária na obtenção de imagens de alta resolução em meio fisiológico, o que permite a manutenção das propriedades de amostras biológicas, no nosso caso, plaquetas humanas sadias.

Nesse trabalho, nós demonstramos que o uso de medidas de força associadas com imagens de alta resolução espacial podem revelar muito a respeito das propriedades elásticas e mecânicas da superfície das plaquetas. A partir das imagens de alta resolução, além de conseguirmos diferenciar as diversas regiões que compõem a célula, tais como *filopodia*, *lamellipodia* e pseudonúcleo, observamos a presença de micropartículas no substrato, próximas à periferia da célula, que são secretadas por ela durante a sua ativação. Também, podem ser visualizados poros sobre a membrana plaquetária que podem ser os canais de secreção dos grânulos de ativação.

A partir das curvas de força obtidas por meio do comando *Force Plot* do AFM, calculamos numericamente o módulo elástico, ou módulo de Young (E) para uma região do substrato coberto de proteínas, uma região mais lisa da célula denominada *lamellipodium*, e finalmente uma região mais alta, onde a concentração de grânulos é maior, conhecida como pseudonúcleo.

Observamos que os valores de E decrescem na ordem de regiões acima citada. Os módulos elásticos variam de 1-100 kPa sobre a superfície da célula, dependendo da posição calculada. O modelo numérico desenvolvido para calcular os valores do módulo de Young tem como base a teoria Hertziana, que considera a geometria do

indentador como sendo cônica para uma melhor aproximação da ponteira AFM. A equação utilizada para esse cálculo [Eq. (2.6)] também fornece a força com que a sonda indenta a membrana da plaqueta além de ser capaz de mensurar a profundidade dessa indentação.

Com relação às forças de adesão entre a sonda AFM e a superfície da plaqueta, nenhuma adesão considerável foi observada entre elas. Uma adesão considerável com a superfície significaria uma sobreposição das forças intermoleculares de atração sobre as forças repulsivas entre a sonda e as glicoproteínas e polissacarídeos existentes sobre a membrana. As forças atrativas são basicamente geradas pela predominância das interações eletrostáticas em relação às condições de Ph e de força iônica do meio fisiológico utilizado. Observamos então, que as forças eletrostáticas são maiores que as de repulsão, uma vez que nenhuma adesão significativa foi verificada.

A partir da coincidência entre as curvas de aproximação e retração, podemos de pronto afirmar o caráter elástico da membrana das células estudadas, sugerindo que apesar da deformação, as células são capazes de retomar sua forma original. A separação que eventualmente é observada entre estas curvas é ocasionada pela resistência hidrodinâmica a qual o *cantilever* é submetido nas medidas em fluido, principalmente, sob altas taxas de varredura.

As imagens de modulação de força mostraram dados qualitativos relevantes a respeito da elasticidade em uma determinada área de varredura contendo uma plaqueta. Revelaram a presença de um filme macio, que pode ser composto de proteínas provenientes do plasma sanguíneo, cobrindo o substrato no qual as plaquetas estão aderidas. Esse fato pode ser devido à preparação da amostra, pois nela utilizamos o sangue total. Uma vez que colocamos a gota de sangue total sobre a lamínula de vidro, tanto as plaquetas quando as proteínas do plasma se aderem fortemente. Então, quando realizamos a lavagem da lamínula em solução tampão, removemos as demais células do sangue, porém, as plaquetas e algumas proteínas provenientes do plasma se aderem fortemente, permanecendo fixas mesmo após a lavagem. Outra contribuição desse tipo de imagem é a observação de cristais de solução tampão que não se dissolveram completamente.

Sua presença é de difícil observação nas imagens de altura, podendo ser facilmente confundidos com a superfície da própria célula. Contudo, quando realizamos imagens de elasticidade com o método de modulação de força, a dureza desses cristais diverge da maciez da superfície da célula, o que os torna facilmente identificável com este tipo de varredura.

A utilização de uma técnica avançada de AFM, chamada volume de força (*Force Volume*), permitiu a obtenção de centenas de curvas de força igualmente distribuídas sobre a área de varredura selecionada, possibilitando um mapeamento de diversas características dessa área. Por meio do volume de força, obtiveram-se imagens de altura com uma redução considerável das forças laterais, uma vez que a sonda analisa a amostra ao longo da altura z , não mais a varrendo lateralmente. Isto permite a visualização do comportamento das células sob variados intervalos de força, o que não era possível na habitual imagem de altura. Além disso, a partir de cortes ao longo do eixo z , a quantidade de força atrativa entre a sonda e a plaqueta em função de sua distância foi determinada, permitindo encontrar uma altura ideal, na qual os efeitos destrutivos da sonda sobre a amostra sejam minimizados. A cobertura exterior da superfície da plaqueta é composta basicamente de uma membrana plasmática coberta por receptores de glicoproteínas que são de fundamental importância para disparar o processo de ativação da célula (adesão e ativação). As forças intermoleculares responsáveis pela deflexão do *cantilever* são provenientes basicamente deste glicocálice, rico em polissacarídeos que integram a membrana plasmática. Por isso, quando observamos os cortes no volume de força ao longo do eixo de altura z , mesmo em uma região onde a sonda ainda não toca a amostra, já observamos que a mesma sente a interação das forças intermoleculares com a superfície.

Durante a obtenção de uma imagem AFM da superfície de células vivas, a força aplicada desempenha um importante papel na determinação da informação obtida a partir da visualização dessa superfície. Baixas quantidades de força possuem a vantagem de não danificar a superfície da célula. Em altas cargas de força a superfície da célula é danificada principalmente nas regiões pobres de organelas. Com o objetivo de

analisar o efeito destrutivo da sonda AFM sobre a plaqueta, mapas de isoforça foram gerados para visualizar esse efeito. Por meio deles, observamos o quanto de força uma célula pode suportar. Os resultados obtidos a partir desse estudo se mostraram surpreendentes, pois revelam que a célula pode ser quase que totalmente comprimida, e retomar a sua forma original, suportando cargas de força superiores a 5 nN em uma pequena área de indentação de 100 nm ou até menos.

Aqui existe um desafio: elucidar como realmente uma célula reage a um indentador. A fração da massa de proteínas em um citoplasma pode ser superior a 200 mg/ml, o que corresponde a 20% da massa total da célula. Porém, somente uma parte delas constituem o citoesqueleto, assim como apenas uma pequena quantidade é polimerizada na forma filamentosa [95]. Esse fato é importante, pois a elasticidade de uma célula influencia na polimerização da rede de actina do citoesqueleto, possibilitando assim a extensão e retração dos *filopodia* na célula. Essa grande quantidade de proteína sugere que não somente o citoplasma é deformado, mas também o citoesqueleto. Esses experimentos abrem um novo campo de estudos em biologia celular. Como o citoesqueleto desempenha um papel importante na forma da célula, na sua divisão, adesão e mobilidade, um maior conhecimento a respeito das suas propriedades pode nos conduzir a um aprofundamento do entendimento destes fenômenos celulares.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, muitas perspectivas podem ser idealizadas, dentre as quais uma das principais é o estudo comparativo entre propriedades físicas de plaquetas saudáveis, já obtidas neste trabalho, e aquelas de indivíduos que possuem alguma anomalia em suas funções plaquetárias, além de indivíduos sujeitos aos efeitos de fármacos que alteram o bom funcionamento das plaquetas, como por exemplo, a aspirina. A análise dos efeitos de drogas quimioterápicas, conhecidas por degradar a rede de actina do citoesqueleto em várias outras células, também se coloca como oportunidade promissora.

Outro trabalho futuro é a identificação da contribuição nas propriedades mecânicas da plaqueta devida somente ao glicocálice, assim como a retirada de todas as moléculas e receptores das membranas para a investigação da contribuição da elasticidade

proveniente somente do citoesqueleto. Somando-se a todas estas possibilidades, a verificação da ativação das plaquetas em diferentes substratos é um outro campo de grande interesse.

Observar a morfologia, secreção de grânulos, e a variação das propriedades mecânicas da célula, tendo como substrato diferentes superfícies, pode ser extremamente útil no desenvolvimentos de materiais biocompatíveis para implantes.

A implementação de novos modelos teóricos para extrair a partir do conjunto de curvas de força, obtido com o *Force Volume*, informações sobre as superfícies de células tais como adesão, força de capilaridade (para as medidas em ar), forças de van der Waals, densidade de carga superficial, interação receptor-ligante e elasticidade, se fazem necessárias.

Referências

- [1] *Funcionamento de um microscópio de força atômica*, DCP, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - MCT, Susana I. Zanette, www.cbpf.br/nanos/Apostila/index.html.
- [2] Castilho, C. M. C. de, *Rev. Bras. de Ensino de Física* **25**, 364-373 (2003).
- [3] *Atom Probe Field Ion Microscope*, www.nims.go.jp/apfim/fimdesc.html.
- [4] Knoll and Ruska, *Zeit. f. Phys.* **78**, 318 (1932).
- [5] Bush, H., *Ann. Phys.* **81**, 976 (1926).
- [6] *Transmission electron microscopy*, www.wikipedia.org.
- [7] Unifesp, Laboratório de Neurofisiologia, www.unifesp.br/dfisio/fisoneuro/eletronica.htm.
- [8] *Transmission Electron Microscopy*, www.botany.unimelb.edu.au/botany/em/tem.html.
- [9] Luiz Henrique Monteiro Leal, *Fundamentos de Microscopia*, Ed. UERJ, Rio de Janeiro (2000).
- [10] Ana Maria Maliska, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise, UFSC, www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf.
- [11] Unifesp, Laboratório de Neurofisiologia, *Microscópio Eletrônico de Transmissão*, www.unifesp.br/dfisio/fisoneuro/eletronica.htm.
- [12] Binning, G. and Rohrer, H., *Rev. Mod. Phys.* **59**, 615 (1987).

- [13] Fabiano Carvalho Duarte, *Microscópio de Tunelamento com Varredura (STM) e Microscópio de Força Atômica (AFM)*, www.dsif.fee.unicamp.br.
- [14] Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, Ch., *Phys. Rev. Lett.* **56**, 9 (1986).
- [15] *STM Image Gallery*, www.almaden.ibm.com.
- [16] *IEEE Virtual Museum*, www.ieee-virtual-museum.org.
- [17] Prater, C. B., Maivald, P. G., Kjoller, K. J., Heaton, M. G., *Technical Notes Veeco: Probing Nano-scale forces with an Atomic Force Microscope* (1995).
- [18] *Veeco Probes*, www.veecoprobes.com.
- [19] Hoh, J. H., and Hansma, P. K., *Trends Cell Biol.* **2**, 208-213 (1992).
- [20] Hansma, P. K., Cleveland, J. P., Radmacher, M., Walters, D. A., Hillner, P. E., Bezanna, M., Fritz, M., Vie, D. and Hansma, H. G., *Appl. Phys Lett.* **64**, 1738-1740 (1994).
- [21] Bhanu P. Jena and J. K. Heinrich Hörber, Volume **68** *Atomic Force Microscopy in Cell Biology*, Academic Press, An imprint of Elsevier Science, USA (2002).
- [22] Erivelton Façanha da Costa, *Caracterização de Células Vermelhas por Microscopia de Força Atômica*, Dissertação (Mestrado), Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, (2006).
- [23] O'Mara, J. G., *Antonie van Leeuwenhoek Journal* **45**, 161-164 (2004).
- [24] Dessy Nikova, Tobias Lange, Hans Oberleithner, Hermann Schillers, Andreas Ebner, Peter Hinterdorfer, *Applied Scanning Probe Methods III - Characterization*, Ed. Springer, USA (2006).
- [25] Binnig, G., Garcia, N., Rohrer, H., *Phys. Rev. Condens. Matter* **32**, 1336 (1985).
- [26] Drake, B., Prater, C. B., Weisenhorn, A. L., Gould, S. A., Albrecht, T. R., Quate, C. F., Cannell, D. S., Hansma, H. G., Hansma, P. K., *Science* **243**, 1586 (1989).

- [27] Johnston, J. A., Ward, C. L., Kopito, R. R., *J. Cell Biol.* **143**, 1883 (1998).
- [28] Paterson, D. and Nordberg, A., *Prog. Neurobiol* **61**, 75 (2000).
- [29] Jacobson, K., Sheets, E. D., and Simson, R., *Science* **268**, 1441-1442 (1995).
- [30] *A função dos lipídios*, www.ehu.es/biomoleculas/LIP/LIPID2.htm.
- [31] Kasas, S., and Ikai, A., *Biophys. J.* **68**, 1678-1680 (1995).
- [32] Hansma, H. G., and Laney, D. E., *Biophys J.* **70**, 1933-1939 (1996).
- [33] Quist, A. P., Rhee, S. K., Lin, H. and Lal, R., *J. Cell Biol.* **148**, 1063-1074 (2000).
- [34] Walch, M., Ziegler, U., Groscurth, P., *Ultramicroscopy* **82**, 259-267 (2000).
- [35] Elson, E. L., *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 397-430 (1988).
- [36] Evans, E., *Methods Enzymol* **173**, 3-35 (1989).
- [37] Felder, S., and Elson, E. L., *J. Cell. Biol.* **111**, 2513-2526 (1990).
- [38] Hildebrand, J. A., and Rugar, D., *J. Microsc.* **134**, 245-260 (1984).
- [39] Ashkin, A., and Dziedzic, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 7914-7918 (1989).
- [40] Bausch, A., Möller, W., and Sackmann, E., *Biophys. J.* **76**, 573-579 (1999).
- [41] Hansma, H. G., Bazanilla, M., Zenhausern, F., Adrian, M., and Sinsheimer, R. L., *Nucl. Acids Res.* **21**, 505-512 (1993)
- [42] Veeco, *Guidelines for Fluid Operation with a MultiMode AFM*, Support Note No. **290**, Rev. C (2001).
- [43] Putman C. A., van der Werf, K. O., de Groot, B. G., van Hulst, N. F., Greve, J., and Hansma, P. K., *SPIE Scanning Probe Microsc.* **1693**, 198-204 (1992).

- [44] Marco Antonio Zago, Roberto Passeto Falcão, Ricardo Pasquini, *Hematologia: Fundamentos e Prática*, São Paulo, Ed. Atheneu (2001).
- [45] Dai, J., Sheetz, M.P., *Methods Cell Biol.* **55**, 157-171 (1998).
- [46] Ruoslahti, E., *Science* **276**, 1345-1346 (1997).
- [47] Hartwig, J. H., *J. Cell Biol.* **118**, 1421-1442 (1992).
- [48] Loftus, J. C., Choate, J., Albrecht, R. M., *J. Cell Biol.* **98**, 2019-2025 (1984).
- [49] Veeco, *Force Imaging*, Support Note No. **228**, Rev. E (1999).
- [50] Jacob Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London (1991).
- [51] Morris, V. J., Kirby, A. R., Gunning, A. P., *Atomic Force Microscopy for Biologists* Imperial College Press, London (1999).
- [52] Maivald, P., Butt, H. J., Gould, S. A. C., Prater, C. B., Drake, B., Gurley, J. A., Elings, V. B., and Hansma P. K., *Nanotechnology* **2**, 103 (1991).
- [53] Veeco, *Force Modulation Imaging with Atomic Force Microscopy*, www.veeco.com/pdfs.php/1.
- [54] Veeco, *Force Imaging*, Support Note No. **228**, Rev. E (1999).
- [55] William, F., Heinz, Emad A-Hassn, Jan, H. H., Dept. of Physiology, Johns Hopkins University School of Medicine, AN20, Rev A1 (2004).
- [56] Rotsch, C. and Radmacher, M., *Biophys. J.* **78**, 520-535 (2000).
- [57] Radmacher, M., *IEEE Eng. Med. Biol.* **16**, 47-57 (1997).
- [58] A-Hassan, E., Heinz, W. F., Antonik, M. D., Da Costa, N. P., Nageswaran, S., Schoenenberger, C. A., and Hoh, J. H., *Biophys. J.* **74**, 1564-1578 (1998).
- [59] Cappella, B. and Dietler, G., *Surf. Sci. Rep.* **34**, 1-104 (1999).

- [60] Thomas, R. C., Houston, J. E., Crooks, R. M., Kim, T., and Michalske, T. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3830 (1995).
- [61] Sader, J. E., *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 4583 (1995).
- [62] Senden, T. J., and Ducker, W. A., *Langmuir* **10**, 1003 (1994).
- [63] Sader, J. E., Larson, I., Mulvaney, P. and White, L. R., *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 3789 (1995).
- [64] Hutter, J. L., and Bechhoefer, J., *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 1868 (1993).
- [65] Costa, K. D., and Yin, F. C. P., *J. Biomech. Eng.* **121**, 462-471 (1999).
- [66] Hertz, H. J., *Reine Angew. Math.* **92**, 156 (1881).
- [67] Mahaffy, R. E., Park, S., Gerde, E., Kas, J., and Shih, C. K., *Biophys. J.*, **86**, 1777-1793 (2004).
- [68] Radmacher, M., Fritz, M., Cleveland, J. P., Walters, D. A., and Hansma, P. K., *Langmuir* **10**, 3809-3814 (1994).
- [69] Ikai, A., Mitsui, K., Tokouka, H., and Xu, X. M., *Mater. Sci. Eng. C* **4** 233-240 (1997).
- [70] Simon, A., Cohen-Bouhacina, T., Aime, J. P., Porte, M. C., Amedee, J., and Baquey, C., *Cell. Mol. Biol.* **50**, 255-266 (2004).
- [71] Shroff, S. G., Saner, D. R., and Lal, R., *Am. J. Physiol.* **269**, 286-292 (1995).
- [72] Frisbie, C. D., Rozsnyai, L. F., Noy, A., Wrighton, M. S., and Lieber, C. M., *Science* **265**, 2071 (1994).
- [73] Hinterdorfer, P., Schilcher, K., Baumgartner, W., Gruber, H. J., and Schindler, H., *Nanobiology* **4**, 39-50 (1998).
- [74] Grandbois, M., Beyer, M., Rief, M., Clausen-Schaumann, H., and Gaub, H. E., *Science* **283**, 1727-1730 (1999).

- [75] Wong, S. S., Joselevich, E., Woolley, A. T., Cheung, C. L., and Liber, C. M., *Nature* **394**, 52 (1998).
- [76] Alessandrini, A. and Facci, P., *Meas. Sci. Technol.* **16**, 65-92 (2005).
- [77] Florin, E. L., Moy, V. T., and Gaub, H. E., *Science* **264**, 415-417 (1994).
- [78] Hinterdorfer, P., Gruber, H. J., Schilcher, K., Baumgartner, W., Hasel-gruebler, T., and Schinler, H., *Biophys. J.* **68**, 139 (1995).
- [79] Lehenkari, P. P., and Horton, M. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 645-650 (1999).
- [80] Krautbauer, R., Rief, M., and Gaub, H. E., *Nano Lett.* **3**, 493-496, (2003).
- [81] van der Werf, K. O., Putman, C. A. J., de Groot, B. G., and Greve, J., *Appl. Phys. Lett.* **65**, 1195-1197 (1994).
- [82] Mazzola, L. T., Frank, C. W., Fodor, S. P. A., Mosher, C., Lartius, R., and Henderson, E., *Biophys. J.* **76**, 2922-2933 (1999).
- [83] Rief, M., Oesterhelt, F., Hetmann, B., and Gaub, H. E., *Science* **276**, 1295 (1997).
- [84] Janshoff, A., Neitzert, M., Oberdörfer, Y., and Fuchs, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 3212 (2000).
- [85] Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D., and Smith, S., *Science* **265**, 1599-1600 (1994).
- [86] Odijk, T., *Macromolecules* **28**, 7016-7018 (1995).
- [87] Surface Science & Technology, *Scanning Probe Techniques (AFM) for ex situ and in situ Measurement of Topography, Force-Distance Curves and Friction Forces*, www.surface.mat.ethz.ch.

- [88] Kellermayer, M. S. Z., Smith, S. B., Granzier, H. L., and Bustamante, C., *Science* **276**, 1112 (1997).
- [89] Smith, D. A. and Radford, S. E., *Current Biology* **10**, 662-664 (2000).
- [90] Sneddon, I. N., *Int. J. Eng. Sci.* **3**, 47-57 (1965).
- [91] Treloar, L. R., *The Physics of Rubber Elasticity*, Clarendon Press, Oxford (1975).
- [92] Jeffrey L., Bechhoefer, H. and Bechhoefer, J., *Ver. Sci. Instrum.* **7**, 64 (1993).
- [93] Fritz, M., Radmacher, M., and Gaub, H. E., *Biophys. J.* **66**, 1328-1334 (1994).
- [94] Fritz, M., Radmacher, M., and Gaub, H. E., *Experimental Cell Res.*, **205**, 187-190 (1993).
- [95] Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C. M., Cleveland, J. P., and Hansma, P. K., *Biophys. J.* **70**, 556-567 (1996).
- [96] Siedlecki, C. A., and Marchant, R. E., *Biomaterials* **19**, 441-454 (1998).
- [97] Eppell, S. J., Simmons, S. R., Albrecht, R. M., and Marchant, R. E., *Biophys. J.* **68**, 671-680 (1995).
- [98] Charo, I. F., Kietter, N., Phillips, D. R., in: Colman, R. W., Hirsh, J., Marder, V. J., Salzman, E. W. (Eds.), *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 3a ed., JB Lippincott Com, Philadelphia, pp. 489-507 (1994).
- [99] Lee, I., Marchant, R. E., *Colloids and Surface B: Biointerfaces* **19**, 357-365 (2000).
- [100] Allen, D. A., Zacharski, L. R., Widirstky, S. T., Rosenstein, R., Zaitlin, L. M. and Burgess, D. R., *J. Cell Biol.* **83**, 126-142 (1979).
- [101] Ginsberg, M. H., Taylor, L. and Painter, R. G., *Blood* **55**, 661 (1980).
- [102] Morgenstem, E. and Kho, A., *Eur. J. Cell Biol.* **15**, 233-249 (1977).

-
- [103] Stenberg, P. E., Shuman, M. A., Levine, S. P. and Bainton, D. F., *J. Cell Bio.* **98**, 748-760 (1984).
- [104] White, J. G., *Methods in Haematology*, Series 8. Churchill Livingstone, New York (1983).

A

Tabelas de dados.

As tabelas deste anexo correspondem a todos os valores das variáveis trabalhadas no capítulo 5, mais especificamente na seção 5.3.

Estas tabelas estão organizadas da seguinte maneira:

TABELA A.1 - Valores de módulo de Young (em kPa) calculados a partir das curvas tomadas sobre as plaquetas e no substrato. Esses valores foram utilizados na seção 5.3.3, no gráfico da Fig. 5.7.

TABELA A.2 - Valores da força (em pN) aplicada pela sonda AFM nas mesmas regiões das quais os valores de módulo elástico foram calculados, considerando-se uma indentação de 20nm. Esses valores foram utilizados na seção 5.3.3, no gráfico da Fig. 5.8.

Tabela A.1: Valores de E calculados em kPa sobre diferentes regiões da plaqueta e no substrato.

TABELA A1					
			Pseudonúcleo	<i>Filopodium</i>	Sustrato
Indivíduo 1	Plaqueta 1	Curva 1	21.7	122	1514
		Curva 2	14.8	249	1529
	Plaqueta 2	Curva 1	21.8	215	1513
		Curva 2	26.7	154	582.1
	Plaqueta 3	Curva 1	24.5	73	1255.8
		Curva 2	32.9	67	1533.1
	Plaqueta 4	Curva 1	14.7	151	684.7
		Curva 2	13.7	157	1328.4
	Plaqueta 5	Curva 1	9.4	148	1234.2
		Curva 2	9.6	122	1442.8
Indivíduo 2	Plaqueta 1	Curva 1	11.4	122.7	937.1
		Curva 2	11.6	161.8	1542.1
	Plaqueta 2	Curva 1	17	134.4	1527.8
		Curva 2	17.1	136	1445.9
	Plaqueta 3	Curva 1	11.7	147.4	1263.3
		Curva 2	15.8	257	1278.4
	Plaqueta 4	Curva 1	11.7	162	1256.7
		Curva 2	12.1	121.2	1511.1
	Plaqueta 5	Curva 1	16.6	138	843.3
		Curva 2	13.8	93	843.7
Indivíduo 3	Plaqueta 1	Curva 1	33.5	82	1558.4
		Curva 2	30.5	115.1	633.5
	Plaqueta 2	Curva 1	11.1	115.3	739.2
		Curva 2	16.2	207	1552
	Plaqueta 3	Curva 1	10.1	162.2	1562.7
		Curva 2	10.3	154.3	1216.9
	Plaqueta 4	Curva 1	9.2	132.3	1218.8
		Curva 2	10.7	129	1315.8
	Plaqueta 5	Curva 1	21.6	1333	1293.6
		Curva 2	12.8	210	937.2
Indivíduo 4	Plaqueta 1	Curva 1	12.5	164	923.1
		Curva 2	12.4	167	1211.1
	Plaqueta 2	Curva 1	12.4	94	1303.4
		Curva 2	17.4	98	1427.2
	Plaqueta 3	Curva 1	16.4	132.1	1408.3
		Curva 2	14.3	137.4	632.8
	Plaqueta 4	Curva 1	13.5	203	257.7
		Curva 2	16.1	163.9	1521.9
	Plaqueta 5	Curva 1	9.6	164.3	1221.7
		Curva 2	17.4	162.2	1424.3
Indivíduo 5	Plaqueta 1	Curva 1	7.3	154.3	1266.7
		Curva 2	8.4	163.2	1172.3
	Plaqueta 2	Curva 1	16.9	162.9	1188.6
		Curva 2	32	167.2	1532.2
	Plaqueta 3	Curva 1	10.7	132.4	1234.7
		Curva 2	18.4	142.3	932.9
	Plaqueta 4	Curva 1	15.3	130	887.4
		Curva 2	12.1	132	1216.6
	Plaqueta 5	Curva 1	10.2	123	1302.4
		Curva 2	12.7	203	1532.7

Tabela A.2: Valores de F em pN para as mesmas regiões das quais o E foi calculado..

TABELA A2					
			Pseudonúcleo	<i>Filopodium</i>	Sustrato
Indivíduo 1	Plaqueta 1	Curva 1	5.16	29.0	360.0
		Curva 2	3.52	59.2	363.0
	Plaqueta 2	Curva 1	5.18	51.1	360.0
		Curva 2	6.35	36.6	138.0
	Plaqueta 3	Curva 1	5.82	17.4	299.0
		Curva 2	7.82	15.9	364.0
	Plaqueta 4	Curva 1	3.49	35.9	163.0
		Curva 2	3.26	37.3	316.0
	Plaqueta 5	Curva 1	2.23	35.2	293.0
		Curva 2	2.28	29.0	343.0
Indivíduo 2	Plaqueta 1	Curva 1	2.71	29.2	223.0
		Curva 2	2.76	38.5	367.0
	Plaqueta 2	Curva 1	4.04	32.0	363.0
		Curva 2	4.07	32.3	344.0
	Plaqueta 3	Curva 1	2.78	35.0	300.0
		Curva 2	3.76	61.1	304.0
	Plaqueta 4	Curva 1	2.78	38.5	299.0
		Curva 2	2.88	28.8	359.0
	Plaqueta 5	Curva 1	3.95	32.8	200.0
		Curva 2	3.28	22.1	201.0
Indivíduo 3	Plaqueta 1	Curva 1	7.96	19.5	370.0
		Curva 2	7.25	27.4	151.0
	Plaqueta 2	Curva 1	2.64	27.4	176.0
		Curva 2	3.85	49.2	369.0
	Plaqueta 3	Curva 1	2.40	38.6	372.0
		Curva 2	2.45	36.7	289.0
	Plaqueta 4	Curva 1	2.19	31.5	290.0
		Curva 2	2.54	30.7	313.0
	Plaqueta 5	Curva 1	5.13	31.7	308.0
		Curva 2	3.04	49.9	223.0
Indivíduo 4	Plaqueta 1	Curva 1	2.97	39.0	219.0
		Curva 2	2.95	39.7	288.0
	Plaqueta 2	Curva 1	2.95	22.3	310.0
		Curva 2	4.14	23.3	339.0
	Plaqueta 3	Curva 1	3.90	31.4	335.0
		Curva 2	3.40	32.7	150.0
	Plaqueta 4	Curva 1	3.21	48.3	613.0
		Curva 2	3.83	39.0	362.0
	Plaqueta 5	Curva 1	2.28	39.1	290.0
		Curva 2	4.14	38.6	339.0
Indivíduo 5	Plaqueta 1	Curva 1	1.74	36.7	301.0
		Curva 2	2.00	38.8	279.0
	Plaqueta 2	Curva 1	4.02	38.7	283.0
		Curva 2	7.61	39.7	364.0
	Plaqueta 3	Curva 1	2.54	31.5	294.0
		Curva 2	4.37	33.8	222.0
	Plaqueta 4	Curva 1	3.64	30.9	211.0
		Curva 2	2.88	31.4	289.0
	Plaqueta 5	Curva 1	2.42	29.2	310.0
		Curva 2	3.02	48.3	364.0

B

Premiações e Apresentações em Conferências.

Prêmios:

Prêmio: **Dr. Luis Henrique Monteiro Leal**, conferido pela Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise (SBMM) pelo trabalho "*IMAGING AND ELASTIC PROPERTIES STUDY OF HUMAN PLATELETS USING THE ATOMIC FORCE MICROSCOPE*", apresentado no Simpósio de Microscopia na Amazônia (Belém-PA) em Setembro de 2006.

Foram apresentados os seguintes trabalhos em conferências nacionais:

- **Congresso Nacional de Matemática Aplicada e Computacional - XXX CNMAC . 2006, Campinas - SP.**

Título: *CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES ELÁSTICAS DE PLAQUETAS HUMANAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.*

Autores: Rebêlo, Luciana. M.; Baroni, Mariana Pelissari Monteiro Aguiar; Freire, José Alexander de King; Magalhães, Silvia Meira Maria; Costa, Erivelton Façanha da; Rosa, Reinaldo Roberto.

- **Simpósio de Microscopia na Amazônia, Belém-PA, 2006.**

Título: *IMAGING AND ELASTIC PROPERTIES STUDY OF HUMAN PLATELETS USING THE ATOMIC FORCE MICROSCOPE.*

Autores: Rebêlo, L. M.; Costa, Erivelton Façanha da; Oliveira, Marcelo Roseo; Baroni, Mariana Pelissari Monteiro Aguiar; Rosa, Reinaldo Roberto; Freire, José Alexander de King; Magalhães, Silvia Meira Maria.

● **XXIV Encontro de Físicos do Norte e Nordeste, 2006**

Título: *CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE PLAQUETAS HUMANAS POR MEIO DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.*

Autores: Rebêlo, L. M.; Costa, Erivelton Façanha da; Oliveira, Marcelo Roseo; Baroni, Mariana Pelissari Monteiro Aguiar; Rosa, Reinaldo Roberto; Freire, José Alexander de King; Magalhães, Silvia Meira Maria.

C

Aprovação do Comitê de Ética

Documento comprovando a aprovação do comitê de ética e pesquisa para o trabalho desenvolvido com material humano.



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 521/03

Fortaleza, 19 de dezembro de 2003

Protocolo COMEPE nº 229/03

Pesquisador responsável: Sílvia Maria Meira Magalhães

Dep^o./Serviço: Departamento de Patologia e Medicina Legal/UFC

Título do Projeto: "Caracterização do perfil eritrocitário em indivíduos saudáveis e portadores de síndrome mielodisplásica através de microscopia de força atômica"

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 18 de dezembro de 2003.

Atenciosamente,

Dra. Miriam Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UWCUFC