



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

AFONSO LUIZ DANTAS MOURA

VISCOELASTICIDADE DE CÉLULAS EM SUBSTRATOS MACIOS

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M884v Moura, Afonso Luiz Dantas.

Viscoelasticidade de células em substratos macios / Afonso Luiz Dantas Moura. – 2022.
74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Física, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa.

Coorientação: Profa. Dra. Rosemayre Souza Freire.

1. Microscopia de força atômica. 2. Microscopia Confocal. 3. Redes de F-actina. 4. Viscoelasticidade. 5. Morfologia celular. I. Título.

CDD 530

AFONSO LUIZ DANTAS MOURA

VISCOELASTICIDADE DE CÉLULAS EM SUBSTRATOS MACIOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Física. Área de Concentração: Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa.

Coorientadora: Dra. Rosemayre Souza Freire.

FORTALEZA

2022

AFONSO LUIZ DANTAS MOURA

VISCOELASTICIDADE DE CÉLULAS EM SUBSTRATOS MACIOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Física. Área de Concentração: Física da Matéria Condensada.

Aprovada em 21/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Adriano Mesquita Alencar
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Claudio Lucas Nunes de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rosemayre Souza Freire
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família, à minha namorada
e aos meus dois gatos.

AGRADECIMENTOS

Começando com os agradecimentos obrigatórios né (mas ainda sinceros), gostaria de agradecer à Universidade Federal do Ceará por disponibilizar o ensino e a infraestrutura que possibilitou, não só a confecção deste trabalho, como a formação do cientista que sou hoje. Gostaria também de agradecer à FUNCAP pelo fomento da pesquisa... mais especificamente pela minha bolsa.

Agora aos agradecimentos semi-obrigatórios, para as pessoas ótimas que me ajudaram nesse trabalho, de forma direta ou indireta, e que se sua ausência impossibilitaria o término desta dissertação (provavelmente). Gostaria de agradecer aos meus professores orientadores, Prof. Jeanlex de Sousa e Dra. Rosemayre Freire pelos ensinamentos e pela paciência, principalmente nestes últimos meses, vocês me ensinaram muito mais do que pensam, e serei eternamente grato por isso. Gostaria também de agradecer por me incluir em seu grupo de pesquisa, o Laboratório de Física Biológica. Gostaria também de agradecer aos meus outros professores que conheci nas cadeiras do programa do mestrado, mal posso esperar para vê-los novamente no doutorado.

Seguindo agradecimentos semi-obrigatórios, gostaria de agradecer à minha família, minha irmã Isabel, minha mãe Carmen e meu pai Jean (e meus dois gatinhos Leozito e Papolinho) pelo apoio, carinho e, novamente, paciência (principalmente nestes últimos 26 anos). Vocês proporcionaram, e ainda proporcionam a segurança que eu preciso para seguir minha carreira dentro desse terrível cenário político, e mesmo sabendo que vocês não entendem muito de física, sei que estão na minha torcida mais querida.

Outra pessoa que não posso deixar de agradecer é a minha linda namorada Larissa Dornelles que em tudo me ajuda e que tornou estes últimos anos de pandemia não só suportáveis como incríveis. Obrigado por estar na minha vida durante estes últimos anos, mal posso esperar pelos próximos. Linda.

Agora finalmente, os agradecimentos casuais, reservado praqueles que me amam e apoiam nas minhas decisões mas não se ligam 100% no que eu faço. Gostaria de agradecer a

todos meus amigos que me proporcionaram momentos de descontração durante esses últimos dois anos, e obrigado por se manterem presentes mesmo durante meus piores momentos (se eu nomear um vou ter que nomear todos... vocês sabem quem são ((se você está lendo isso, provavelmente é um deles))), espero contar com vocês nesses próximos anos que provavelmente serão mais difíceis.

“Na dúvida, refaça.”(MOURA, 2017, p. 1)”

RESUMO

O estudo de células em substratos macios é importante pois estes imitam as condições naturais de células *in vivo*, possibilitando análises em células com total controle do seu ambiente. Já se sabe que células reagem à rigidez do substrato que se encontram, mas não existe um consenso sobre o funcionamento de seus mecanismos internos. O objetivo deste trabalho é analisar como fibroblastos (linhagem L929) tem sua biomecânica alterada de acordo com a dureza do substrato onde estão depositados, visando entender como a rigidez do substrato afeta sua morfologia e sua reologia, com a medição de seus parâmetros viscoelásticos por Microscopia de Força Atômica, e pela determinação quantificada de sua morfologia por Microscopia Confocal de Fluorescência. As propriedades mecânicas de células individuais são obtidas nos domínios do tempo e de frequência (entre 1 Hz até 1kHz), e as propriedades morfológicas são obtidas pelo cálculo da dimensão fractal da rede de actina filamentosa presente no esqueleto celular. Os substratos macios são hidrogéis de poliacrilamida cuja dureza pode ser controlada de acordo com a concentração do agente reticular utilizada em sua fabricação (0,01%, 0,1%, e 1%). Os resultados de microscopia de força atômica mostram aumento na rigidez celular correlacionada com o decréscimo da rigidez do substrato, e os parâmetros viscoelásticos revelam que a relaxação celular segue um modelo de dupla lei de potência, na qual observa-se um regime de rápida relaxação viscoelástica em tempos muito curtos (abaixo de dezenas de milissegundos), e um regime de relaxação lenta em longos tempos de observação (centenas de milissegundos até dezenas de segundos). Os dados de microscopia confocal revelaram um aumento na dimensão fractal das imagens do citoesqueleto de actina com o aumento da dureza do substrato, que pode ser visualmente correlacionado com o crescimento de longas fibras de actina pelo corpo celular.

Palavras-chave: microscopia de força atômica; microscopia confocal; redes de F-actina; viscoelasticidade; morfologia celular.

ABSTRACT

The study of cells on soft substrates is relevant because they mimic the natural conditions of *in vivo* cells, allowing analyzes in cells with full control of their environment. It is already known that cells react to the stiffness of their underlying substrate, but there is no consensus on the functioning of their internal mechanisms. The objective of this work is to analyze how fibroblasts (lineage L929) have their biomechanics altered according to the stiffness of the substrate they are in, in order to understand how the stiffness of the substrate affects internal mechanisms of viscoelastic relaxation and its morphology, with the measurement of its viscoelastic parameters by Atomic Force Microscopy, and by the quantified determination of their morphology by Confocal Fluorescence Microscopy. The mechanical properties of individual cells are obtained in the time and frequency domains (between 1 Hz to 1 kHz), and the morphological properties are obtained by calculating the fractal dimension of the filamentous actin network present in the cell skeleton. Soft substrates are polyacrylamide hydrogels whose stiffness can be controlled according to the concentration of the crosslinking agent used in their fabrication (0.01%, 0.1%, and 1%). Atomic force microscopy results show an increase in cellular stiffness correlated with a decrease in substrate stiffness, and the viscoelastic parameters reveal that the cellular relaxation follows a double power law model, in which a regime of rapid viscoelastic relaxation is observed in very short times (below tens of milliseconds), and a slow relaxation regime in long observation times (hundreds of milliseconds to tens of seconds). Confocal microscopy data revealed an increase in the fractal dimension of the cytoskeleton images with increasing substrate stiffness, which could be visually correlated with the growth of long actin fibers through the cell body.

Keywords: atomic Force Microscopy; confocal microscopy; f-actin networks; viscoelasticity; cellular morphology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de fluorescência do citoesqueleto celular.	18
Figura 2 – Organização da f-actina em relação à dureza do substrato.	20
Figura 3 – Definições de stress normal e de cisalhamento	22
Figura 4 – Elementos viscoelásticos usados em modelos reológicos.	23
Figura 5 – Modelo reológico de Kelvin-Voigt.	24
Figura 6 – Modelos viscoelásticos fracionários	28
Figura 7 – Esquema simplificado do microscope stage de um AFM.	30
Figura 8 – Esquema do caminho óptico de um transdutor de força utilizado em AFMs.	31
Figura 9 – Exemplos de curvas de força obtidas no AFM.	32
Figura 10 – Esquema simplificado da fluorescência.	39
Figura 11 – Potencial tipo poço infinito.	40
Figura 12 – Moléculas de comprimentos diferentes e seus comprimentos de onda de excitação.	41
Figura 13 – Ilustração das transições eletrônicas para emissão de fluorescência.	42
Figura 14 – Representação da defasagem de Stokes	43
Figura 15 – Esquema simplificado do princípio usado em microscópios confocais.	44
Figura 16 – Esquema simplificado do caminho óptico de microscópios confocais de varredura.	44
Figura 17 – Exemplo de gráfico obtido em análise de dimensão fractal.	46
Figura 18 – Foto do microscópio MPF3D-BIO	48
Figura 19 – Arranjo experimental da ponta de AFM sobre as células durante as medidas de força.	49
Figura 20 – Curva de força do tipo DFC+FS típica medida em fibroblastos.	49
Figura 21 – Imagens fluorescentes dos fibroblastos L929 cultivados em vidro.	50
Figura 22 – Microscópio confocal Zeiss LSM 710.	50
Figura 23 – Diagrama esquemático das medidas de AFM em células cultivadas sobre substratos macios.	51
Figura 24 – Estratégia de análise das curvas de forças medidas nas células.	52
Figura 25 – Curvas de força medidas em fibroblastos L929 cultivados sobre substratos com durezas diferentes.	53
Figura 26 – Análise puramente elástica das curvas de força em células sobre diferentes substratos.	54

Figura 27 –Comparação da indentação de células em substrato rígido e macio usando um indentador esférico por microscopia confocal.	55
Figura 28 –Análise elástica das curvas de força sobre os géis com diferentes durezas.	55
Figura 29 –Estimativa das constantes de mola das células cultivadas em diferentes substratos.	56
Figura 30 –Curva DFC+FS ajustada com o modelo viscoelástico de dupla lei de potência.	57
Figura 31 –Curvas de relaxação aparente $R_{app}(t)$ obtidas da porção de aproximação das curvas de força da Figura 25.	58
Figura 32 –Parâmetros viscoelásticos de fibroblastos L929 cultivados em diferentes substratos obtidos pela análise temporal das curvas de força.	59
Figura 33 –Distribuição dos ângulos de fase e da viscosidade interna de fibroblastos cultivados sobre diferentes substratos.	61
Figura 34 –Módulo de cisalhamento dinâmico de fibroblastos cultivados em diferentes substratos.	63
Figura 35 –Comparação da reologia dinâmica de células em diferentes substratos.	64
Figura 36 –Rede de actina de fibroblastos L929 em substratos de durezas diferentes.	65
Figura 37 –Dimensão fractal do citoesqueleto de de f-actina de células cultivadas em diferentes substratos.	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	TEORIA	18
2.1	Citoesqueleto	18
2.2	Teoria básica de deformação dos sólidos	21
2.2.1	<i>Elasticidade e Viscosidade</i>	21
2.2.2	<i>Viscoelasticidade linear</i>	23
2.2.2.1	<i>Modelo de Kelvin-Voigt</i>	24
2.2.2.2	<i>Modelo de Maxwell</i>	25
2.2.3	<i>Parâmetros dinâmicos Viscoelásticos</i>	26
2.2.3.1	<i>Cálculo fracionário</i>	27
2.3	Microscopia de Força Atômica	28
2.3.1	<i>Microscope Stage</i>	29
2.3.2	<i>Transdutor eletrônico</i>	30
2.3.3	<i>Computador</i>	31
2.3.4	<i>Análise de curvas de força</i>	31
2.3.4.1	<i>Curvas resolvidas no tempo (SFC, DFC E DFC+S)</i>	33
2.3.4.2	<i>Medidas Oscilatórias (DFC + FS)</i>	34
2.3.4.3	<i>Modelos de lei de potência</i>	35
2.4	Microscopia Confocal de Fluorescência	38
2.4.1	<i>Fluorescência</i>	38
2.4.2	<i>Microscopia confocal</i>	43
2.4.3	<i>Análise de imagens - Dimensão fractal</i>	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1	Síntese dos Substratos	47
3.2	Cultura celular	47
3.3	Caracterização viscoelástica	48
3.4	Imageamento Confocal e Tratamento de Imagens	49
4	RESULTADOS	51
4.1	Medidas no AFM	51
4.1.1	<i>Análise puramente elástica</i>	53
4.1.2	<i>Análise viscoelástica no domínio do tempo</i>	57
4.1.3	<i>Análise viscoelástica resolvida no espaço das frequências</i>	60

4.2	Microscopia confocal	63
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo se sabe que células eucarióticas são compostas por três estruturas principais: a membrana plasmática, o citoplasma e o núcleo, cada um com sua função específica para garantir a sobrevivência celular. A membrana plasmática é responsável pela filtragem de fluidos e nutrientes do citoplasma com a matriz extracelular, o núcleo coordena processos celulares como a divisão e é onde se encontra o material genético da célula, e no citoplasma é onde ocorre o transporte de nutrientes, é nele também onde se encontram as organelas são estruturas que realizam as funções da célula. Para que ocorra uma comunicação viável entre os componentes da célula, todo o transporte de proteínas devem ser feitos em meio aquoso, o que caracterizaria a célula como um corpo viscoso, mas ao mesmo tempo, o corpo celular deve oferecer alguma resistência para evitar que esses fluidos escapem. Portanto, a célula também deve apresentar características elásticas. Do ponto de vista do comportamento celular e de suas funções nos tecidos, é necessário que a célula apresente comportamento fluido para realizar funções como divisão, migração celular e geração de forças intracelulares, mas ao mesmo tempo, a célula precisa de sustentação para melhor constituir tecidos rígidos do corpo que estão expostos a forças externas. Este comportamento dual das células se tornou uma crescente área de pesquisa nas últimas décadas, e hoje é aceito que células apresentam caráter viscoso e rígido dependendo da função que a mesma exerça [1]. Por exemplo, foi observado que a rigidez celular é um bom indicador para determinar a saúde das células [2], podendo ser correlacionado com patologias graves como alguns tipos de câncer.

O componente estrutural das células é o citoesqueleto, que tem como funções principais o transporte intracelular de proteínas e redistribuição de forças locais [3]. O citoesqueleto é formado primordialmente por três tipos de fibras poliméricas, cada uma com papéis específicos na dinâmica celular: (i) os microtúbulos, cujas principais funções são o transporte de proteínas pelo citosol e a divisão celular[1]; (ii) os filamentos intermediários, que possuem função estrutural de prover resistência mecânica a esticamentos e absorção de choques [1, 4]; e (iii) os filamentos de actina, que realizam o papel de sustentação e motilidade da célula [1, 5]. Estes três filamentos dividem a propriedade de recombinação, se tornando presentes como longas fibras apenas quando necessário para a função que a célula necessita, e se despolimerizando quando sua presença não é necessária [3]. Esta característica transiente do citoesqueleto é a principal responsável pelo caráter viscoelástico de células.

É conhecido que alguns fatores externos podem influenciar a organização do citoesqueleto, e assim suas propriedades viscoelásticas, onde os principais são; a saúde celular, como previamente mencionado. Jaalouk e Lammerding revisam como mutações celulares impactam

suas características estruturais [2]; uso de fármacos que diretamente desmantelam as redes que compõem o citoesqueleto, Rotsch *et al.* tratou células com drogas que afetam os três componentes do citoesqueleto, separadamente, e concluiu que apenas a rede de actina filamentosa influencia diretamente na elasticidade da célula, onde as medidas mecânicas foram feitas utilizando microscopia de força atômica [6]. Seguindo esse fato, Ayala *et al.* descreve o tratamento de células com três fármacos que afetam apenas a organização da rede de actina filamentosa, e como isso afeta a elasticidade da mesma utilizando de microscopia de pinças ópticas para medidas de elasticidade [7]; e por fim, a dureza do substrato que a célula se encontra, publicações sobre esse fenômeno serão comentadas a seguir.

Gupta *et al.* estudaram imagens de microscopia confocal de fluorescência para analisar o alinhamento da fibras de actina filamentosa correlacionando com a dureza dos substrato que se encontram, e concluíram que células em substratos macios se comportam de forma mais fluida, apresentando baixa organização da rede de f-actina. E em substratos mais duros, as células se mostram mais rígidas, com a actina organizada em longas fibras paralelas. O alinhamento preciso das imagens foi feito utilizando técnicas computacionais de análise de imagem [8].

Solon *et al.* utilizou-se de Microscopia de Força Atômica (AFM) para determinar que células cultivadas em substratos de durezas diferentes tem suas características estruturais variadas [9]. Foi encontrado também uma maior concentração de actina no estado polimérico em células cultivadas em substratos mais duros. Fitzroy *et al.* chegaram às mesmas conclusões, mas utilizando a técnica de aspiração por micropipetação para obter as propriedades mecânicas [10]. Vale ressaltar que a técnica de micropipetação permite estudar células em cultivadas em estruturas tridimensionais. Desta forma, Fitzroy *et al.* concluíram que tanto a dureza de substratos bi-dimensionais como tri-dimensionais afetam de maneira similar as propriedades viscoelásticas de células vivas.

O estudo de células em substratos de durezas diferentes tem se intensificado nas últimas décadas, pois é geralmente aceito que que substratos macios se assemelham ao ambiente natural de células em tecidos, com a vantagem de possibilitar a investigação das propriedades mecânicas de células isoladas. Podemos observar que, além das conclusões feitas sobre biomecânica celular, o estudo estrutural de células deu luz a variadas técnicas experimentais capazes de obter parâmetros estruturais de seres unicelulares. O próximo passo lógico de qualquer estudo investigativo é se perguntar como o conhecimento técnico adquirido pode ser aplicado para o bem da população. A resposta encontrada foi virarmos nossa atenção para a investigação dos mecanismos internos celulares afetados por patologias congênitas, como alguns tipos de câncer. A seguir serão apresentados algumas publicações recentes evidenciando esse estudo.

Yousafzai *et al.* realizaram estudos de como células cancerígenas têm suas propri-

idades elásticas afetadas pela dureza do substrato que se encontram. Foram utilizadas pinças ópticas para as medidas de elasticidade e eles concluíram que, assim como células animais saudáveis, a dureza do substrato influencia em sua viscoelasticidade [11]. Foi também encontrado que quão maior o caráter metastático de células cancerígenas, maior foi a influência do substrato em sua morfologia, mais especificamente, quanto mais agressivo o câncer, mais ele se espalhava em substratos moles.

Um estudo recente mostrou evidências diretas de como células cancerígenas ficam mais macias ao navegar por espaços confinados. Neste estudo, Rianna *et al.* utilizaram de substratos estruturados de diferentes geometrias para obter a viscoelasticidade de células cancerígenas em migração. As medidas de elasticidade foram feitas por AFM. Os substratos foram variando em grau de confinamento, inicialmente com a célula livre, e terminando com ela navegando um fino canal. Eles encontraram que células cancerígenas ficam mais moles durante migração em meios unidimensionais, que pode ser o principal mecanismo possibilitador da metástase. Quase simultaneamente, de Sousa *et al* estudaram a viscoelasticidade de doze linhagens de células normais e cancerígenas utilizando AFM [12]. Eles encontraram fortes correlações entre as propriedades viscoelásticas, motilidade e invasividade de células de câncer, de forma que quanto mais agressivo for o câncer mais macio são suas células. Além disso, eles encontraram indícios de que as características de motilidade estão codificadas nos parâmetros da função de relaxação viscoelástica das células.

O conhecimento construído por meio de estudos biomecânicos já começaram a migrar para aplicações reais na medicina. Um estudo recente descreve os progressos no desenvolvimento de um possível tratamento para o câncer colorretal baseado puramente nas mudanças viscoelásticas observadas nas células cancerígenas induzidas pelo substrato que se encontram [13].

A partir do cenário descrito acima, os principais objetivos desta dissertação são: (i) estudar como fibroblastos L929 se adaptam a substratos de durezas diferentes utilizando o AFM para extrair os parâmetros viscoelásticos das células, (ii) caracterizar morfologicamente as células utilizando microscopia confocal de fluorescência, (iii) e entender como viscoelasticidade interna das células e a estrutura do citoesqueleto se correlacionam.

O AFM vem sendo utilizada no estudo investigativo da reologia celular principalmente pela sua capacidade de imprimir e simultaneamente medir forças da ordem de poucos nN até mesmo em ambientes aquosos [14]. Característica essa, essencial para estudar células vivas *in vitro* em situações análogas àquelas encontradas *in vivo*.

A microscopia confocal, conceptualizada em 1955 por Marvin Minsky [15], combinada com análise de fluorescência, é outra técnica de estudo de estruturas orgânicas muito utilizada atualmente, pois o sinal de fluorescência é o mais forte, menos suscetível a destruir es-

truturas e com menor interferência com a fonte de excitação proveniente de um corpo orgânico [16].

Esta dissertação está organizada da seguinte forma. O Capítulo 2 apresentará uma breve revisão teoria básica necessária para o entendimento e desenvolvimento deste trabalho. Em particular serão discutidos o papel do citoesqueleto no funcionamento das células, os modelos físicos básicos para descrever materiais viscoelásticos, e os métodos experimentais utilizados nesta tese. O Capítulo 3 dedica-se a descrever os materiais e métodos usados nesta dissertação como cultivo e imunohistoquímica fluorescente das células analisadas, procedimentos de obtenção de curvas de força e imagens confocais, e como os dados obtidos foram analisados. No Capítulo 4 serão apresentados os resultados obtidos. E no Capítulo 5, os resultados serão discutidos a fim de observar tendências no comportamento que nos aponte para um melhor entendimento dos mecanismos internos atuantes, para então apresentarmos uma conclusão.

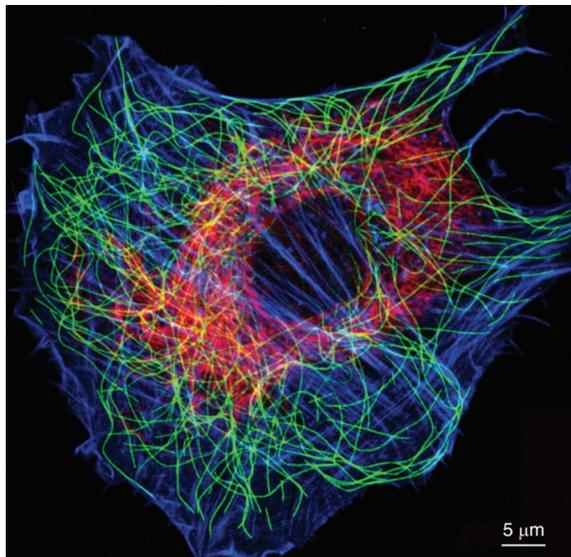
2 TEORIA

Este capítulo se dedica a uma descrição mais detalhada do papel do citoesqueleto celular, as metodologias experimentais utilizadas neste trabalho, e conceitos básicos de reologia necessários para interpretação dos experimentos.

2.1 Citoesqueleto

O citoesqueleto é uma estrutura celular com diversas funções, essas sendo principalmente de sustentação, comunicação entre estruturas e auxílio para processos celulares. O esqueleto celular pode ser definido como uma malha composta por três tipos de filamentos distintos, onde cada filamento compõe uma rede que realiza funções específicas. Estes filamentos são: os microtúbulos, os filamentos intermediários e os filamentos de actina [1]. Todos estes são estruturas poliméricas dinâmicas formados por sub-unidades protéicas distintas. A Figura 1 mostra uma imagem confocal de fluorescência do citoesqueleto de um fibroblasto com todos seus componentes.

Figura 1 – Imagem de fluorescência do citoesqueleto celular.



As cores verdes, vermelho e azul indicam a rede de microtúbulos, os filamentos intermediários e a rede de f-actina, respectivamente. Fonte: referência [17].

Os microtúbulos são formados por subunidades de tubulina, estas organizadas em anéis concêntricos de 13 sub-unidades dispostas em sua circunferência, fazendo o microtúbulo uma estrutura cilíndrica oca de aproximadamente 25 nm de diâmetro. Os microtúbulos são estruturas essenciais para organização intracelular, servindo como trilhos para o tráfego de organelas e segregação de cromossomos durante a divisão celular [1, 18].

Na célula animal, o crescimento dos microtúbulos se dá a partir dos centrossomos, que são pequenas organelas próximas ao núcleo celular com maior concentração de tubulina, crescendo radialmente até a parede da célula, onde a polimerização dessas proteínas é correlacionada com a concentração de agente reticular no citosol. O microtúbulo se desprende do centrossomo apenas quando a célula entra em processo de divisão celular, servindo de trilho para a separação dos cromossomos[18]. Apesar de existir literatura indicando que os microtúbulos são estruturas com rigidez muito alta [19], foi também verificado experimentalmente por Radmacher *et al* que a ausência destas estruturas no corpo celular não influencia no módulo elástico das células animais [6] .

Em células vegetais a rede de microtúbulos também é a responsável pela morfologia celular [20], pois estes guiam a produção de celulose na parede celular, e também é o componente estrutural do citoesqueleto responsável por absorver cargas mecânicas [21]. Apesar disso, foi observado que protoplastos vegetais e células animais apresentam propriedades mecânicas e durezas similares[22].

Os filamentos intermediários são na verdade uma classe de filamentos com tamanho médio intermediário entre os microtúbulos e de f-actina [23]. A composição dos filamentos intermediários varia com o tecido, podendo ter entre 8 e 12 nm de diâmetro, mas estes são usualmente formados por vinculina [24]. Apesar dos filamentos intermediários terem composições diferentes dependendo do tecido originário, eles possuem as mesmas funções gerais, funcionando como elemento de resposta a perturbações iniciadas na superfície celular. Filamentos intermediários podem também ancorar organelas no citoplasma, assim como servir de malha para transdução de outros sinais pelo corpo celular, agindo em conjunto com motores moleculares para direcionar moléculas sinalizadoras da parede celular até o núcleo [25].

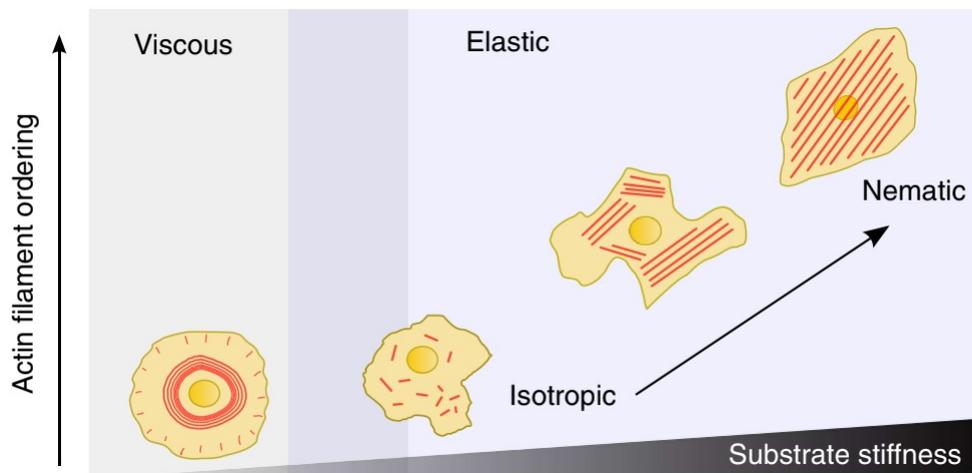
A sustentação da célula animal é atribuída à rede de filamentos de actina presente no citoesqueleto[1, 26, 27]. O filamento de actina (f-actina) é formado similarmente ao microtúbulo de tubulina, com unidades globulares dispostas em padrão helicoidal [1, 28]. Além de sustentação, a rede de f-actina também se mostra importante no controle da morfologia da célula, já que esta trabalha com motores de miosina para de hidrolisar adenosina trifosfato (ATP), e torna possível criar protrusões no corpo da célula. Estas protrusões aumentam sua área de contato para melhor absorção de nutrientes, e possibilitam migração celular. A rede de f-actina também pode trabalhar juntamente com motores de miosina para possibilitar a contração muscular [1].

Outra função importante da rede de actina, e talvez a que será mais citada neste trabalho, é sua capacidade de se reorganizar de acordo com estímulos exteriores, para realizar a distribuição de estresses locais e evitar perfurações [1, 26], e para realizar ancoragem em substratos de durezas diferentes com a criação de fibras de estresse ordenadas [8]. O esquema

da Figura 2 demonstra como a rede de f-actina se reorganiza dependendo da dureza do substrato, como observado por Gupta, *et al.* [8].

Todos os filamentos do citoesqueleto se recombinaem de acordo com a função biológica que as células executam como a migração, invasão e divisão celular [1, 29, 28], ou o estado da saúde da célula [2, 27, 30, 31]. Essa característica transiente do citoesqueleto celular é o que define a célula como um material viscoelástico, ou seja, um material que exhibe simultaneamente características elásticas e viscosas [26, 27, 32, 33].

Figura 2 – Organização da f-actina em relação à dureza do substrato.



Esquema simplificado ilustrando a correlação das fibras de actina organizadas nas chamadas fibras de estresse com a dureza do substrato que as mesmas se encontram. Fonte: referência [8]

Apesar do citoesqueleto ser composto por três malhas de filamentos rígidos, nem todos influenciam diretamente em suas características viscoelásticas. Alguns estudos se propuseram a quantificar o quanto cada rede de filamentos afeta as propriedades mecânicas de células [6, 34]. A referência [6], por exemplo, faz medidas de elasticidade em células tratadas com fármacos que despolimerizam os filamentos do esqueleto celular. Neste trabalho, foram observadas reduções no módulo elástico de células com sua rede de actina despolimerizada, mas nenhuma mudança na elasticidade de células com microtúbulos e filamentos intermediários comprometidos, implicando pouca influência destes últimos na viscoelasticidade celular.

Existem patologias que comprometem a integridade do citoesqueleto, e o estudo de propriedades mecânicas de células sob influência de fármacos tem se mostrado muito relevante na compreensão do efeito das doenças em nível celular, exatamente porque eles podem isolar efeitos destas para análise quantitativa, possibilitando o melhor entendimento de como certas doenças impactam tecidos vivos.

Sabe-se também que o substrato (meio extra-celular) impacta na estrutura e na organização da rede de actina no corpo celular. A investigação de como exatamente a dureza e a geometria dessas matrizes extracelulares influenciam nas propriedades viscoelásticas

e na morfologia da célula é um tópico atualmente em forte expansão na literatura científica [8, 9, 11, 10, 22, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40]. A importância deste estudo se dá porque, utilizando-se de substratos macios e estruturados, é possível replicar o ambiente da célula dentro dos tecidos e órgãos, possibilitando observar a célula em suas condições usuais *in vivo*. Os substratos utilizados nesses estudos são usualmente de géis de poliacrilamida cuja rigidez é proporcional à concentração do agente reticulador utilizado na fabricação, possibilitando assim a confecção de géis de durezas variadas para o estudo da adaptação do citoesqueleto à estas matrizes.

2.2 Teoria básica de deformação dos sólidos

2.2.1 Elasticidade e Viscosidade

A elasticidade linear é, de maneira simplificada, a propriedade de um material de se deformar instantaneamente ao entrar em contato com uma força externa, com a geração de uma força restauradora oposta à de deformação, onde, com o fim da força externa, a força restauradora interna do material a retornaria a sua forma original. Essa força, dividida pela área que a força deformadora externa está atuando, define o *stress* σ , seguindo a equação [41, 42]:

$$\sigma = \frac{dF}{dA}, \quad (2.1)$$

onde σ é o *stress*, F é a força aplicada sobre o material, e A é a área onde a força atua. Existem dois tipos de *stress*, normais e de cisalhamento. O *stress* normal é definido como o *stress* que a força do estímulo mecânico é direcionado perpendicularmente à superfície do corpo que a força está atuando, e o *stress* de cisalhamento corresponde àquele cuja força externa é paralela à superfície atuante da força, como ilustra a Figura 3.

Considere um corpo de comprimento inicial L_0 e secção reta de área A_0 , submetido a uma força externa aplicada na direção na direção de seu comprimento. A deformação deste corpo pode ser descrita por [41, 42]

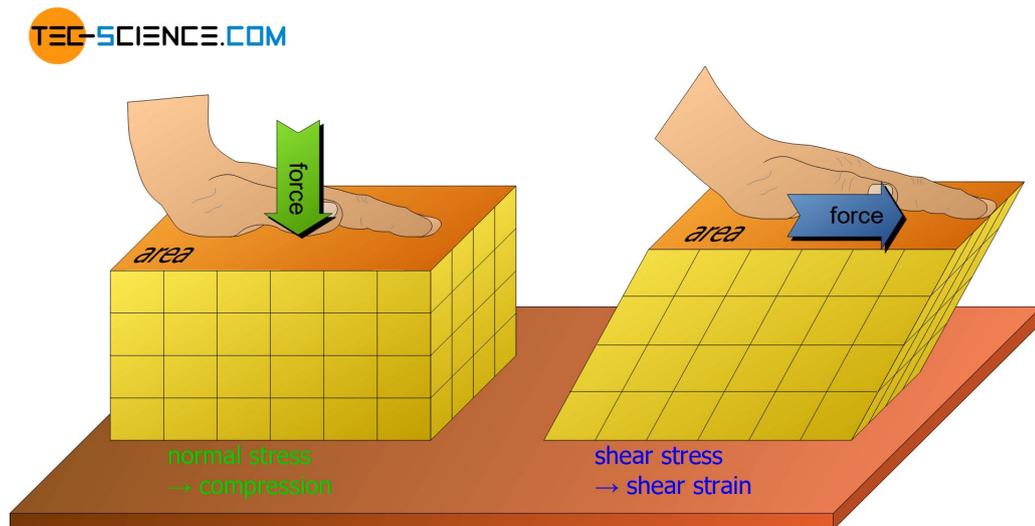
$$\epsilon = \frac{L - L_0}{L_0}, \quad (2.2)$$

onde o ϵ é também chamado de *strain*, L é o comprimento do material durante a aplicação da força externa e L_0 é o comprimento inicial da amostra. Para pequenas deformações, vale a relação entre *stress* e *strain* obedece [41, 42]:

$$\sigma \propto \epsilon. \quad (2.3)$$

A constante de proporcionalidade entre essas grandezas depende apenas do material e é definido como módulo de elasticidade. Desta forma, a equação constitutiva de materiais perfeitamente

Figura 3 – Definições de stress normal e de cisalhamento



Esquema ilustrando stress normal (esquerda) e stress de cisalhamento (direita). Fonte: <<https://www.tec-science.com/wp-content/uploads/2021/02/en-deformation-normal-shear-stress.jpg>> acesso em 13/01/2022

elásticos é dada por

$$\sigma = E \cdot \epsilon. \quad (2.4)$$

A viscosidade é a propriedade característica de um fluido. É a propriedade de resistir a força de escoamento. Um fluido escoando é considerado como totalmente em cisalhamento, e esse cisalhamento é criado por um *stress* que causa o escoamento, e uma força interna oposta. A equação relacionando *stress* e *strain* para materiais viscosos foi postulada por Newton como sendo [41, 42]

$$\sigma \propto \frac{d\epsilon}{dt}, \quad (2.5)$$

onde, novamente, σ é o *stress*, ϵ é o *strain* de cisalhamento, e t é o tempo. O fator de proporcionalidade é chamado de coeficiente de viscosidade. Desta forma, materiais perfeitamente viscosos obedecem a seguinte equação constitutiva [41, 42]

$$\sigma = \eta \frac{d\gamma}{dt}, \quad (2.6)$$

onde η é a viscosidade do material e γ é o *strain* paralelo à área de atuação da força, ou, *strain* de cisalhamento. Todos os fluidos que seguem essa equação são denominados fluidos newtonianos.

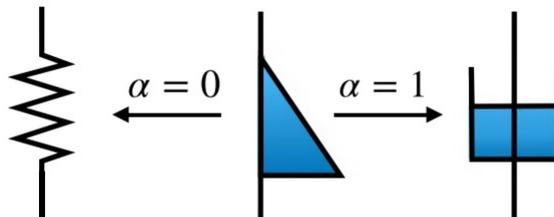
2.2.2 Viscoelasticidade linear

Como o próprio nome sugere, viscoelasticidade é a propriedade de um material exibir simultaneamente comportamentos elástico e fluido. A forma encontrada para analisar a contribuição de cada aspecto em uma amostra foi a formulação de modelos que associam elementos puramente elásticos com elementos puramente fluidos. Com esses modelos se torna possível obter equações diferenciais que descrevem como a amostra se deforma, assim obtendo seus parâmetros estruturais.

Os modelos reológicos viscoelásticos mais comuns geralmente podem ser apresentados de forma pictórica, como associações elementos puramente elásticos, representados por molas Hookeanas sem massa e elementos puramente viscosos, ou *dashpots* newtonianos.

Nas últimas décadas vem sendo popularizado os modelos reológicos fracionários, onde foram substituídos elementos puramente elásticos e viscosos por elementos viscoelásticos intermediários, com seu comportamento definido por um parâmetro α que varia entre 0 e 1. Para $\alpha = 0$ obtém-se um elemento elástico, e para $\alpha = 1$ obtém-se retornaria um elemento viscoso. A Figura 4 ilustra os três elementos aqui citados (elástico, viscoso e fracionário) e como estes tendem a aparecer em representações visuais de modelos reológicos.

Figura 4 – Elementos viscoelásticos usados em modelos reológicos.



Na figura temos da esquerda pra direita, mola Hookeana, elemento fracionário definido pelo parâmetro alfa, e dashpot Newtoniano. Fonte: referência [43]

Medidas realizadas para obtenção de parâmetros reológicos são de geralmente dois tipos: testes de *creep* e testes de relaxação. Testes de *creep* são definidos por um material sofrer um *stress* e responder com um *strain*, onde a função que caracteriza a resposta do material neste teste é chamada de *creep compliance*, e é usualmente denotada por $J(t)$. A definição matemática de *creep compliance* é dada pela equação a seguir [42, 44]

$$\epsilon(t) = \int_0^t J(t - \tau) d\sigma(\tau). \quad (2.7)$$

Os testes de relaxação são definidos por uma amostra sofrer um *strain* conhecido e responder com um *stress*. A função que caracteriza a resposta de um material nestes testes é chamada módulo de relaxação, e é denotada por $G(t)$. Matematicamente, $G(t)$ é definida por

[42] [44]:

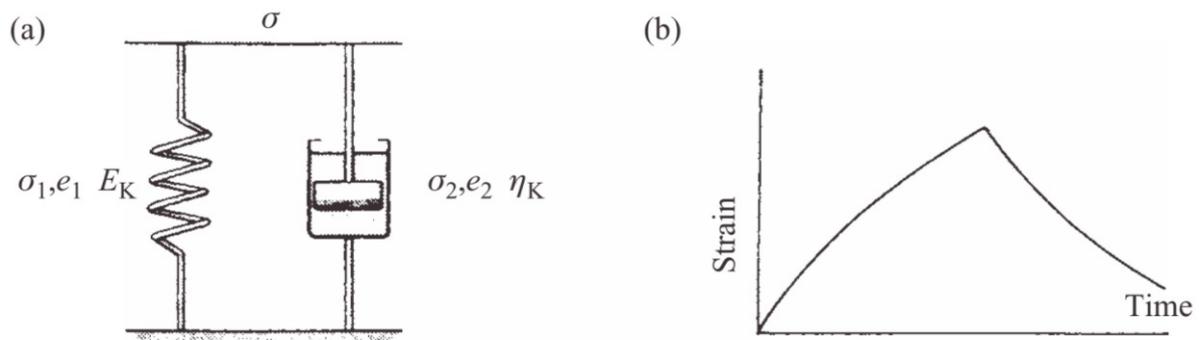
$$\sigma(t) = \int_0^t G(t - \tau) d\epsilon(\tau) \quad (2.8)$$

Nas secções subsequentes serão discutidos dois modelos viscoelásticos simples, os modelos Kelvin-Voigt e o modelo Maxwell.

2.2.2.1 Modelo de Kelvin-Voigt

O modelo de Kelvin-Voigt consiste em um elemento puramente elástico de módulo elástico E_k colocado em paralelo a um elemento puramente viscoso η_k . Considerando um stress aplicado em $t = 0$, o elemento viscoso impede da mola se deformar instantaneamente. Após um certo tempo determinado pela viscosidade do *dashpot*, a mola se aproximará de sua deformação máxima. Ao remover o stress, o oposto acontece, a mola se aproximará de seu tamanho original mas o tempo do processo será mais longo devido à viscosidade do elemento viscoso. A Figura 5a mostra um esquema do modelo de Kelvin-Voigt, e a Figura 5b ilustra como o *strain* de uma amostra viscoelástica seguindo esse modelo seria em um experimento de *creep*.

Figura 5 – Modelo reológico de Kelvin-Voigt.



a) ilustração do sistema composto por uma mola e um dashpot em paralelo com um stress aplicado simultaneamente. b) Curva de strain por tempo esperada pelo modelo. Fonte: referência [42]

Como a associação dos elementos é em paralelo, temos que a mola e o *dashpot* experienciam o mesmo *strain*, mas o stress é dividido entre eles, ou seja [42]:

$$\sigma = \sigma_1 + \sigma_2 \quad (2.9)$$

$$\epsilon = \epsilon_1 = \epsilon_2. \quad (2.10)$$

Usando as definições de stress para molas e fluidos, obtemos a função do stress sentido por todo

o sistema:

$$\epsilon = E_k \epsilon + \eta_k \frac{d\epsilon}{dt}, \quad (2.11)$$

onde σ é o stress aplicado ao sistema, e ϵ é o *strain* sofrido pelos elementos. A solução da equação diferencial da equação acima nos retorna [42]:

$$\epsilon = J\sigma \left[1 - e^{-\frac{t}{\tau'}} \right], \quad (2.12)$$

onde J é o módulo de *creep*, e τ' é tido como tempo de retardo e é definido como E_k/η_k . A simplicidade deste modelo restringe sua utilidade, este modelo não consegue descrever a relaxação do stress, pois com stress constante, o elemento viscoso não pode relaxar.

2.2.2.2 Modelo de Maxwell

Este modelo também possui apenas dois elementos, um elástico de módulo elástico E_m e um viscoso de viscosidade η_m , mas agora estes são arrançados em série. Neste caso, o stress é o mesmo para os dois componentes do sistema, e o *strain* total é a soma dos *strains* sentidos pelos elementos[42], ou seja:

$$\sigma = \sigma_1 = \sigma_2 \quad (2.13)$$

$$\epsilon = \epsilon_1 + \epsilon_2 \quad (2.14)$$

Novamente usamos as relações de *stress* e *strain* para molas e fluidos obtendo:

$$\sigma_1 = E_m \epsilon_1 \quad (2.15)$$

$$\sigma_2 = \eta_m \frac{d\epsilon_2}{dt} \quad (2.16)$$

Derivando a primeira e igualando pelos stresses, temos a equação diferencial:

$$\frac{d\epsilon}{dt} = \frac{1}{E_m} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{\eta_m} \quad (2.17)$$

O Modelo de Maxwell é melhor empregado em experimentos de relaxação, onde no caso temos um *strain* constante com o tempo e é medido o stress da amostra [42], dessa forma:

$$\frac{d\epsilon}{dt} = 0 \quad (2.18)$$

Assim:

$$0 = \frac{1}{E_m} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{\eta_m} \quad (2.19)$$

Então:

$$\sigma = \sigma_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.20)$$

Onde novamente τ é o tempo característico de decaimento, ou tempo de relaxação, e σ_0 é o *stress* no tempo $t = 0$.

2.2.3 Parâmetros dinâmicos Viscoelásticos

Até agora foram mencionados apenas modelos reológicos resolvidos no tempo, que são utilizados exclusivamente em experimentos de *creep* e relaxação. Outra abordagem para experimentos de obtenção de parâmetros viscoelásticos é submeter a amostra a um *strain* periódico enquanto simultaneamente se mede o *stress*, esta é a medida oscilatória, e será explicada nesta seção.

Materiais com viscoelasticidade linear expostos a *strains* periódicos apresentam respostas de *stress* e *strain* sinusoidais, mas com uma diferença de fase. Essa diferença de fase é atribuída ao comportamento viscoso da amostra, que dissipa a energia nela imposta pelo estímulo periódico [45, 44]. Matematicamente, para um experimento de relaxação oscilatório, tem-se

$$\epsilon = \epsilon_0 \sin(\omega t), \quad (2.21)$$

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \theta). \quad (2.22)$$

ϵ_0 e σ_0 são os *strain* e *stress* máximos, ω é a frequência da força externa, t é o tempo e δ é a defasagem entre o *stress* e o *strain*. Podemos agora expandir o *stress* em duas componentes, uma em fase com o *strain*, e outra defasada em $\pi/2$. Assim, a relação entre *stress* e *strain* para medidas oscilatórias fica da forma:

$$\sigma = \epsilon_0 G' \sin(\omega t) + \epsilon_0 G'' \cos(\omega t), \quad (2.23)$$

onde G' e G'' são os módulos das componentes da expansão do *stress*, e são dados por:

$$G' = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \cos(\theta) \quad (2.24)$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\epsilon_0} \sin(\theta) \quad (2.25)$$

Os termos G' e G'' definem as amplitudes das componentes em fase e fora de fase do stress em relação ao *strain*, respectivamente. Ambos módulos definem o módulo complexo de cisalhamento dinâmico G^* [45, 44]:

$$G^* = G' + iG'' \quad (2.26)$$

G' é chamado de módulo de armazenamento, pois define a energia armazenada na amostra na forma de energia elástica, e G'' o módulo de perda, que caracteriza a energia dissipada pela viscosidade da amostra [42]. A partir da definição destes módulos, também é possível obter o exato ângulo de defasagem entre *stress* e *strain*:

$$\tan \theta = \frac{G''}{G'} \quad (2.27)$$

O ângulo de defasagem nos retorna as propriedades viscoelásticas do material, sabendo que um material perfeitamente elástico teria defasagem de zero graus e um material perfeitamente viscoso teria noventa graus de defasagem entre stress e strain [44, 45]. Todos os ângulos intermediários definiriam materiais viscoelásticos. Partindo dessa nova abordagem, foram construídos novos modelos reológicos para análise estrutural de amostras viscoelásticas. No próximo item, irei introduzir teoria matemática por trás de modelos reológicos mais complexos, o cálculo fracionário.

2.2.3.1 Cálculo fracionário

Os modelos reológicos apresentados são usados em experimentos de viscoelasticidade, onde alguns modelos são mais eficazes para certas amostras do que outros. Isso pode causar problemas em estudos reológicos investigativos, onde é desconhecido que modelo seria mais adequado para a mostra em questão.

Materiais viscoelásticos podem apresentar dois tipos de função relaxação, decaimento exponencial ou decaimento tipo lei de potência. Modelos que retornam funções relaxação do tipo lei de potência são mais complexos, e não podem ser definidos pelo acoplamento de elementos elásticos e viscosos como os apresentados anteriormente [46]. O desenvolvimento destes modelos foi realizado a partir do cálculo fracionário, pela definição de um elemento fracionário, que não apresenta características perfeitamente elásticas ou viscosas. A relação constitutiva entre stress e strain de um elemento fracionário é [46]:

$$\sigma(t) = \Lambda \frac{d^\alpha}{dt^\alpha} \epsilon(t) \quad (2.28)$$

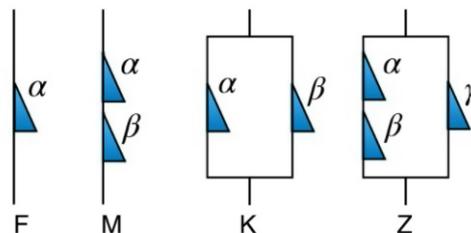
Onde $\sigma(t)$ é a função stress aplicada à amostra, $\epsilon(t)$ é o strain sofrido, Λ é um parâmetro material da amostra definido por $\Lambda = E\tau^\alpha$ (com τ sendo o tempo de relaxação) e d^α/dt^α com $(0 \leq \alpha \leq 1)$ é o operador derivada fracionária.

O parâmetro α , também chamado de expoente de relaxação, é o que define o quão elástico será o elemento do sistema. Se α for igual a 1, a equação volta a ser a relação stress e strain para fluidos (Lei de Newton), descrevendo um elemento puramente viscoso. Já se α for igual a zero, a derivada fracionária e o tempo de relaxação somem, e retornamos à Lei de Hooke para molas perfeitas. Assim, qualquer valor de α entre 0 e 1 é definidor de um elemento viscoelástico. Dessa forma, um elemento fracionário é definido unicamente pelos parâmetros E , τ , α .

Pela complexidade de modelos reológicos tipo lei de potência, estes foram desenvolvidos utilizando o método funcional, a partir de funções de indentação de experimentos de contato com um microscópio de força atômica, então, este modelo será explicado após a sessão de microscopia de força atômica.

A Figura 6 demonstra o arranjo de elementos fracionários que descrevem os modelos mais simples para fins ilustrativos. Estes modelos podem descrever materiais viscoelásticos com regimes tipo lei de potência com um ou mais expoentes. Os modelos Kelvin-Voigt e Maxwell fracionários por exemplo podem descrever regimes de até dois expoentes, o modelo Zener, ou sólido linear padrão, pode retornar até três. As funções relaxação e $R(t)$ e o módulo de cisalhamento de cada modelo é desenvolvido na referência [46].

Figura 6 – Modelos viscoelásticos fracionários



Pelos sistemas da figura, temos (F) elemento fracionário único, com um expoente; (M) modelo fracionário de Maxwell, com dois expoentes; (K) modelo fracionário de Kelvin-Voigt, também dois expoentes; e (Z) o modelo fracionário de Zener, com três expoentes. Fonte: referência [43]

2.3 Microscopia de Força Atômica

O microscópio de força atômica (AFM) é um equipamento versátil, capaz de obter imagens topográficas de alta resolução e de fazer medidas reológicas de materiais viscoelásticos. Ele tem sido utilizado abrangentemente no estudo de materiais biológicos (como células e tecidos) e sintéticos (como redes poliméricas criadas em laboratório). Em princípio é uma técnica invasiva, onde a sonda utilizada para obter os parâmetros morfológicos e/ou es-

truturais da amostra necessita perturbar mecanicamente o objeto de estudo. Nesta seção será explicado o funcionamento do microscópio de força atômica, e como são feitas as análises de dados de experimentos reológicos.

A maioria das técnicas laboratoriais de análise de amostras se resume em uma fonte de excitação e na análise da emissão desta para obtenção de informações. Microscopias ópticas usam lâmpadas ou lasers para; obtenção de parâmetros estruturais; análise de dinâmica intracelular; determinação de composições químicas dentre outras, tudo isso por intermédio de contrastes de luz, ou emissões fluorescentes e fosforescentes. Microscopia Raman analisa os modos vibracionais da resposta de uma amostra ao ser incidida por lasers de comprimentos de onda específicos para determinação da composição química de corpos desconhecidos. A microscopia de força atômica se diferencia destas mais usuais por ser uma técnica baseada em estímulos mecânicos. Ela funciona essencialmente com a indentação de um corpo de elasticidade conhecida, usualmente chamado de “ponta” ou “indentador” em uma amostra, e depois com a análise de como a ponta relaxa com o tempo. Mais especificamente, de acordo com a referência [47], os principais componentes de um microscópio de força atômica são o microscope stage, o tradutor eletrônico e o computador.

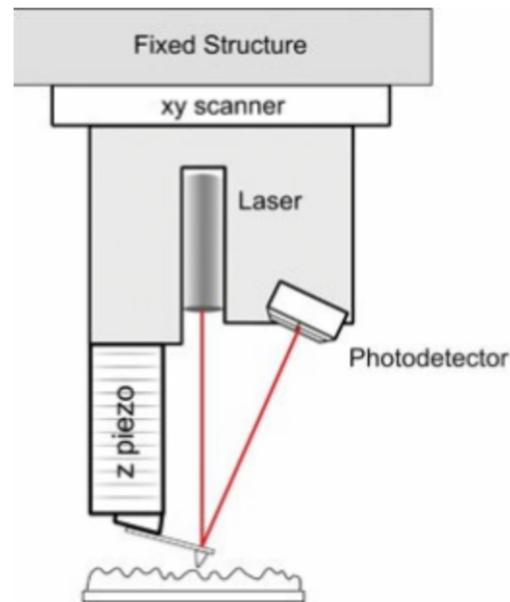
Nesta seção serão apresentados os elementos que compõem o AFM e em seguida será discutido como funciona a análise de experimentos reológicos no microscópio de força atômica.

2.3.1 *Microscope Stage*

O microscope stage consiste nos seguintes componentes; o equipamento que controla o movimento da ponta em três dimensões, possibilitando fazer medidas em pontos específicos, assim como medições de varredura de grandes áreas do espécime; um aparato para segurar as amostras; e um sensor de força para segurar e monitorar a ponta do AFM. Geralmente, o microscope stage é montado sobre mesas que o isolam de vibrações do ambiente, já que qualquer vibração sentida pelo AFM pode interferir na medida. A maioria dos AFMs também vem acoplado a um microscópio óptico de campo amplo ou fluorescente para melhor visualização da amostra. O microscope stage também contém o caminho óptico do laser que é apontado na ponta, refletindo a luz para receptores que acompanham esse reflexo e mandam esta informação para o tradutor eletrônico. A Figura 7 mostra um esquema de um *microscope stage* usual de um AFM.

O controle da ponta se dá por três transdutores piezoelétricos, que são dispositivos feitos de materiais que possuem a propriedade de mudar suas dimensões quando expostos a uma diferença de potencial, onde a deformação do material é proporcional à voltagem aplicada [47]. Estes são encarregados de mover a ponta por causa de sua extrema precisão, sendo usualmente

Figura 7 – Esquema simplificado do microscope stage de um AFM.



O xy scanner são os transdutores piezoelétricos que movem a ponta no plano xy e o z piezo controla a altura da ponta. Fonte: referência [47]

feitos de cerâmicas sintéticas de coeficientes de expansão conhecidos e da ordem de 0,1nm por volt [47]. O transdutor piezoelétrico z tipicamente tem a resolução de até 0,5nm [47].

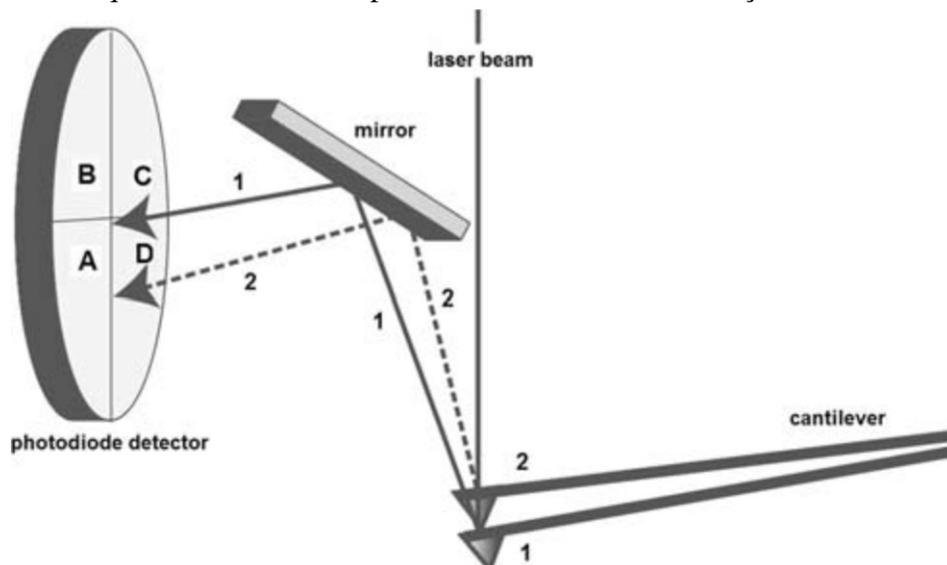
A monitoração da ponta do AFM é o que nos retorna a movimentação da ponta durante a indentação, é a resposta do material analisado, e este é realizado por um dispositivo chamado transdutor de força. Este dispositivo deve ser construído para que crie uma voltagem proporcional à deformação sentida, não muito diferente de um transdutor piezoelétrico. No AFM o transdutor de força usualmente utilizado funciona da seguinte maneira: o laser do microscópio deve ser focado no *cantilever*, de tal forma que o reflexo deste esteja incidido no detector, desta forma, qualquer movimento que o *cantilever* fazer em resposta à indentação da superfície da amostra irá afetar o movimento do *spot* do laser no detector. Este tipo de transdutor de força é chamado de alavanca óptica[47]. A Figura8 ilustra o funcionamento do transdutor de força usado em microscópios de força atômica.

2.3.2 Transdutor eletrônico

O tradutor eletrônico traduz os sinais obtidos pelo *microscope stage* para sinais eletrônicos e manda para o computador, assim como transmite os parâmetros de movimento da ponta do computador para o *microscope stage*.

Mais especificamente, é neste componente que são digitalizados os dados da movimentação do *spot* do laser obtido no transdutor de força, assim como é aqui que as funções que controlam o movimento da ponta são traduzidos em voltagens específicas para controle dos transdutores piezoelétricos.

Figura 8 – Esquema do caminho óptico de um transdutor de força utilizado em AFMs.



Fonte: <<https://www.researchgate.net/profile/Atsushi-Ikai/publication/313573966/figure/fig9/AS:981247186706433@1610958968021/The-principle-of-the-optical-lever-method-used-as-a-force-transducer-of-AFM-The-laser.ppm>> acesso em 16/01/2022

2.3.3 Computador

O computador tem a função de compilar os dados provenientes do tradutor eletrônico e apresentar para o usuário do microscópio para fácil análise, assim como controlar os parâmetros que movimentam a ponta. A informação de entrada que o computador recebe (além de parâmetros previamente definidos, como constante de mola da ponta e sua frequência de oscilação) é como o *spot* do laser no detector se moveu durante a indentação. A partir deste único dado o AFM é capaz de obter informações viscoelásticas do material, assim como pode obter imagens topográficas de altíssima resolução. O software de um computador de AFM geralmente vai apresentar dados de medidas elásticas como gráficos relacionando a indentação da ponta (obtido pelo transdutor piezoelétrico) pela deflexão sofrida pelo *spot* do laser, estes gráficos são chamados de curvas de força, e serão melhor exploradas na próxima seção

É aqui que se encontram os softwares de ajuste de curva, utilizando de modelos reológicos para análises viscoelásticas de materiais. É aqui também que é controlado processos de *scanning* de amostras com grandes áreas, e as funções de aplicação de indentação.

2.3.4 Análise de curvas de força

O gráfico que relaciona o parâmetro controlável do AFM, sendo este a altura da ponta em relação à amostra, com o parâmetro obtido, sendo este a deflexão do transdutor de força, é chamado de curva de força. Para melhor visualização das curvas, é comum transformar estes parâmetros nas quantidades “força sentida pelo *cantilever*” e “indentação sentida pela

amostra”. Essas transformações são feitas utilizando as seguintes equações.

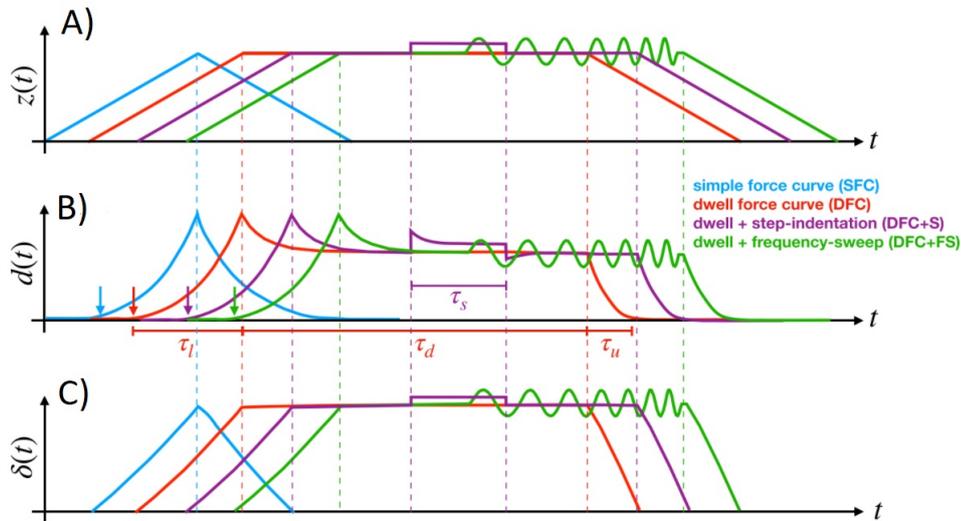
$$F(d(t)) = k_c(d(t) - d_0) \quad (2.29)$$

$$\delta(t) = (z(t) - z_0) - (d(t) - d_0) \quad (2.30)$$

Onde a função $d(t)$ é a deflexão sentida pelo *cantilever*, $z(t)$ é a função que regula a posição da ponta no eixo z , $F(t)$ é a força sentida pelo *cantilever*, $\delta(t)$ é a indentação na amostra, k_c é a constante de mola da ponta, e o ponto (d_0, z_0) é o ponto de contato entre a ponta e a amostra.

Existem várias tipos de curvas de forças que são usadas em experimentos reológicos, cada uma com suas vantagens e desvantagens. A Figura9 ilustra curvas de forças utilizando funções de indentação usuais, estas sendo a curva simples (SFC), curva com dwell (DFC), curva com *dwell* e indentação (DFC + S) e curva com *dwell* e *frequency sweep* (DFC + FS).

Figura 9 – Exemplos de curvas de força obtidas no AFM.



As cores correspondem às funções de indentação usadas em cada experimento. A curvas relacionando a posição do transdutor piezoelétrico z o tempo. B Curvas relacionando a deflexão sentida pelo transdutor de força com o tempo. C Curvas relacionando a indentação da ponta com o tempo. Onde τ_l é o tempo de aproximação da ponta até a indentação máxima, τ_d é o tempo de *dwell*, τ_u é o tempo de afastamento da amostra, e τ_s é o tempo da segunda indentação da DFC + S. Fonte: referência [43]

A relação força-indentação em experimentos de contato depende apenas da função indentação utilizada para sondar a amostra, e da geometria do indentador, e pode ser descrita pela seguinte integral de convolução[48]:

$$F(t) = \Omega(\lambda) \int_0^t R(t - t') \frac{d\delta^\lambda(t')}{dt'} dt' \quad (2.31)$$

Onde $\Omega(\lambda)$ e λ são parâmetros estruturais do indentador, $\sigma(t)$ é a função que descreve o histórico de indentação, e $R(t)$ é a função relaxação do material dependente do tempo. A construção dessa

função é explicada em detalhe na referência [48]. Onde o módulo dinâmico de cisalhamento $G^*(\omega)$ se relaciona com a função relaxação por uma transformada de Fourier:

$$G^*(\omega) = i\omega \int_0^{\infty} R(t)e^{-i\omega t} dt \quad (2.32)$$

Em medidas de AFM, é conhecido apenas a função histórico de indentação e a força sobre o *cantilever*, onde $R(t)$ é definido utilizando o modelo reológico que melhor descreve os dados obtidos.

As próximas seções focam nas funções de indentação utilizadas em experimentos reológicos. Primeiro falaremos sobre curvas de força desenvolvidas no tempo, e em seguida sobre medidas de força oscilatórias. Por fim, comentarei o modelo reológico de dupla lei de potência, já que agora temos o formalismo necessário para o método funcional.

2.3.4.1 Curvas resolvidas no tempo (SFC, DFC E DFC+S)

O estudo analítico sobre curvas de força com históricos de indentações distintas que serviu de base para esta seção está na referência [48] de de Sousa. et al. De acordo com de Sousa, os estágios de aproximação e *dwell* de curvas resolvidas no tempo podem ser generalizadas seguindo a equação [48]:

$$\tilde{F}(t) = \tilde{F}_{el}(t)R_{app}(t) \quad (2.33)$$

onde $\tilde{F}(t) = F(t)/\Omega(\lambda)\delta_0^\lambda$ é a força normalizada pelos parâmetros geométricos da ponta, $\tilde{F}_{el} = \Gamma(\lambda+1)(t/\tau)^\lambda$ é a resposta elástica normalizada e $R_{app}(t)$ é a resposta viscoelástica aparente definida por:

$$R_{app} = \frac{\tilde{F}(t)}{\tilde{F}_{el}} = \frac{F(t)}{\Omega(\lambda)\delta_0^\lambda} \frac{1}{\Gamma(\lambda+1)} \left(\frac{t}{\tau}\right)^{-\lambda} \quad (2.34)$$

Independente do modelo reológico utilizado, foi observado no trabalho de de Sousa que no estágio de aproximação de curvas de força, a função de resposta viscoelástica aparente em muito se assemelha à função relaxação real do material. Mas essa semelhança não se sustenta para o estágio de *dwell*, pois a função $R_{app}(t)$ é inseparável dos parâmetros geométricos do indentador.

Curvas DFC+S tem a mesma função de histórico de indentação de curvas DFC adicionadas de uma função step, definida como uma indentação instantânea secundária alguns segundos após a indentação máxima é atingida, já durante o processo de relaxação da amostra, como mostra a figura 9. A função da força $\tilde{F}_s(t)$ normalizada é dada por [48]:

$$\tilde{F}_s(t) = \tilde{F}_d + x^\lambda(t)R_{app}(t - t'), \quad (2.35)$$

onde $t' \leq t < t''$. $\tilde{F}_d(t)$ é a função da DFC secundária do step, x é a razão entre a indentação do step e a inicial, e t' e t'' são os instantes inicial e final da indentação step.

O diferencial deste tipo de curva de força é que a representação analítica de seu perfil de indentação nos retorna a função relaxação diretamente. Essa curva ainda depende da geometria do indentador, evidenciado pelo termo x^λ , mas este não mais é inseparável da relaxação do material, podendo ser medida diretamente por esse tipo de curva de força.

2.3.4.2 Medidas Oscilatórias (DFC + FS)

Ainda no trabalho de de Sousa *et al.* [48]. Medidas de DFC + FS são definidas por uma função indentação com dwell, e, algum tempo após o início do dwell, é iniciado o movimento periódico do piezo z . Onde a função dada para a indentação do piezo varre valores de frequências conhecidas.

$$z(t - t''') - z_0 = z_{max} + \sum_n z_n e^{i\omega_n(t-t''')} \quad (2.36)$$

Onde $z(t)$ é a função que determina a altura da ponta, z_0 é o ponto de contato com a amostra, z_{max} é a amplitude máxima atingida pelo piezo, ω_n são as frequências varridas, t''' é o instante do início das oscilações e z_n é a amplitude de deslocamento associado à frequência ω_n . Como comentado anteriormente, a resposta da amostra deve ser defasada em relação à força aplicada, então a função esperada pelo transdutor de força do AFM é [48]:

$$d(t - t''') - d_0 = d_{relaxed} + \sum_n d_n e^{i\omega_n(t-t''')+\phi_n} \quad (2.37)$$

Onde $d(t)$ é a deflexão sentida pela ponta, d_0 é a deflexão no ponto de contato, ϕ_n é a defasagem correspondente à movimentação do piezo e d_n é a amplitude de deflexão associada à ω_n .

A função indentação correspondente sentida pela amostra durante o *frequency sweep* é [48]:

$$\delta(t - t''') = \delta_{relaxed} + \sum_n \delta_n e^{i\omega_n(t-t''')+\delta_n} \quad (2.38)$$

Onde a função $\delta(t)$ é o histórico de indentação, δ_n é a amplitude de indentação relacionada ao modo vibracional ω_n , e δ_n é a defasagem da indentação em relação ao movimento do piezo z . Aqui utilizamos a relação entre indentação, movimento do piezo z e deflexão do laser termo a termo para obter:

$$\delta_n e^{i\theta_n} = z_n - d_n e^{i\phi_n} \quad (2.39)$$

A partir dessa equação é possível obter a tangente do ângulo de defasagem entre

stress e strain. Também é possível analisar a função indentação pelo modelo de contato de Hertz (melhor explicado na referência [48]) nos retornando os módulos de armazenamento e perda da amostra.

$$E'_n = \text{Re} \left(\frac{F_n}{\lambda \Omega(\lambda) \delta_{relaxed}^{\lambda-1} \delta_n} \right) \quad (2.40)$$

$$E''_n = \text{Im} \left(\frac{F_n}{\lambda \Omega(\lambda) \delta_{relaxed}^{\lambda-1} \delta_n} \right) \quad (2.41)$$

Onde F_n são os coeficientes da expansão de Fourier complexa, E'_n é o módulo elástico de armazenamento e E''_n é o módulo elástico de perda. Com estes dois módulos, podemos obter a tangente de perda, da mesma forma que foi feita com o módulo de cisalhamento, nos retornando as propriedades viscoelásticas do material.

2.3.4.3 Modelos de lei de potência

Anteriormente, foram analisados modelos reológicos cujas funções de relaxação sempre seguem decaimentos exponenciais. Também existem classes de materiais cujas propriedades viscoelásticas são melhor descritas por funções de relaxação tipo lei de potência, que não podem ser definidas por associações de molas e dashpots (a não ser no limite de infinitos elementos[46]). Modelos de lei de potência tem seu formalismo matemático baseado no cálculo fracionário, apresentado na seção 2.2.3.1.

Para essa seção, seguiremos a referência [46], que matematicamente desenvolve um modelo de relaxação tipo lei de potência para materiais viscoelásticos. O modelo de lei de potência simples tem a sua função relaxação dada pela seguinte equação[46]:

$$R_\beta(t) = E_\beta(t_{ref}) \left(\frac{t}{t_{ref}} \right)^{-\beta} \quad (2.42)$$

Com $E_\beta(t_{ref})$ é o módulo elástico em um tempo $t = t_0$, β é o expoente de relaxação entre zero e um, e t_0 é um tempo arbitrário de escalonamento. Onde a função do módulo de elasticidade pode ser definida utilizando a equação:

$$E(t)t^\beta = E(t_{ref})t_{ref}^\beta \quad (2.43)$$

Para medidas dinâmicas, temos o módulo complexo dinâmico de cisalhamento $G^*(f)$ dado por [46]

$$G^* = G_\beta^*(f_0) \left(\frac{f}{f_0} \right)^\beta \quad (2.44)$$

Com f_0 sendo uma frequência arbitrária, $G_\beta^*(f_0) = \Gamma(1 - \beta) * E(t_{ref})t_{ref}^\beta (2\pi f_0 i)^\beta$.

Com o módulo de cisalhamento, temos acesso ao ângulo de defasagem do strain com o stress:

$$\theta = \tan^{-1} \left(\frac{G''}{G'} \right) = \frac{\beta\pi}{2} \quad (2.45)$$

Com G'' e G' sendo os módulos de perda e armazenamento respectivamente, e teta é o ângulo de defasagem. Voltando à referência [48], de Sousa et al. emprega o método funcional com medidas de indentação, logo, o modelo de lei de potência simples é definido por uma função de força de AFM:

$$F(t) = F_{\beta}(t) \quad (2.46)$$

Para

$$0 \leq t \leq \tau_l \quad (2.47)$$

E

$$F(t) = F_{\beta}(t) I \left(\frac{\tau_l}{t}, \lambda, 1 - \beta \right) \quad (2.48)$$

Para

$$t > \tau_l \quad (2.49)$$

Onde

$$F_{\beta}(t) = \lambda \Omega(\lambda) \delta_0^{\lambda} E(\tau_l) B(\lambda, 1 - \beta) \left(\frac{t}{\tau_l} \right)^{\lambda - \beta} \quad (2.50)$$

Com t medido a partir do ponto de contato, τ_l é a duração da aproximação da ponta, δ_0 é a indentação máxima, λ e $\Omega(\lambda)$ são parametros geometricos da ponta, $E(\tau_l)$ é o valor da elasticidade no ponto $t = \tau_l$ e $B(x;n,m)$ é a função Beta incompleta.

Em outro trabalho, de Sousa *et al.*[12] agora formula um modelo de relaxação viscoelástica de dupla lei de potência para análise em células vivas, seguiremos esta publicação para discutir o este modelo.

O modelo de dupla lei de potência é definida por dois expoentes de relaxação e um tempo de transição. Cada expoente de relaxação descreve uma lei de potência com funções relaxação diferentes, onde dependendo do instante do experimento, o efeito da relaxação de um dos expoentes domina em relação ao outro. Esses dois coeficientes são usualmente chamados de coeficiente rápido e coeficiente lento, onde o rápido domina o formato da curva de relaxação no começo do experimento, e o coeficiente lento domina depois. O tempo de transição é o instante do experimento que o expoente de relaxação lento começa a dominar sobre o expoente

rápido. A seguir, temos a função relaxação deste modelo[12]:

$$R(t) = R_\alpha(t) + R_\beta(t) \quad (2.51)$$

Onde as funções $R_\alpha(t)$ e $R_\beta(t)$ são funções relaxação do modelo de lei de potência simples, com seus expoentes de relaxação seguindo $0 < \beta < \alpha < 1$, definindo a resposta lenta (β) e a resposta rápida (α) do material.

Agora que temos dois expoentes de relaxação, isso implica a existência de dois módulos elásticos $E_\alpha(t_{ref})$ e $E_\beta(t_{ref})$, que cada um descreve as respostas rápida e lenta da amostra, respectivamente.

O tempo de transição entre a resposta rápida e a lenta é dado por [12]:

$$t_c = \left[\frac{E_\alpha(t_{ref})t_{ref}^\alpha}{E_\beta(t_{ref})t_{ref}^\beta} \right]^{\frac{1}{\alpha-\beta}} \quad (2.52)$$

E o módulo de cisalhamento dinâmico é descrito no modelo de dupla lei de potência pela seguinte equação:

$$G^*(f) = G_\alpha^* \left(\frac{f}{f_0} \right)^\alpha + G_\beta^* \left(\frac{f}{f_0} \right)^\beta \quad (2.53)$$

Onde G_α^* e G_β^* representam os módulos de cisalhamento dinâmico para uma frequência arbitrária f_0 para os regimes rápido e lento, respectivamente. Importante pontuar também que para o regime de dupla lei de potência, o ângulo de defasagem $\theta = \tan^{-1}(G''/G')$ não é mais constante e depende da frequência.

Seguindo também o método funcional, logo, o modelo deve ser definido por uma função da força, no caso uma curva DFC:

$$F(t) = F_\alpha(t) + F_\beta(t) \quad (2.54)$$

Para

$$0 \leq t \leq \tau_l \quad (2.55)$$

E

$$F(t) = F_\alpha(t)I\left(\frac{\tau_l}{t}, \lambda, 1 - \alpha\right) + F_\beta(t)I\left(\frac{\tau_l}{t}, \lambda, 1 - \beta\right) \quad (2.56)$$

Para

$$t > \tau_l \quad (2.57)$$

2.4 Microscopia Confocal de Fluorescência

O microscópio confocal foi patenteado por Marvin Minsky em 1957[15], e muito se assemelha a microscopia de campo amplo convencional, onde o principal destaque dessa técnica é a habilidade de obter imagens tridimensionais de amostras espessas, desde que sejam translúcidas. A grande maioria dos microscópios confocais atualmente utiliza de fotomultiplicadoras e filtros de comprimento de onda para captar a fluorescência das amostras em questão, pois facilita estudos investigativos de amostras que possuem auto fluorescência, e alternativamente, se torna possível marcar estruturas de interesse com substâncias fluorescentes para melhor estudá-las.

Assim, a microscopia confocal se tornou uma das técnicas mais utilizadas nos campos de análise de material biológico, já que agora não é mais necessário o corte fino de tecidos para análise morfológica, como é necessário na microscopia convencional, e porque a análise fluorescente de componentes marcados em células é muito útil para análise morfológica.

Esta seção é dedicada a explicar como funciona a microscopia confocal de fluorescência. Inicialmente será feito uma revisão do fenômeno da fluorescência, depois explicarei o processo de imunohistoquímica, que é o processo de marcação de elementos específicos da célula com substâncias fluorescentes, e por fim, irei descrever como funciona o microscópio confocal, com seus principais componentes e seu funcionamento.

2.4.1 *Fluorescência*

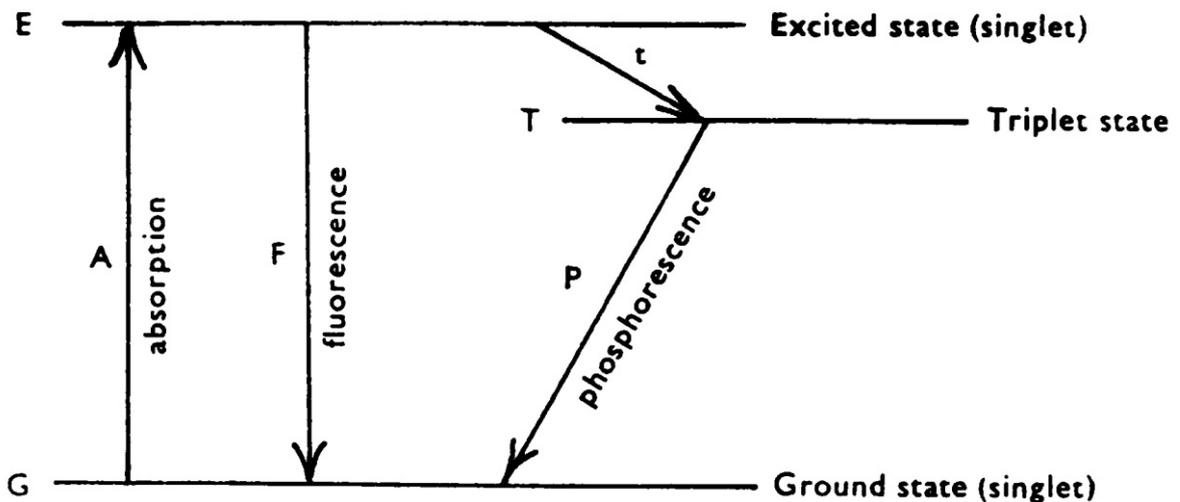
O fenômeno da fluorescência pode ser descrito de forma simplificada como a emissão de luz por um material após absorção de luz. Onde os comprimentos de onda da luz absorvida (excitação) é sempre menor que o comprimento de luz emitida (emissão), onde a fluorescência é definida como a luz emitida nesse processo. A fluorescência é um processo rápido, durando em tempos da ordem de 10^{-8s} [49].

A fluorescência é um fenômeno eletromagnético, onde o fóton da fonte de excitação eleva um elétron de uma molécula fluorescente do seu estado fundamental para seu estado excitado, onde a emissão é o fóton liberado com o movimento de retorno do elétron ao seu estado fundamental

Este movimento do elétron de excitação e decaimento do estado excitado para o estado fundamental não é o único possível, este será explicado a seguir por motivos de completeza. A fosforescência funciona de forma similar à fluorescência, com a adição de um único passo. O elétron ao passar para o estado excitado possui uma probabilidade de mudar seu spin, assim, quando este decai energeticamente, ele vai para um estado intermediário, chamado estado triplete (esse processo é chamado “mecanismo proibido”)[49] onde permanece sem conseguir de-

cair para o estado fundamental por causa do seu spin, que agora é incompatível. O elétron decai apenas quando seu spin no estado tripleto espontaneamente retorna ao spin original, emitindo a chamada fosforescência. A probabilidade desse spin voltar ao normal é relativamente baixa, fazendo a fosforescência ocorrer em tempos muito mais longos que a fluorescência, chegando em segundos e até minutos[49]. A Figura10 mostra um esquema simplificado das transições energéticas possíveis de um elétron em uma molécula.

Figura 10 – Esquema simplificado da fluorescência.



Na figura, linhas horizontais representam níveis energéticos, e estas representam transferências energéticas. G representa o estado fundamental do elétron na molécula. E representa o estado excitado. A representa a energia absorvida pelo elétron para subir para o estado excitado. F é a energia liberada pelo elétron ao voltar para G. t é a energia liberada pelo “mecanismo proibido”. T é o estado tripleto, e P é a energia do fóton liberada pelo decaimento do elétron de T para G. Fonte: referência [49]

Retornando à fluorescência, é um fenômeno observado em uma miríade de materiais, e em compostos orgânicos, ela é correlacionada com moléculas dotadas de longas cadeias de átomos de carbono com ligações alternadas simples e duplas. Isso se dá porque os elétrons das ligações duplas, ou elétrons π , podem se mover livremente pela molécula, formando uma nuvem eletrônica que circula a molécula.

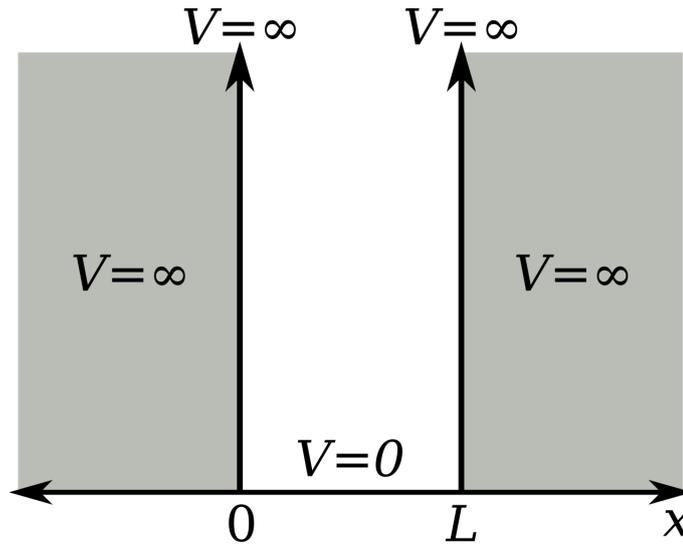
O movimento de um elétron em uma molécula pode ser aproximado por um potencial comumente analisado em cursos introdutórios de mecânica quântica, o poço de potencial infinito, ilustrado na Figura11, elétron percorre livremente cadeias carbônicas mas não além.

De acordo com a 11, L seria o comprimento da cadeia carbônica. Seguindo a comparação, podemos analisar a energia de uma partícula enclausurada nesse potencial:

$$E_n = \frac{n^2 h^2}{8mL^2} \quad (2.58)$$

Com n sendo o nível de energia do sistema, E_n é a energia de cada nível, h é a constante de Planck, m é a massa da partícula e L é a largura do poço. A absorção e emissão

Figura 11 – Potencial tipo poço infinito.



Esse potencial pode ser utilizado para estudar as transferências de energia que definem o fenômeno de fluorescência. Fonte: Próprio Autor

de fótons é realizada entre o nível ocupado mais energético, ou HOMO, e o nível desocupado menos energético, ou LUMO. Para uma cadeia de N átomos de carbono, teremos N elétrons na nuvem eletrônica se movimentando pela molécula, e seguindo o princípio de exclusão de Pauli, estes elétrons ocupam os níveis energéticos em grupos de dois, assim, o nível ocupado mais energético será para:

$$n = \text{int} \left(\frac{N + 1}{2} \right) \quad (2.59)$$

Onde a função $\text{Int}(x)$ retorna a parte inteira de x . Com isso, podemos calcular a diferença entre a energia dos níveis HOMO e LUMO.

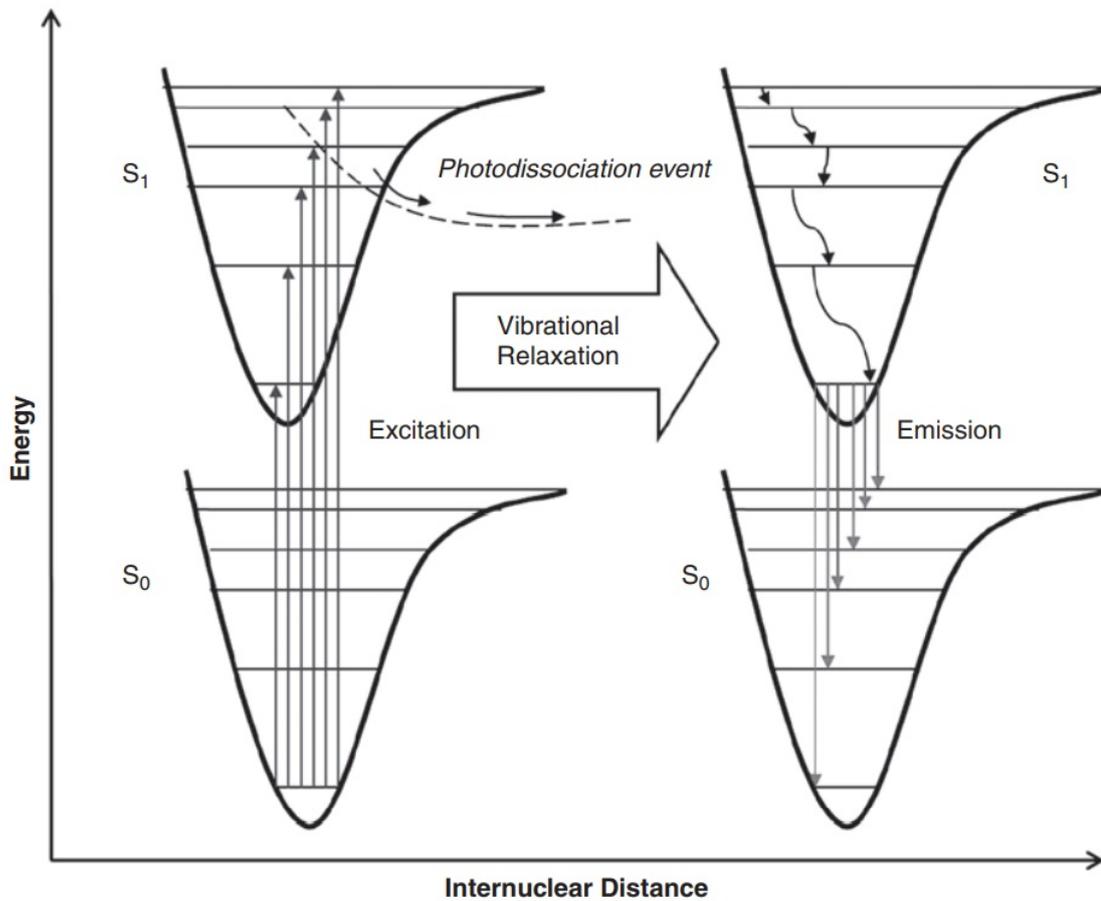
$$E_{LUMO} - E_{HOMO} = \frac{2\text{int} \left(N + \frac{1}{2} \right) + 1}{N^2} \left(\frac{h^2}{8mL^2} \right) \quad (2.60)$$

Analisando a equação, podemos observar que a energia necessária para que o salto quântico ocorra é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia carbônica. Isso pode ser ilustrado na Figura12, onde são apresentadas três moléculas de tamanhos diferentes e seus comprimentos de onda de excitação.

A fluorescência possui uma propriedade que o comprimento de onda emitido pela molécula é sempre maior que o comprimento de onda de excitação, essa propriedade é chamada de defasagem Stokes shift, ou defasagem de Stokes, observado por George Stokes em 1852[50].

O movimento de um elétron pela nuvem eletrônica da molécula que esta influencia diretamente na geometria desta[16], criando novos modos energéticos que descrevem a dissipação de energia por meio das vibrações que a molécula sofre até voltar a uma posição

Figura 13 – Ilustração das transições eletrônicas para emissão de fluorescência.

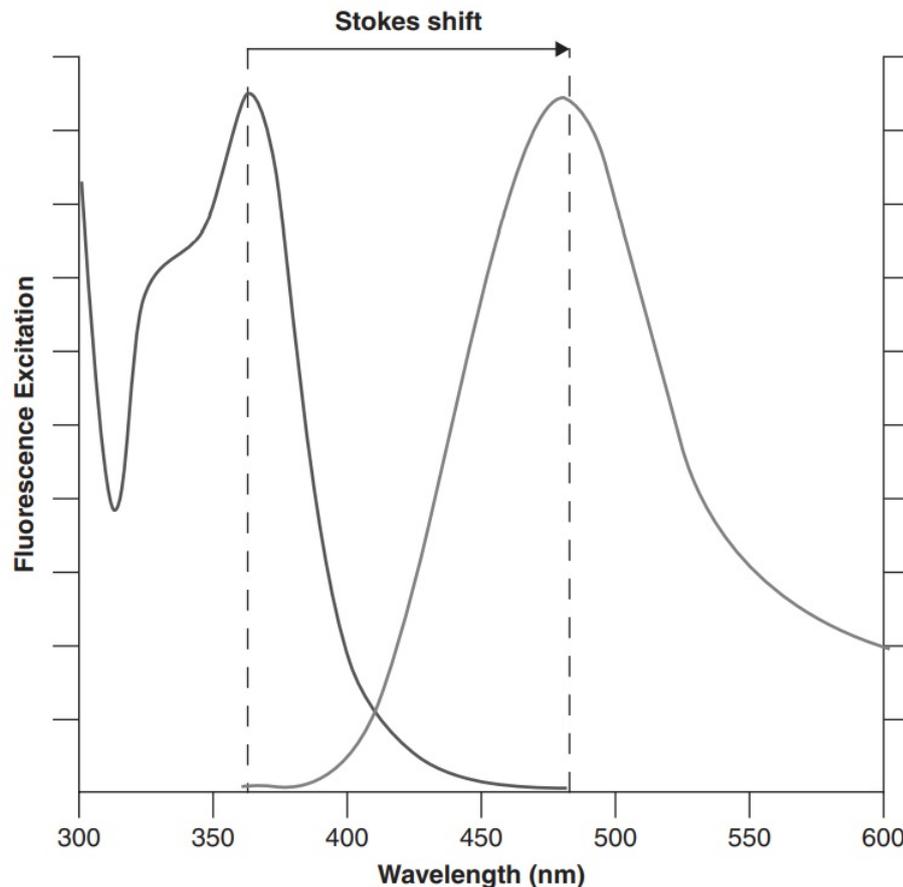


S_0 e S_1 são os estados fundamental e excitado, respectivamente. As curvas da esquerda ilustram a excitação, as curvas da esquerda ilustram a emissão, e as setas correspondem ao “movimento” do elétron pelos níveis energéticos. Fonte: Referência [53]

caírem para o menor modo vibracional do estado excitado, e finalmente, decaindo para os níveis vibracionais do estado fundamental, emitindo luz. Observamos que a Figura 14 que a variação energética é maior durante a excitação do que durante a emissão, ilustrado pelo tamanho das setas, o que significa que o comprimento de onda do fóton emitido é sempre menos energético do que o comprimento de onda da fonte de excitação, ou seja, o comprimento de onda da emissão é sempre maior que o da excitação.

A defasagem de Stokes define o diagrama de Stokes, representado na Figura14, que relaciona o espectro de excitação de uma molécula com seu espectro de emissão. Essa propriedade da fluorescência a torna muito útil em experimentos de microscopia óptica, pois usando um espelho dicróico que filtra certos comprimentos de onda, é possível captar apenas a fluorescência de uma amostra sem que reflexos da fonte de excitação interfiram com a medição. Esse princípio é utilizado em muitos microscópios confocais atualmente, como veremos na seção seguinte

Figura 14 – Representação da defasagem de Stokes



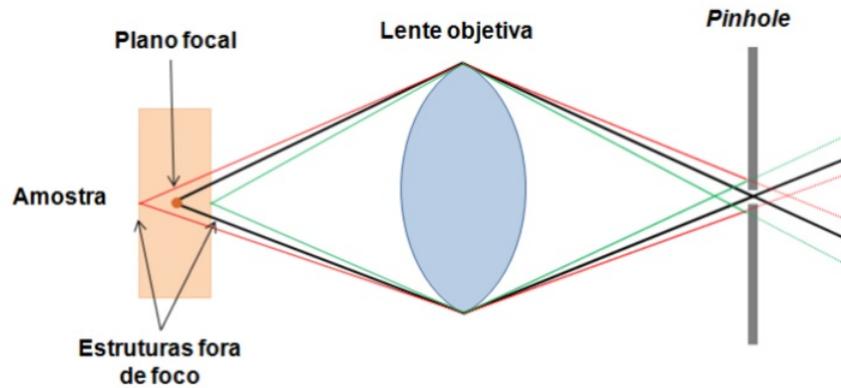
A defasagem é a diferença de comprimento de onda entre o pico de excitação (curva da esquerda) e o pico de emissão (pico da direita). Fonte: Referência [53]

2.4.2 *Microscopia confocal*

O microscópio confocal difere de microscópios convencionais de campo amplo pela sua capacidade de obter imagens de alta resolução de corpos espessos, sem que a luz de outras alturas da amostra interfira. Isso se dá pela inserção de uma pequena abertura de diâmetro controlável antes da objetiva, chamada pinhole. Esta abertura barra o sinal luminoso proveniente de áreas de pouco interesse da amostra, mantendo em foco as estruturas importantes. A Figura 15 apresenta um esquema simplificado do princípio do confocal.

A captação de imagens em microscópios confocais a laser se dá pela varredura do spot do laser lateralmente sobre a amostra, obtendo a fluorescência. Dessa forma, entretanto, durante a varredura, a imagem obtida da amostra também sofreria translação lateral, e o sinal fluorescente de interesse seria totalmente barrado pelo pinhole. Para evitar esse efeito, o movimento lateral do laser é controlado por dois espelhos, um determinando o movimento em x e outro o movimento em y, colocados entre a objetiva e o detector, dessa forma, os caminhos de ida do laser se torna idêntico ao caminho de volta da fluorescência, passando pelos dois espelhos e voltando na mesma direção da fonte de excitação, independente da posição do foco

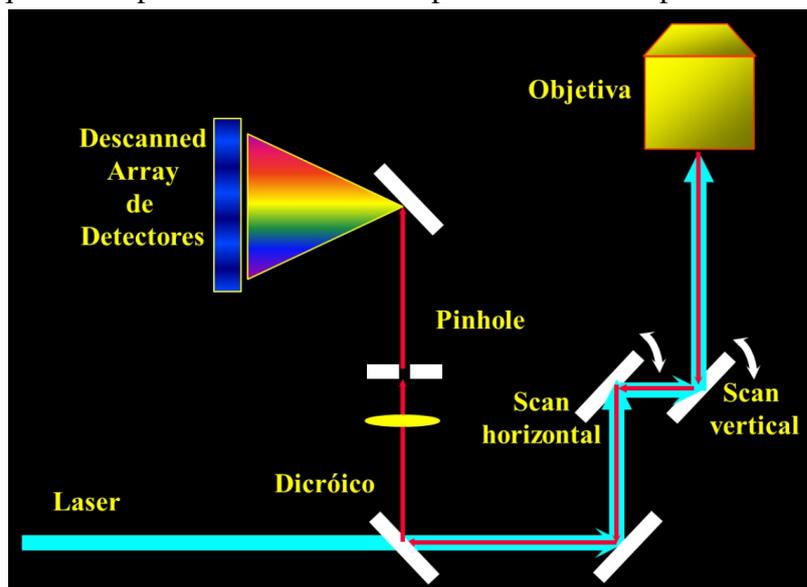
Figura 15 – Esquema simplificado do princípio usado em microscópios confocais.



O sinal luminoso que passa pelo pinhole é apenas proveniente do plano focal da objetiva, onde luz de outras alturas da amostra são barradas. Fonte: Referência [54]

da objetiva. A fluorescência que passa por esses dois espelhos é chamada de “de-scanned”, a Figura 16 ilustra esse processo em um caminho óptico confocal simplificado.

Figura 16 – Esquema simplificado do caminho óptico de microscópios confocais de varredura.



O feixe azul claro é o laser e o vermelho é a fluorescência da amostra. Fonte: Referência [54]

2.4.3 Análise de imagens - Dimensão fractal

A análise de imagens de microscopia sempre vai depender do experimento. Essa análise pode ser meramente qualitativa, como a presença de um certo elemento na amostra, ou quantitativa, como o uso de softwares para análise morfológica. O método de análise das imagens empregados neste trabalho é o da dimensão fractal, que é um parâmetro estrutural muito utilizado na análise morfológica de corpos naturais. Este será utilizado para análise das imagens obtidas pelo imageamento confocal de fluorescência exatamente pela sua propriedade

de medir estruturas altamente complexas como células animais. Já existem na literatura estudos sobre a correlação da dimensão fractal com organização celular[55][56].

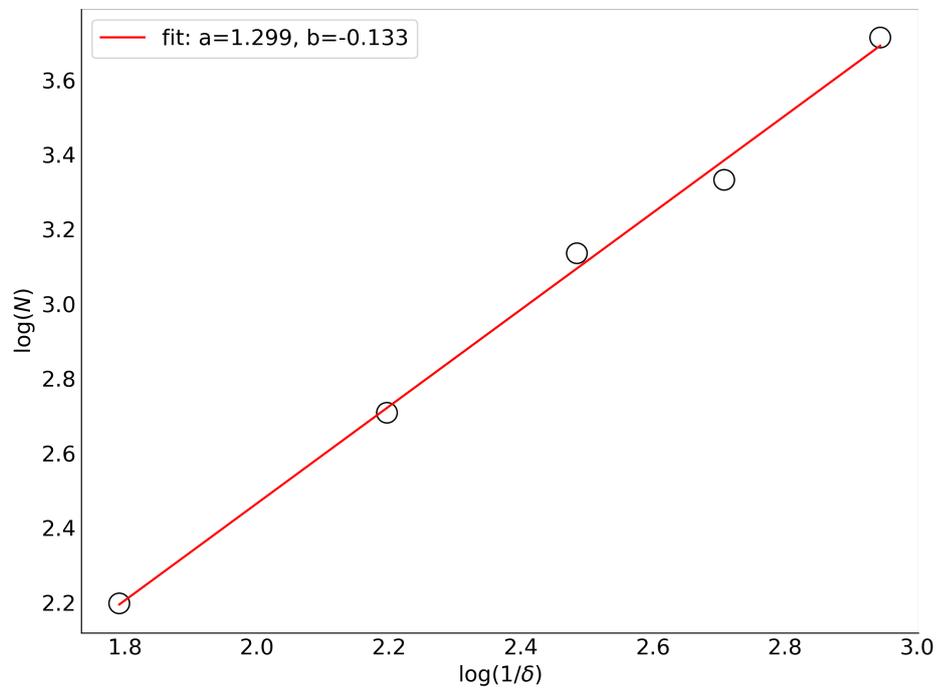
O estudo da geometria fractal foi formalizado por Benoit Mandelbrot em 1983[57], criando uma base teórica para análise de curvas complexas que exibem alguma auto-similaridade intrínseca. Os conceitos básicos da geometria fractal dizem que a natureza não segue uma geometria euclidiana de linhas e pontos. Objetos naturais são imperfeitos, e em muitos casos, essas imperfeições persistem por várias escalas (como ramificações, poros ou rugosidades) fazendo a auto-similaridade um importante aspecto da geometria fractal. O parâmetro criado para este tipo de análise é o da Dimensão Fractal (D), que tem esse nome por não possuir valor inteiro[57]. De forma simplificada, a dimensão fractal (D) pode ser definida como o grau de ocupação de uma imagem sobre um plano[58], e tem valores não inteiros, onde esses valores podem variar de acordo com o corpo analisado: curvas complexas tem D entre 1 e 2, áreas ficam entre 2 e 3 etc.

Existem variados métodos para a obtenção de D. O método utilizado neste trabalho será o de box-counting, que é um dos mais utilizados devido à sua praticidade de fácil aplicação. O método de box-counting em linhas gerais consiste em dividir uma imagem em uma grade quadrada e contar quantos quadrados a imagem ocupa, que é de onde vem o nome da técnica. Esse procedimento é então repetido para diferentes tamanhos dos quadrados, para assim encontrarmos D utilizando a seguinte equação[58];

$$D = \frac{\log \frac{N_2}{N_1}}{\log \frac{1/L_2}{1/L_1}} \quad (2.61)$$

Onde D é a dimensão fractal, N_i representa o número de quadrados que a imagem ocupa, L_i é o comprimento do lado dos quadrados da grade. Esse cálculo repetido várias vezes pode ser expressado em um gráfico $\text{Log}(L) \times \text{Log}(N)$, retornando uma reta com D sendo seu coeficiente de reta. Segundo Coelho e Costa [58], este procedimento pode ser realizado para qualquer estrutura. A Figura 17 ilustra um gráfico usual em análises de dimensão fractal de imagens.

Figura 17 – Exemplo de gráfico obtido em análise de dimensão fractal.



Para esse exemplo, teríamos a dimensão fractal igual a angulação do gráfico $D = 1,299$ Fonte: Próprio autor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados nesta dissertação foram de espectroscopia de força por meio de Microscopia de Força Atômica, para caracterização viscoelástica das células, e microscopia confocal fluorescente para análise morfológica do citoesqueleto de f-actina. Os procedimentos empregados para realização destes experimentos, assim como procedimentos adicionais de tratamento de amostras e fabricação dos géis de poliacrilamida, são descritos neste capítulo.

3.1 Síntese dos Substratos

O material utilizado na fabricação de substratos macios e de rigidez modulável para cultivar os fibroblastos é a poliacrilamida, que é um polímero formado por monômeros de acrilamida e, tendo como agente reticular, a bisacrilamida. Os géis foram sintetizados usando soluções de 40% de acrilamida e concentrações variáveis de bisacrilamida em água milli-q, formando a solução primária de poliacrilamida. 5 ml dessa solução primária foram adicionadas à 100 μ l de uma solução de 10% de persulfato de amônia, 5 μ l de catalisador TEMED, e completada com 3,15 ml de água milli-q, totalizando 10ml de solução final. Essa solução final de poliacrilamida foi então adicionada de butanol, o suficiente para cobrir a superfície do gel, para que este não entrasse em contato com o ar durante seu processo de enrijecimento. A dureza de géis de poliacrilamida é proporcional à concentração de bis-acrilamida na solução primária de poliacrilamida. Foram fabricados géis de durezas distintas, e estes foram nomeados pela sua concentração de bis-acrilamida. Mais especificamente, as seguintes concentrações foram adotadas: 0,01%, 0,1%; e 1.0%.

3.2 Cultura celular

As células estudadas nesta dissertação são provenientes de uma linhagem celular de fibroblastos de ratos (L929). Estas células foram cultivadas seguindo o mesmo protocolo descrito na referência [12]. Os fibroblastos foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de alta glicose, suplementado com 10% de soro de feto bovino e 1% de penicilina-estreptomicina, e incubados a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Antes da realização das medidas no AFM, um terço do meio foi substituído por uma solução de PBS para manter o pH estável fora da incubadora. Todas as medidas foram obtidas em até duas horas após as células serem removidas da incubadora.

3.3 Caracterização viscoelástica

A caracterização viscoelástica das células foi realizada **in vitro**, com a célula imersa em meio de cultura para manter a célula em um ambiente que a mantenha viva e executando suas funções biológicas.

As curvas de força feitas foram adquiridas em um microscópio AFM Asylum MFP3D-BIO acoplado a um microscópio óptico Nikon IX52, e mostrado na Figura18. Foram utilizadas pontas convencionais de constante de mola nominal de 0,080 N/m, com indentador piramidal de altura nominal de 3,5 μm . A constante de mola foi calibrada usando método térmico, e a constante de mola medida diferiu da do valor nominal em cerca de 20%. As medidas de força foram realizadas em temperatura ambiente (25°C) em condições praticamente idênticas para todas amostras. Todos os experimentos em AFM foram feitos em até duas horas após a cultura de célula ser removida do incubadora para minimizar o efeito de evaporação do substrato, e para evitar que mudanças no pH afetem o metabolismo celular. A Figura19 mostra o campo de visão do microscópio incluindo várias células e a extremidade da ponta de AFM. Um total de 10 células por substrato foram caracterizadas para cada tipo de substrato investigado. Em cada célula, 16 curvas de força foram obtidas em uma região quadrada de lado de 4 μm para caracterizar possíveis não-homogeneidades viscoelásticas em cada célula.

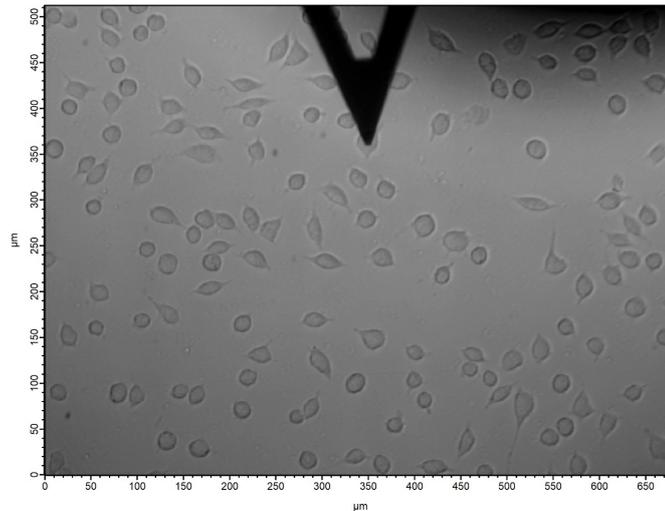
Figura 18 – Foto do microscópio MPF3D-BIO



Este microscópio foi utilizado para fazer as medidas de elasticidade Fonte: Próprio autor

O tipo de curva de força adotada na caracterização das células foi dwell force curve + frequency sweep (DFC+FS) devido a possibilidade de estudar as células simultaneamente no domínio do tempo e das frequências. O AFM foi configurado para realizar a aquisição de dados a uma taxa 10 kHz. Esta taxa permite, em princípio investigar fenômenos em escalas de tempo

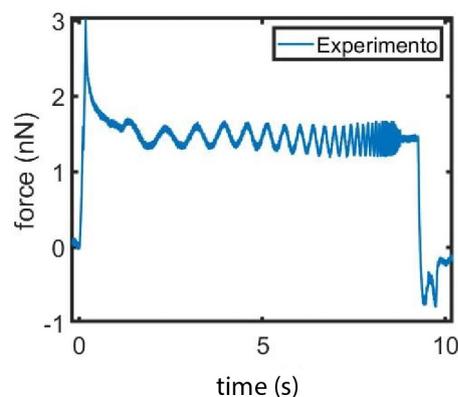
Figura 19 – Arranjo experimental da ponta de AFM sobre as células durante as medidas de de força.



Fonte: Próprio autor.

da ordem de 0.2 milissegundos. As forças máximas aplicadas em cada medida foi de 3 nN. Um curva de força DFC+FS típica medida em uma célula é mostrada na Figura 20.

Figura 20 – Curva de força do tipo DFC+FS típica medida em fibroblastos.

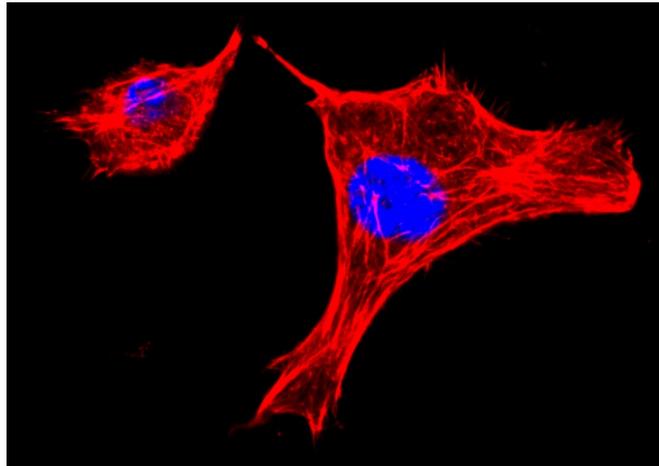


Fonte: Próprio autor.

3.4 Imageamento Confocal e Tratamento de Imagens

Para a obtenção de imagens por fluorescência, as células passaram por um processo de imunohistoquímica, para que as fibras de actina que compõem o citoesqueleto fossem marcadas por fluoróforo. Os fibroblastos foram fixados com uma solução de paraformaldeído com concentração de 4% em PBS. Em seguida, foram permeabilizados com Triton X-100, e então tratados com uma solução 3% de BSA em PBS para bloqueio à temperatura ambiente (25°C). O citoesqueleto de f-actina foi marcado utilizando uma solução 5 $\mu\text{g/ml}$ de phalloidina em PBS e o núcleo foi colorido utilizando o fluoróforo DAPI, na concentração de 100 ng/ml em PBS a Figura21 mostra uma das imagens fluorescentes obtidas.

Figura 21 – Imagens fluorescentes dos fibroblastos L929 cultivados em vidro.



Fonte: Próprio autor.

O microscópio utilizado foi um LSM 710 (Figura 22), e equipado com objetiva Objective Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27. A linha de excitação para obter a fluorescência da rede de actina foi um laser de argônio de comprimento de onda de 488 nm, enquanto a linha de excitação para o núcleo foi um laser contínuo de 405 nm de comprimento de onda. Vale ressaltar que apesar de ter sido feita a marcação do núcleo para o imageamento, este não entrou nas análises morfológicas quantitativas. A marcação do núcleo foi feita exclusivamente para identificar os casos em que duas ou mais células estivessem acopladas, ou em processo de divisão celular, uma vez que o objetivo é caracterizar o citoesqueleto de células isoladas.

Figura 22 – Microscópio confocal Zeiss LSM 710.



Fonte: <<https://www.ufc.br/noticias/noticias-de-2014/5199-central-analitica-instala-mais-um-microscopio-e-amplia-seus-servicos>> acesso em 12/01/2022

Assim como nas medidas de AFM, foram realizadas dez imagens de dez células em cada tipo substrato para análise estatística. Após a exportação das imagens, as imagens foram tratadas para eliminar qualquer ruído da medida utilizando software ImageJ, e posterior determinação da dimensão fractal do citoesqueleto de cada célula utilizando o método computacional "box-counting".

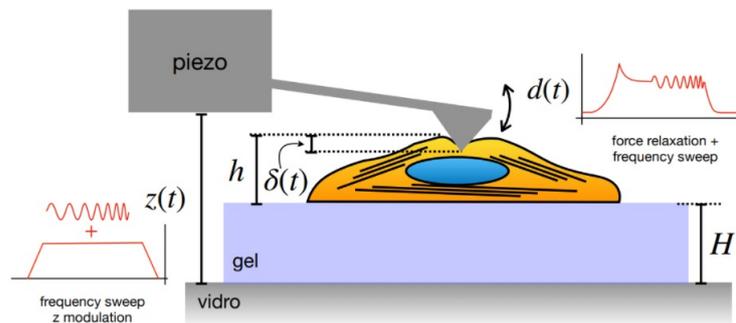
4 RESULTADOS

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos nos procedimentos descritos no capítulo anterior. Será dividido em duas seções, a primeira explicitando os resultados obtidos de microscopia de força atômica, onde foram feitas análises elásticas e viscoelásticas das amostras, e na seção subsequente serão mostradas as imagens obtidas por microscopia confocal, juntamente com a análise da dimensão fractal.

4.1 Medidas no AFM

O procedimento de obtenção de curvas de força e subsequente análise por modelos reológicos empregado nos experimentos de microscopia de força atômica será apresentado a seguir.

Figura 23 – Diagrama esquemático das medida de AFM em células cultivadas sobre substratos macios.



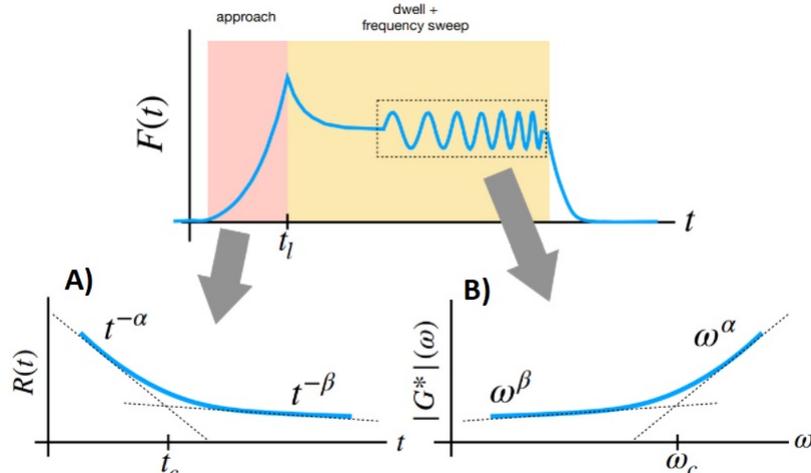
O tipo de curva de força adotado é o DFC-FS (Ver Figura 9). $z(t)$ é a posição do piezo que executa um movimento de uma DFC combinado com um movimento oscilatório de pequena amplitude, $d(t)$ é a deflexão medida pelo AFM, e $\delta(t)$ é indentação resultante nas células. h é a altura da célula (da ordem de μm), e H é a altura do gel (da ordem alguns de milímetros). Fonte: Próprio autor.

Fibroblastos L929 foram cultivados em substratos fabricados de poliacrilamida de durezas variáveis, nomeados de acordo com sua concentração de agente reticular (0,01%, 0,1% e 1%). As medidas de força foram realizadas nos fibroblastos vivos e imersos em meio de cultura. A superfície dos géis foram tratadas com colágeno para facilitar a aderência das células. Também foram estudadas amostras de fibroblastos em vidro e em vidro tratado com colágeno, para visualização de como o colágeno afeta nas medidas. Medidas de AFM também foram realizadas nos géis, para caracterização viscoelástica dos substratos.

Devido à grande quantidade de informações que podem ser obtidas em uma única medida, o tipo de curva de força escolhida para caracterizar as amostras foi a *dwelt force curve* com *frequency sweep* (DFC-FS). Neste tipo de medida, a ponta do AFM se aproxima da amostra

pressionando-a até atingir uma força máxima predeterminada (F_0). Ao atingir a força máxima, a ponta permanece estacionada por um tempo pré-determinado, e em seguida realiza um movimento oscilatório com pequena amplitude e de frequência crescente. A Figura 23 mostra o diagrama esquemático das medidas realizadas com o AFM. A força máxima aplicada nas amostras foi de $F_0 = 3$ nN, e a varredura de frequências inicia 1s após a força máxima ser atingida. As frequências de varredura variam entre 1 Hz e 1 kHz, e a amplitude de oscilação do piezo é de 50 nm. Para análise estatística, foram medidas 10 células em cada substrato, e foram feitas 16 medidas sobre cada célula, distribuídas sobre uma região quadrada de $4\mu\text{m}$ de lado. Por motivos de padronização, todas as medidas foram feitas sobre as partes mais altas das células, identificadas visualmente.

Figura 24 – Estratégia de análise das curvas de forças medidas nas células.

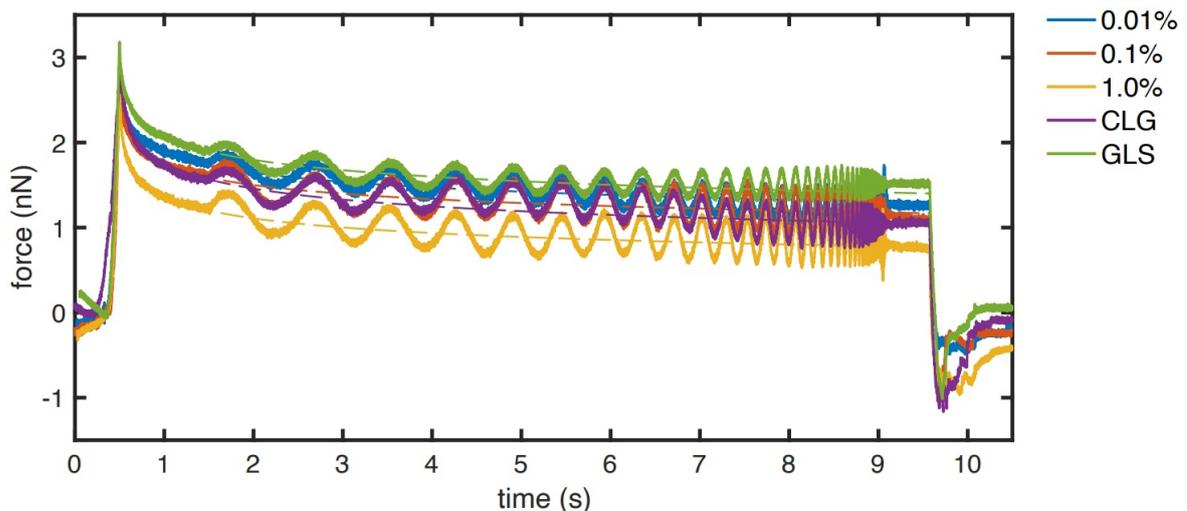


A análise viscoelástica do domínio do tempo é mais concentrada na curva de aproximação, enquanto a análise no domínio das frequências se concentra na porção oscilatória da curva de força. Os gráficos A) e B) ilustram, respectivamente, a função de relaxação viscoelástica $R(t)$ a ser estimada da análise temporal, e o módulo de cisalhamento dinâmico $G^*(\omega)$ a ser obtido da análise espectral. Os regimes de relaxação viscoelástica são caracterizados por dois expoentes distintos α e β ($\alpha > \beta$), t_c é a escala de tempo de cruzamento entre estes regimes. Fonte: Próprio autor

As curvas de força obtidas são analisadas de duas formas distintas: uma análise no domínio do tempo, e outra no domínio da frequência, seguindo a estratégia sugerida na referência [43], e ilustrada na Figura 24. No domínio do tempo, o objetivo é identificar o padrão de relaxação viscoelástica na forma de uma dupla lei de potência. Em células vivas, este tipo de relaxação é definido por dois expoentes de relaxação, cada expoente caracterizando uma resposta do material, uma lenta (β) e uma rápida (α), e um tempo de cruzamento (t_c) entre esses dois regimes. Dado a curtíssima duração do regime de relaxação rápido (da ordem de dezenas de milissegundos), a identificação de dois regimes viscoelásticos é mais provável de ser observado na curva de aproximação. A análise da medida no espaço das frequências concentra-se na porção oscilatória da curva força, da qual se extrai o módulo de cisalhamento dinâmico definido

como $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$, onde $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ representam os módulos de armazenamento e módulo de perda, respectivamente. De acordo com a teoria de deformação linear, a função relaxação em função do tempo $R(t)$ se relaciona com $G^*(\omega)$ por uma transformada de Fourier, e os regimes de relaxação devem aparecer tanto em $R(t)$ quanto em $G^*(\omega)$. A Figura 25 ilustra exemplos típicos de curvas DFC+FS medidas em células cultivadas sobre diferentes substratos.

Figura 25 – Curvas de força medidas em fibroblastos L929 cultivados sobre substratos com durezas diferentes.



0.01%, 0.1% e 1.0% representam géis com diferentes concentrações de bis-acrilamida, CLG representa vidro tratado colágeno, e GLS representa vidro sem nenhum tratamento para facilitar a adesão celular. As linhas tracejadas representam os ajustes de curva realizado com o modelo KVF resolvido no tempo [12, 43]. Fonte: Próprio autor.

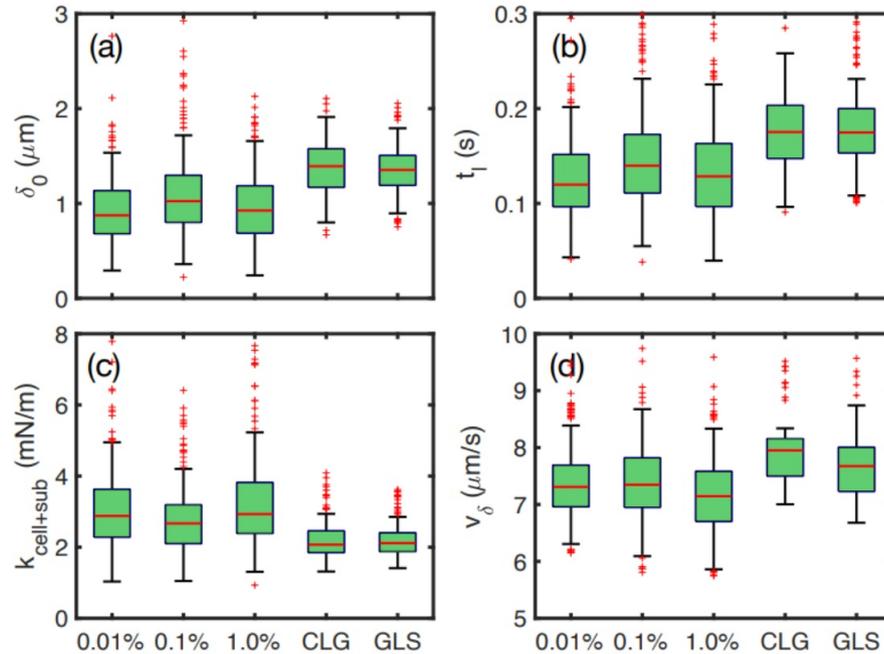
4.1.1 Análise puramente elástica

Analisando apenas a porção de aproximação da curva de força, é possível já observar diferenças nas respostas biomecânicas das células cultivadas nos substratos macios (géis de poli(acrilamida) 0,01%, 0,1% e 1%) e nos substratos rígidos, i.e., vidro tratado com colágeno (CLG) e vidro sem tratamento (GLS). A Figura 26(a) mostra a indentação máxima nos diferentes substratos. Verifica-se uma indentação máxima da ordem de $1 \mu\text{m}$ em células sobre os géis, enquanto nos substratos duros a média foi de aproximadamente $1,4 \mu\text{m}$, 40% a mais do que as células nos géis. Em princípio, isto evidencia que as células ficam mais rígidas em substratos mais macios.

Esse efeito de enrijecimento fica melhor ilustrado considerando a constante de mola efetiva do sistema (célula + substrato), definida como $k_{eff} = F_0/\delta_0$, onde $F_0 = 3 \text{ nN}$, e δ_0 é a indentação máxima em cada realização. Este resultado é mostrado na Figura 26)(c). Apesar de células vivas serem objetos viscoelásticos, com uma simples análise elástica usando a lei de

Hooke, fica claro notar como as células em substratos macios são mais rígidas do que células em vidro, mas não é possível concluir uma tendência clara entre a constante de mola efetiva k_{eff} e a dureza dos géis (controlada pela concentração do agente reticular bis-acrilamida).

Figura 26 – Análise puramente elástica das curvas de força em células sobre diferentes substratos.



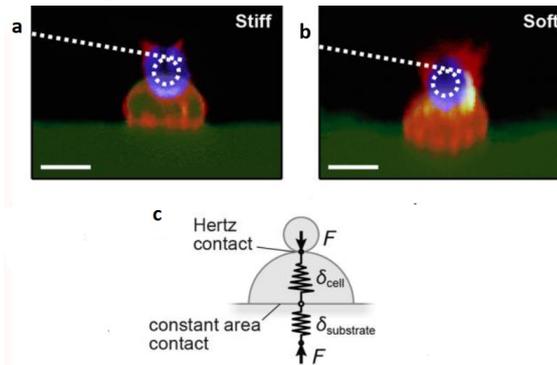
(a) Distribuição das indentações máximas δ_0 obtidas células sujeitas a uma força máximo de $F_0 = 3$ nN. (b) Distribuição dos tempos de aproximação. (c) Constante de mola efetiva do sistema célula + substrato calculada como $k_{eff} = F_0/\delta_0$. (d) Distribuição das velocidades de indentação $v_\delta = \delta_0/t_l$. Foram medidas 10 células em cada tipo de substrato. Em cada célula foram obtidas 16 curvas de forças distribuídas em diferentes pontos das células, totalizando 160 curvas de força para cada tipo de substrato. Fonte: Próprio autor.

A Figura 26(b) mostra a distribuição dos tempos de aproximação t_l , ou seja, o tempo que a ponta leva para atingir a força máxima F_0 na curva de aproximação. Como o transdutor piezoelétrico possui velocidade constante em todos casos, é intuitivo esperar que os tempos de aproximação nas células em substratos macios sejam mais longos do que sobre os substratos rígidos. Contudo observa-se que t_l apresenta o mesmo comportamento comparativo observado na distribuição de δ_0 , sugerindo que a velocidade de indentação $v_\delta = \delta_0/t_l$ seja constante. Mas a Figura 26(d) mostra um dado intrigante: a velocidade de indentação nas células sobre géis é menor que nas células sobre o vidro, apesar de exibirem indentações e tempos de aproximação comparativamente menores. Esta aparente contradição revela a natureza viscoelásticas das células. Mais que isso, revela também que as células possuem resposta biomecânica que dependem do tipo de substrato.

Quando a ponta do AFM aplica uma determinada força sobre a célula a indentação resultante é a combinação de deformações provocadas na célula e no substrato, se este for

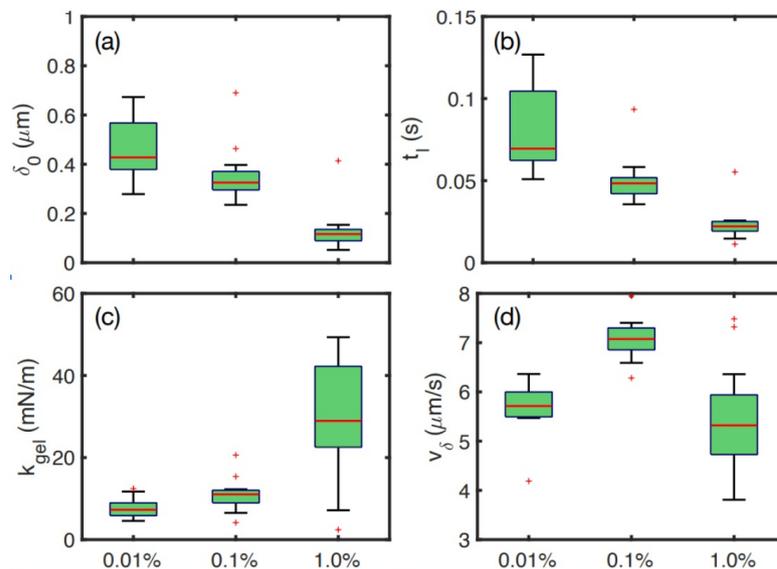
macio. Este efeito, ilustrado na Figura 27, foi demonstrado por Rheinlaender *et al.* utilizando um AFM acoplado a um microscópio confocal em células sobre géis em um estudo análogo ao desta dissertação, mas utilizando indentadores esféricos [59]. Para isolarmos a constante elástica da resposta celular, é necessário caracterizar os géis isoladamente.

Figura 27 – Comparação da indentação de células em substrato rígido e macio usando um indentador esférico por microscopia confocal.



(a) Indentação de célula sobre substrato rígido, no qual se observa que o substrato não sofre indentação. (b) Indentação de célula de mesma linhagem sobre substrato macio, no qual se observa que tanto a célula quanto o substratos são indentados. (c) Modelo de indentação de célula sobre substrato macio descrito por uma associação em série de molas elásticas. Fonte: Adaptada da referência [59].

Figura 28 – Análise elástica das curvas de força sobre os géis com diferentes durezas.



(a) Distribuição das indentações máximas δ_0 obtidas nos géis sujeitos a uma força máximo de $F_0 = 3$ nN. (b) Distribuição dos tempos de aproximação. (c) Constante de mola dos géis calculada como $k_{\text{eff}} = F_0/\delta_0$. (d) Distribuição das velocidades de indentação $v_\delta = \delta_0/t_l$. Foram medidas 16 curvas de força em cada tipo de substrato. Fonte: Próprio autor.

A Figura 28 ilustra os resultados da análise da porção da aproximação das curvas de força medidas somente nos géis. Aqui, as contradições aparentes das medidas realizadas nas células estão ausentes. A resposta elástica dos géis segue a tendência esperada. Quanto maior

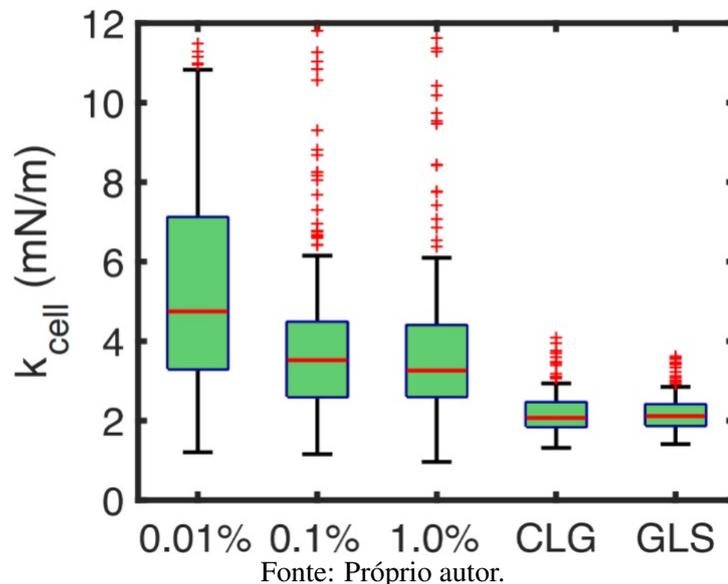
for a concentração de bis-acrilamida, maior a rigidez do gel, e menor a indentação máxima quando os géis são submetidos a forças máximas de 3 nN. As constantes de mola efetiva obtidas são 7,28 nN/m, 11,04 nN/m, e 28,94 nN/m para os géis 0,01%, 0,1% e 1% respectivamente.

Rheinlaender *et al.* supuseram que a indentação total de células em substratos macios pode ser descrita como a deformação de uma associação de molas em série [59], como mostra a ilustração da Figura 27(c). Desta forma, as constantes de mola efetiva dos sistemas célula + substrato mostrados na Figura 26(c) podem ser descritos como:

$$k_{eff} = \frac{k_c k_s}{k_c + k_s}, \quad (4.1)$$

onde k_c é a constante de mola da célula, e k_s é constante de mola do substrato. Note que se o substrato for infinitamente duro (como no caso do vidro), tem-se que $k_s \rightarrow \infty$ e $k_{eff} \rightarrow k_c$. Ou seja, na medidas em célula sobre o vidro, o substrato não deforma, e obtem-se diretamente a constante de mola das células. No caso do vidro tratado com colágeno, assumimos que a camada de colágeno sobre o vidro é muito fina, de forma que o substrato CLG pode ser considerado como infinitamente rígido e com $k_s \rightarrow \infty$. Inserindo-se na equação acima os valores médios para k_s mostrados na Figura 28(c), é possível obter os valores k_c da constante de mola somente das células em cada substrato. Este dados são mostrados na Figura 29.

Figura 29 – Estimativa das constantes de mola das células cultivadas em diferentes substratos.



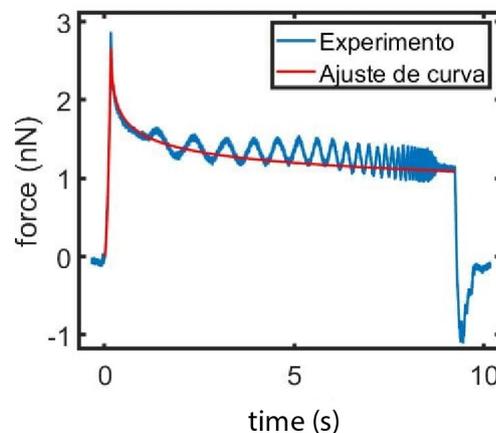
Sem o efeito dos substratos macios, ainda observamos que as células de fato possuem rigidez maior quando cultivadas sobre os géis em comparação com as células sobre vidro. Contudo, agora é possível notar que a rigidez do gel modula a rigidez celular, de forma que quanto menor for a concentração de bis-acrilamida (rigidez do gel), mais rígida a célula se torna. As distribuições de rigidez celular sobre o vidro são estreitas e praticamente idênticas,

indicando que o tratamento com colágeno tem influência desprezível sobre a rigidez celular. Já no caso das células, as distribuições são mais largas indicando que os géis afetam a rigidez de forma heterogênea sobre todo o perímetro celular. Além das células cultivadas sobre os géis se tornarem, em média, cerca de 100% mais rígidas, chama atenção o fato de que não há superposição entre as distribuições de constante de mola de células sobre géis e sobre o vidro. *Estes resultados permitem concluir que as células estão manipulando sua estrutura interna em resposta à dureza do substrato que se encontram.*

4.1.2 Análise viscoelástica no domínio do tempo

Recentemente, foi demonstrado que o modelo viscoelástico de KVF (Kelvin-Voigt fracionário possui) descreve bem as propriedades de relaxação viscoelásticas de células por apresentar dois regimes de relaxação do tipo lei de potência distintos [12, 43, 60]. Apesar do modelo KVF ter sido desenvolvido para a análise de curvas do tipo DFC, foi possível aplicá-lo de forma nas curvas do tipo DFC+FS, devido a pequena amplitude (50 nm) das oscilações imposta na varredura de frequências. A Figura 30 ilustra o ajuste de curva de uma curva de força do tipo DFC+FS com o modelo KVF.

Figura 30 – Curva DFC+FS ajustada com o modelo viscoelástico de dupla lei de potência.

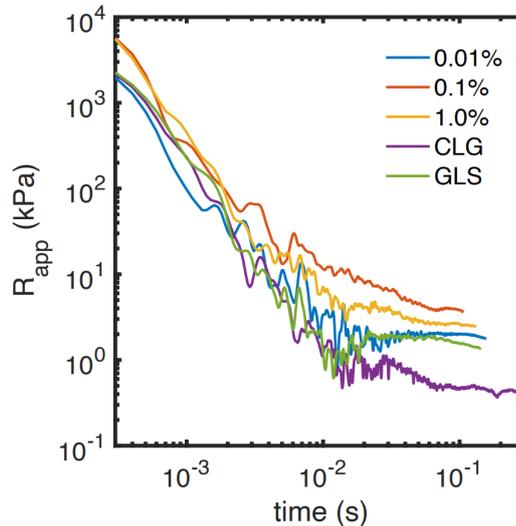


Fonte: próprio autor.

É bem conhecido que as células possuem dois regimes viscoelásticos, um deles exibindo uma relaxação muito rápida e somente visível em escalas de tempo de dezenas de milissegundos, e outro regime de relaxação lenta observável em escalas de tempo mais longas, e da ordem de tempo de duração das funções metabólicas das células. Desta forma, a natureza de dupla lei de potência somente é detectável nas primeiras dezenas de milissegundos da curva de aproximação após a ponta do AFM tocar a superfície da célula. Isto é melhor ilustrado pela Figura 31 que mostra as funções de relaxação aparente $R_{app}(t)$ (ver Equação 2.34) obtidas da porção de aproximação das curvas de força. Estas curvas são as mesmas utilizadas na Figura

25. Observamos que todas as curvas, independente do substrato, possuem formato que se assemelham à Figura 24(a), evidenciando a existência de dois regimes de relaxação viscoelástica nas amostras.

Figura 31 – Curvas de relaxação aparente $R_{app}(t)$ obtidas da porção de aproximação das curvas de força da Figura 25.



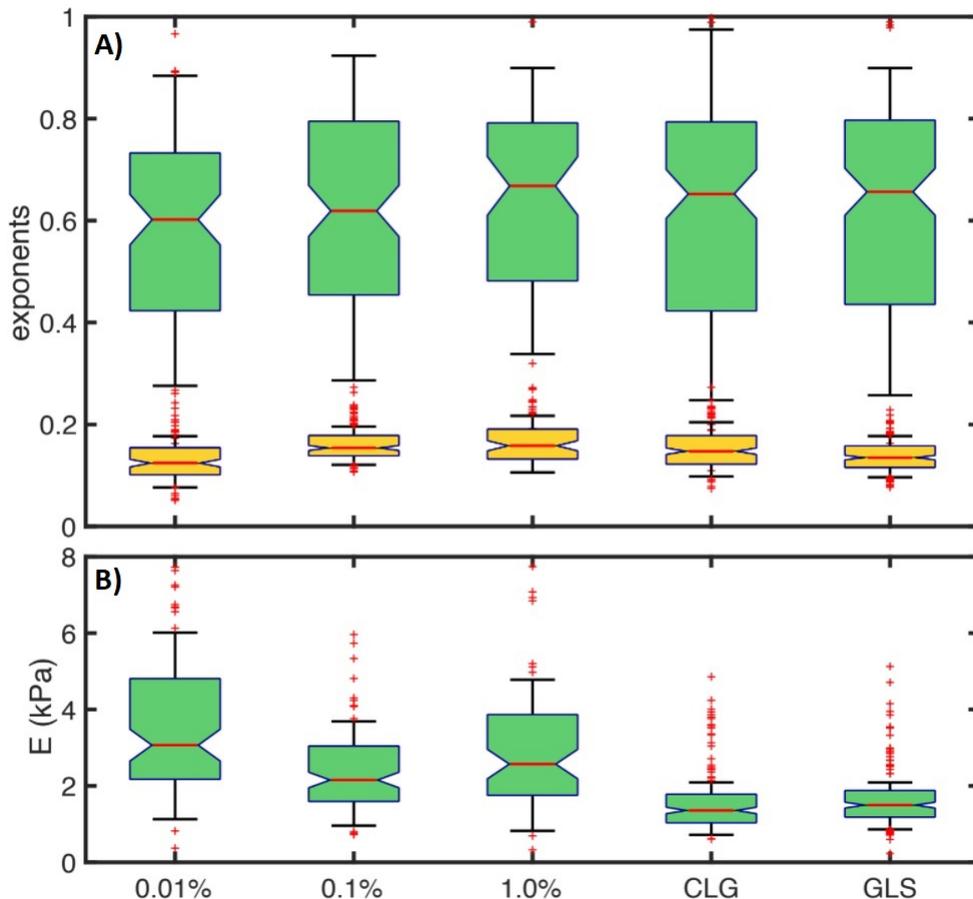
As curvas de relaxação aparente de células sobre diferentes substratos apresentam características compatíveis com a relaxação viscoelástica do tipo dupla lei de potência, conforme ilustrado na Figura 24(A).

A Figura 32(a) ilustra a distribuição dos expoentes de relaxação rápida (caixas verdes) e de relaxação lenta (caixas amarelas). As largas distribuições dos expoentes rápidos são justificadas por pelo fato do regime de relaxação rápida ser dominante durante um período muito curto (poucos milissegundos após o contato) da curva de força, e que contém um número de pontos comparativamente muito menor comparado com a curva de força inteira (duração total de cerca de 10 s). Por esta razão, as distribuições dos expoentes de relaxação lenta (β) são bem mais estreitas. Além disso, é necessário ressaltar que alguns milissegundos após o contato da ponta do AFM com superfície das células está sujeita não apenas a flutuações térmicas das fibras do citoesqueleto mas também a um complexa geometria envolvendo a rugosidade do córtex celular e ao movimento de proteínas de membrana, criando uma área de contato que pode não estar bem definida que, quando combinadas a número reduzido de pontos na curva contribuem para uma distribuição de expoentes alargada. De qualquer forma, A mediana dos expoentes rápidos α varia entre 0,60 e 0,65, dependendo do substrato. Estes valores estão dentro da faixa esperada entre 0,50 e 0,75, que é o intervalo atribuído contribuição entrópica da flutuação térmica das fibras individuais do citoesqueleto de f-actina previamente reportados [12, 60]. Já os valores medianos dos expoentes de relaxação lenta variam entre 0,15 e 0,20 dependendo do tipo de substrato. Estes valores estão coerentes com valores dos expoentes de relaxação lenta de células vivas [12, 26, 61, 62]. A distribuição estreita dos expoentes lentos

demonstram um caráter homogêneo do comportamento viscoelástico das células.

Do ponto de vista do efeito dos diferentes substratos, os expoentes rápido e lento apresentam o mesmo comportamento geral: os expoentes crescem à medida que a rigidez do substrato aumenta. De acordo com a teoria da reologia fracionária, os expoentes variam entre 0 e 1 e representam os limites do comportamento puramente elástico e puramente viscoso, respectivamente. Expoentes intermediários representam materiais viscoelástico. Desta forma, é possível concluir que a rigidez do substrato modifica a resposta viscoelástica das células. No caso específico das células sobre os géis, o aumento da rigidez do gel induz um aumento na fluidização das células. No caso específico das células sobre o vidro, o colágeno também induz um aumento da fluidização do citoesqueleto, observado pelo comportamento do expoente de relaxação lenta, em comparação com o vidro não tratado. No caso dos expoentes rápidos, não há diferença estatística entre os expoentes das células sobre vidro.

Figura 32 – Parâmetros viscoelásticos de fibroblastos L929 cultivados em diferentes substratos obtidos pela análise temporal das curvas de força.



(a) Distribuição dos expoentes de relaxação rápida (caixas verdes) e relaxação lenta (caixas amarelas).

(b) Módulo de rigidez referente ao regime de relaxação lenta $E_{\beta}(t_{ref})$ padronizado para $t_{ref} = 1$ s.

A Figura 32(b) mostra a comparação das distribuições dos módulos de rigidez referente ao regime de relaxação lenta $E_{\beta}(t_{ref})$, e padronizados para um tempo de referência de

$t_{ref} = 1$ s para facilitar a comparação entre as diferentes amostras. Assim como na análise puramente elástica, as células cultivadas em gel são mais rígidas do que células cultivadas sobre em vidro. Observa-se também as distribuições dos módulos elásticos exibem o mesmo comportamento comparativo das constantes de mola efetiva k_{eff} do sistema célula + substrato exibidos na Figura 24(c). Isto indica que os parâmetros viscoelásticos obtidos na Figura 32 são, na verdade, parâmetros efetivos do sistema células + substrato, pelo menos no que diz respeito aos módulos elásticos, pois uma caracterização viscoelástica dos géis de poli(acrilamida) mostram que eles possuem um expoente de relaxação lenta muito pequeno $\beta \rightarrow 0$, exibindo um comportamento predominantemente elástico [63]. Desta forma, acredita-se que os expoentes de relaxação viscoelástica mostrados na Figura 32(a) são devidos a resposta viscoelástica das células e não do sistema células + substrato.

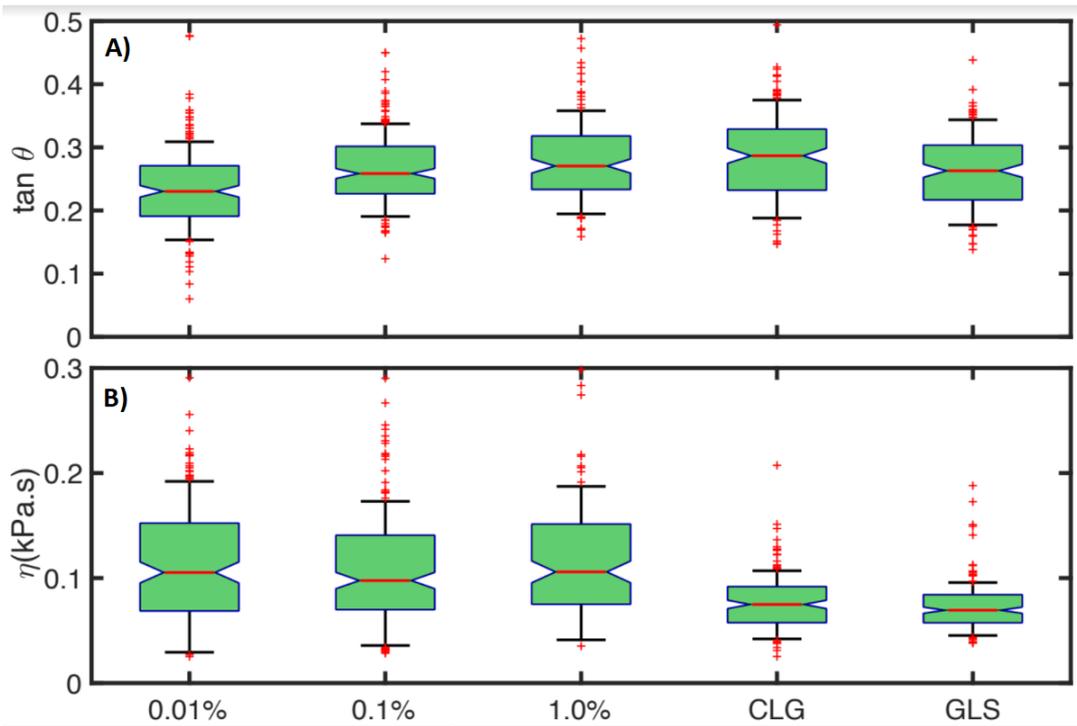
Ainda no contexto do modelo viscoelástico Kelvin-Voigt fracionário, é possível obter outras quantidades físicas importantes que podem iluminar a compreensão do efeito do substrato: o ângulo de fase $\tan \theta(\tau^{-1})$ que indicam o grau de fluidez das amostras, e viscosidade dinâmica $\eta(\tau^{-1})$, onde τ^{-1} é a frequência angular do cruzamento entre os regimes de relaxação lenta e rápida. É importante ressaltar que a escala de tempo τ depende das células. A definição analítica desses parâmetros é melhor explicada na referência [12]. Estas quantidades são mostradas na Figura 33.

Em materiais puramente elásticos tem-se que $\theta = 0$, enquanto em materiais puramente viscosos tem-se que $\theta = \pi/2$. Quando $\theta = \pi/4$, a amostra apresenta comportamento igualmente elástico e viscoso. A Figura 33(a) mostra a tendência geral que um aumento de rigidez no substrato induz um aumento do caráter viscoso das células. Esta mesma tendência já foi mostrada pela distribuição dos expoentes de relaxação mostrados na Figura 32(a). Também, as células cultivadas sobre os géis exibem maior viscosidade interna quando comparadas com células sobre vidro, como mostrado na Figura 33(b). Além disso, a distribuição das viscosidades exibe o mesmo comportamento comparativo das distribuições dos módulos de rigidez E_β e da constante de mola efetiva k_{eff} .

4.1.3 *Análise viscoelástica resolvida no espaço das frequências*

Todas as curvas de força adotadas neste trabalho são do tipo DFC+FS com varredura de frequências entre 1 Hz e 1 kHz. Contudo, observou-se que a ponta oscilando em contato com o sistema célula + substrato cria um efeito similar ao aumento da massa acoplada a um sistema massa-mola ressonante, que reduz a frequência de ressonância da ponta de AFM fazendo-o coincidir com a região de ruído acústico do ambiente onde as medidas foram realizadas. Desta forma, a resposta mecânica para frequências acima de 200 Hz é mitigada pelo ruído acústico, comprometendo a confiabilidades do resultados nas altas frequências. Desta forma, a análise

Figura 33 – Distribuição dos ângulos de fase e da viscosidade interna de fibroblastos cultivados sobre diferentes substratos.



(a) Distribuição dos ângulos de fase $\omega = \tau^{-1}$. (b) Distribuição das viscosidades dinâmicas para $\omega = \tau^{-1}$. Fonte: Próprio autor.

dos resultados desta dissertação limita-se na intervalo entre 1 Hz e 100 Hz.

A Figura 34 mostra o módulo de cisalhamento dinâmico de células em diferentes substratos. Estas curvas foram construídas a partir da porção oscilantes das curvas de força exibidas na Figura 25. Todas curvas de $|G^*(\omega)|$ exibem características compatíveis com uma dupla lei de potência no espaço das frequências conforme sugerido no diagrama esquemático da Figura 24. O regime de baixo expoente na região de baixas frequências (de 1 Hz a 10 Hz), que corresponde a regime de relaxação viscoelástica lenta. O regime de alto expoente na faixa de frequências maiores (entre 10 Hz e 100 Hz), que corresponde ao regime de relaxação rápida. Também é possível observar que as células possuem módulos de cisalhamento que dependem fortemente do tipo de substrato. Separando-se as componentes de armazenamento ($G'(\omega)$) e de perda ($G''(\omega)$) também observa-se características compatíveis com uma dupla leis de potência, e que tanto os módulos de armazenamento e perda dependem do tipo de substrato.

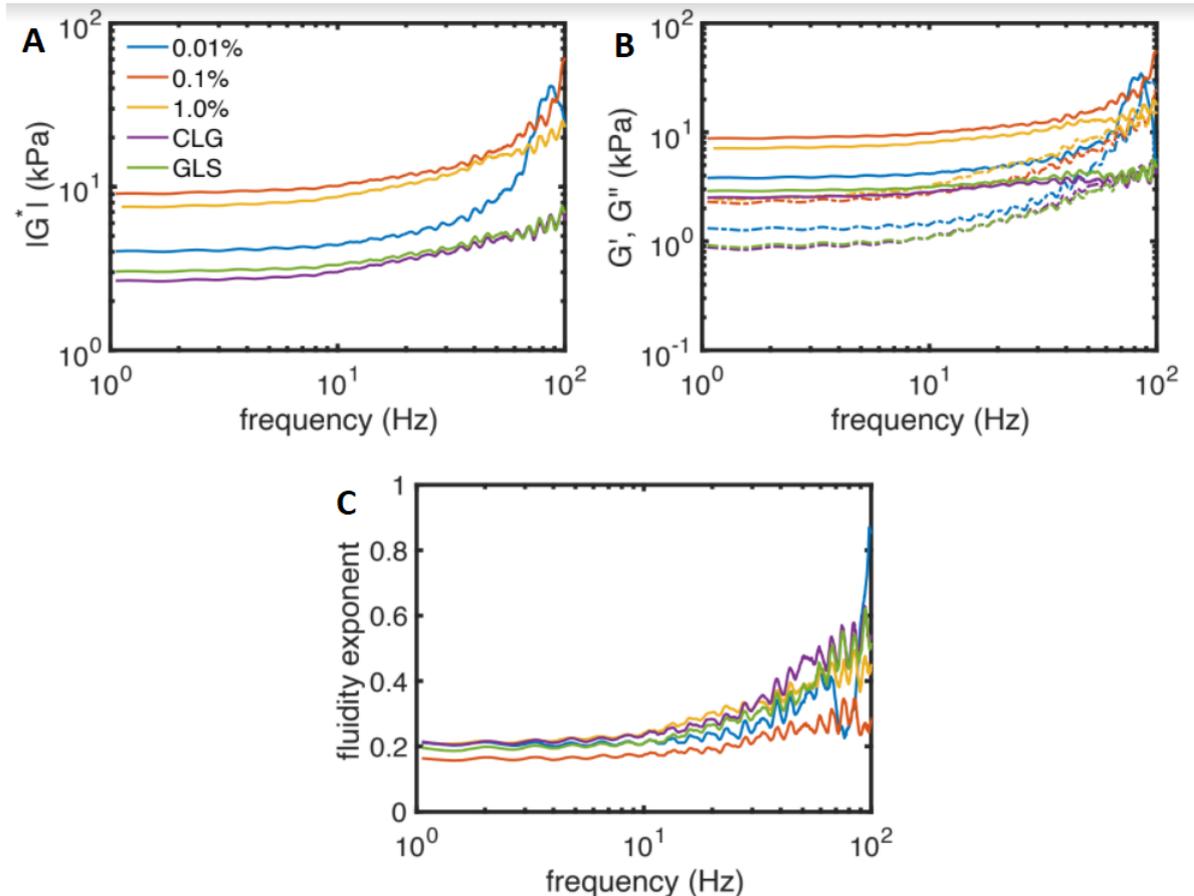
De acordo com a teoria viscoelástica de materiais que relaxam de acordo com apenas uma lei de potência, é possível determinar um expoente de fluidez dinâmico γ a partir das curvas de $G'(\omega)$ e de $G''(\omega)$ da seguinte forma:

$$\gamma = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \left(\frac{G''}{G'} \right). \quad (4.2)$$

O expoente γ ($0 \leq \gamma \leq 1$) é equivalente ao expoente de relaxação no tempo (ver seção 2.2.3.1) de forma que $\gamma = 0$ indica um material puramente elástico, e $\gamma = 1$, um material puramente viscoso. A Figura 34(c) mostra que os os expoentes dinâmicos variam de aproximadamente de 0,2 nas baixas frequências até 0,6 em 100 Hz. Estes valores estão de acordo com os valores estimados pelo modelo viscoelástico KVF obtidos da análise das curvas de força no domínio do tempo e mostrados na Figura 32(a). Como a análise dinâmica não envolve nenhum parâmetro de ajuste, mas apenas a transformação das curvas no domínio do tempo para o domínio das frequências através da aplicação da transformada de Fourier, este resultado mais uma vez reforça a validade do modelo KVF para descrever a relaxação viscoelástica das células.

Para facilitar a comparação entre os substratos, os parâmetros dinâmicos para uma frequência de 1 Hz, representativa do comportamento de viscoelástico dentro da escala de tempo de relaxação lenta, são mostrados na Figura 35. É possível observar que os valores de G' das células no gel são substancialmente maiores (aproximadamente 100%) que das células no vidro, e que não há nenhuma superposição entre as distribuições. Já os valores de G'' são apenas cerca de 50% maiores nas células sobre géis que nas células sobre o vidro. Isto indica que as modificações induzidas pelos géis no interior das células são mais significativas nos componente celulares que contribuem com a resposta elástica, ou seja, no citoesqueleto de f-actina. Finalmente, o expoente de fluidez indica que a fluidez das células aumenta com a rigidez do substrato. Os valores aqui obtidos estão em bom acordo com expoentes de relaxação lenta

Figura 34 – Módulo de cisalhamento dinâmico de fibroblastos cultivados em diferentes substratos.



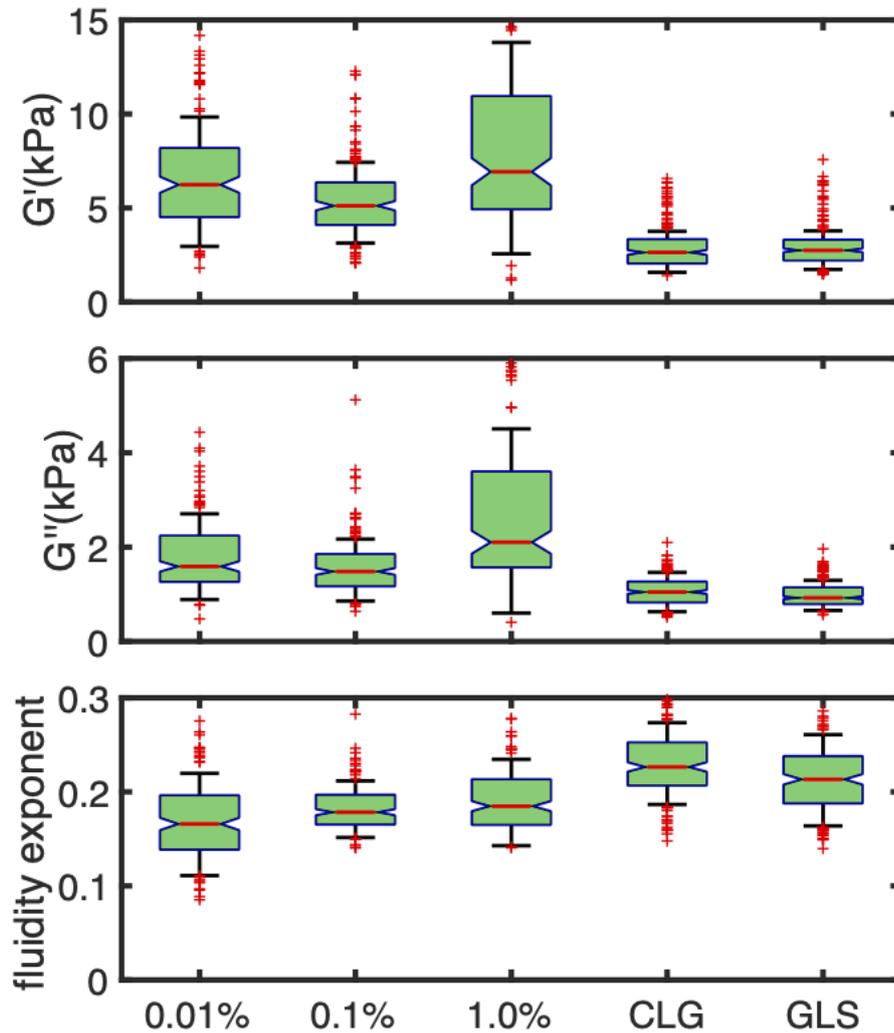
(a) Módulo de cisalhamento dinâmico $|G^*(\omega)|$ construídos a partir das curvas de força da Figura 25. (b) Módulos dinâmicos de armazenamento $G'(\omega)$ (linhas contínuas) e de perda $G''(\omega)$ (linhas tracejadas). (c) Exponente de fluidez construídos a partir das curvas de $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$. Fonte: Próprio autor.

obtidos para células sobre géis mostrados na Figura 32(a). Contudo, os valores do expoente dinâmico estão ligeiramente maiores do que os valores obtidos pela análise temporal das curvas de força.

4.2 Microscopia confocal

A Figura 36 mostra imagens confocais de fluorescência do citoesqueleto de f-actina de fibroblastos L929 cultivados em diferentes substratos. Nos substratos 0,01% e 0,1% (Figura 36(a) e (b), respectivamente) praticamente não são observados filamentos de actina, e o contorno da célula não parece bem definido. Nestes substratos a actina não parece polimerizada (pelo menos no plano da imagem) o suficiente para formação de longas fibras. Em vez disso, observa-se pequenos aglomerados espalhados pelo citoplasma, e mais numerosos no substrato mais macio (0,01%). No substrato 1% já se observa longas fibras de actina no interior da célula, bem como uma delimitação mais clara do perímetro celular por longas fibras de f-actina. Já no vidro, podemos ver todo o limite da célula bem definido e temos a presença de longas fibras em

Figura 35 – Comparação da reologia dinâmica de células em diferentes substratos.

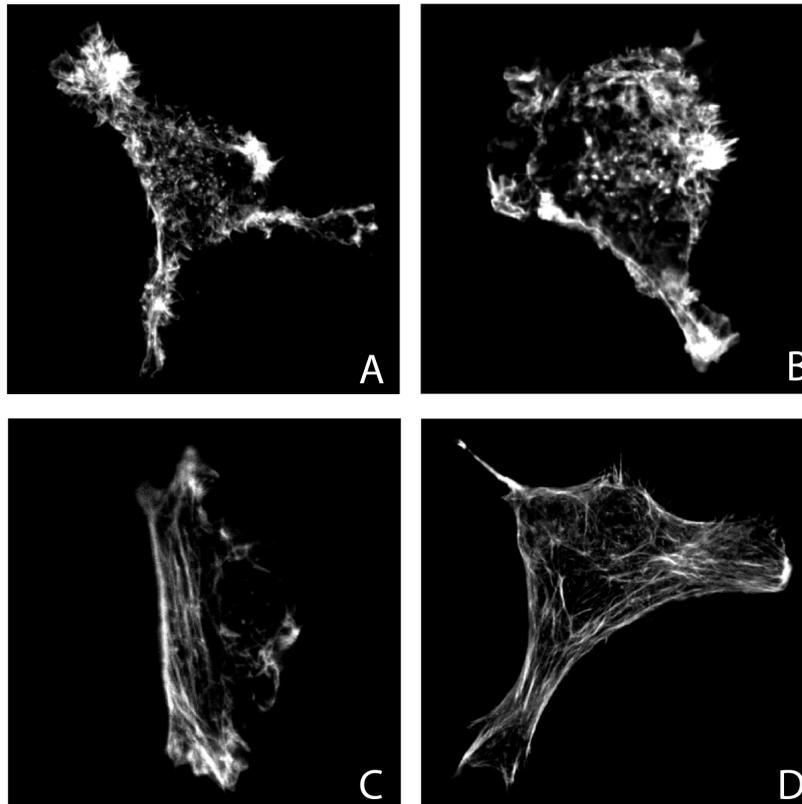


Parâmetros reológico obtidos para frequência de 1Hz. Fonte: Próprio autor.

todo o interior da célula. Um comportamento similar do citoesqueleto de célula sobre substratos macios foi reportado por Gupta *et al.* [8]. A Figura 36 claramente mostra diferentes padrões de organização do citoesqueleto para diferentes tipos de substrato.

As imagens de microscopia confocal foram então tratadas utilizando o software ImageJ, onde inicialmente foi retirado o núcleo da imagem das células para não afetar a análise. Em seguida foi imposto um *threshold* para eliminar qualquer tipo de sinal luminoso indesejável para a medida, como excesso de fluoróforo, fragmentos de células mortas ou ruído. O *threshold* essencialmente impõe um limite de intensidade de cor nos pixels de uma imagem, de tal forma que se um pixel tem luminosidade mais baixa que esse limite, ele é traduzido como um pixel preto, e se um pixel tem luminosidade maior que o imposto pelo *threshold*, este é traduzido para um pixel branco. O *threshold* foi escolhido pelo método de Otsu [64] e padronizado para todas as imagens. As imagens tratadas foram então analisadas para obtenção da dimensão

Figura 36 – Rede de actina de fibroblastos L929 em substratos de durezas diferentes.

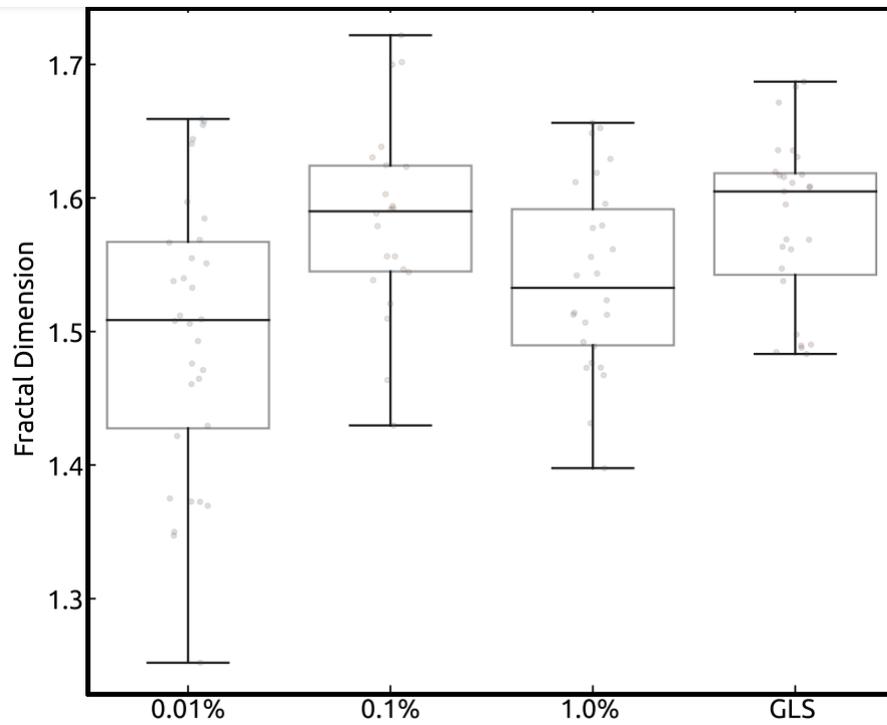


Imagens das células após retirada do núcleo. Estes são exemplos de células cultivadas nos seguintes meios: (A): 0,01%. (B): 0,1%. (C): 1%. (D): Vidro. Fonte: próprio autor

fractal, obtido pelo método computacional de *box-counting*. Este método consiste em sobrepor a imagem com uma grade quadrada de lado conhecido L e contar quantos quadrados apresentam luminosidade N , e depois fazer o mesmo processo para valores diferentes de L . Este tipo de análise morfológica foi empregada anteriormente no estudo de imagens de células [35, 55, 56].

As distribuições das dimensões fractais D calculadas para células cultivadas em diferentes substratos são mostradas na Figura 37. As medianas de D variam entre 1,5 e 1,7, e mostram uma clara tendência de crescimento com a rigidez do substrato, e que o grau de organização do citoesqueleto visualmente observado na Figura 36 pode ser capturado pelo parâmetro morfológico dimensão fractal.

Figura 37 – Dimensão fractal do citoesqueleto de de f-actina de células cultivadas em diferentes substratos.



Fonte: próprio autor

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A caracterização viscoelástica de fibroblastos L929 em substratos de durezas diferentes foi realizada de três formas diferentes: (i) uma análise puramente elástica das amostras, (ii) com a análise viscoelástica das curvas de força resolvida no tempo, e com (iii) a análise viscoelástica no espaço das frequências.

A análise puramente elástica, ou seja, considerando todo o sistema como uma mola hookeana e determinando a constante de mola efetiva do sistema, mostrou que as células sobre os géis são aparentemente mais rígidas do que sobre vidro. Contudo, Rheinlaeder *et al.* mostraram que tanto a células quanto o substrato macio se deformam quando sujeitos a uma força externa, e que o sistema composto de célula sobre substratos macios podem ser descritos por uma associação em série de molas hookeanas. Adotando-se este modelo, e removendo o efeito do substrato, foi possível confirmar que as células sobre os géis se tornam mais rígidas quem em vidro, e que a rigidez da célula é inversamente proporcional à dureza do substrato. Estes resultados são mostrado na Figura 29. Como o mesmo tipo de linhagem celular foi usada em todos os substratos estudados, é possível concluir que a células adaptaram sua estrutura interna à rigidez do substrato. Esta adaptação é visualmente observada nas imagens confocais típicas do citoesqueleto de f-actina mostradas na Figura 36.

A análise das curvas de força DFC+FS no domínio do tempo mostraram que as células exibem um padrão de relaxação viscoelástica compatível como uma dupla lei de potência formada por um regime de relaxação rápida com expoentes da ordem de 0.65, e um regime de relaxação lenta descrita por expoentes da ordem de 0.2. Este padrão de relaxação é observado nas curvas de relaxação aparente $R_{app}(t)$ mostrado na Figura 25. É necessário lembrar que $R_{app}(t)$ possui os mesmos expoentes de relaxação da curva relaxação intrínseca $R(t)$, mas estas duas quantidades não são idênticas, pois $R_{app}(t)$ embute o efeito do contato entre indentador e amostra [43].

A Relaxação com duas leis de potência é um fenômeno bem conhecido da biomecânica celular [12, 60, 61, 62, 65]. Ela foi originalmente observada somente em experimentos de reologia dinâmica, mas sua observação no domínio do tempo só foi reportada recentemente [12, 43]. Nesta dissertação, este comportamento foi observado tanto no domínio do tempo quando no domínio das frequências para as células em todos os substratos estudados, conforme mostrado nas Figuras 25 e 34.

Cada um destes regimes viscoelásticos corresponde à um mecanismo de sustentação celular diferente [61]. O regime de relaxação rápida é geralmente atribuído à flutuações termodinâmicas das fibras de f-actina no córtex celular, que é uma fina estrutura feita de actina

filamentosa situada abaixo da membrana plasmática e que envolve toda a célula. O regimes de relaxação lenta descreve o caráter transiente dos rearranjos poliméricos das fibras do citoesqueleto e do movimento das organelas no citosol. A Figura 32(a) ilustra a diferença entre estes expoentes.

A análise estatística dos expoentes viscoelásticos mostram dois pontos interessantes: os expoentes apresentam aproximadamente a mesma variação entre substratos, sugerindo que a mudança do ambiente externo da célula afeta na organização do córtex celular assim como do restante do citoesqueleto igualmente; e que em géis a tendência dos expoentes é crescer de acordo com a dureza dos géis de poliacrilamida, sugerindo que o aumento da rigidez dos géis aumenta o caráter viscoso das células. O aumento do caráter viscoso é manifestado por um aumento nos expoentes de relaxação lenta e rápida e no ângulo de fase, conforme mostrado nas Figuras 32(a) e 33(a). A discrepância das largas distribuições ocorrem porque a região da curva de força na qual o regime de relaxação rápida domina é de apenas dezenas de milissegundos, sendo muito mais susceptível a imprecisões do que a totalidade da curva força dominada pela o regime de relaxação lenta.

Verificou-se também que o módulo de rigidez das células exibe o mesmo padrão da constante de mola, ou seja, as células cultivadas em géis apresentam uma rigidez aparente maior do que as células cultivadas sobre vidro. Seguindo a mesma tendência, a viscosidade interna das células sobre os géis é maior do que das células sobre vidro.

É importante ressaltar que todas as curvas de força foram ajustadas com o modelo viscoelástico de Kelvin-Voigt fracionário deduzido para amostras viscoelásticas infinitamente espessas ((ver equações 2.54 até 2.57)). Contudo as células são finas e possuem espessura da ordem de $5 \mu m$ no ponto mais alto. Desta forma, os parâmetros viscoelásticos extraído com este modelo podem embutir algum grau de efeito do substrato, do mesmo jeito que no caso da constante de mola efetiva do sistema célula + substrato. Como exemplo, observa-se que os módulos de rigidez e viscosidade interna das células não possuem qualquer tendência clara em relação a concentração de bis-acrilamida, e seus comportamentos assemelham-se às distribuições de k_{eff} . Este autor desconhece modelos viscoelásticos que levem em conta a espessura das amostras.

O estudo da viscoelasticidade no espaço das frequências foi realizado por meio do módulo de cisalhamento dinâmico $|G^*(\omega)|$. Os valores de G' e G'' para baixas frequências (1 Hz) confirmam que as células sobre os géis são mais rígidas do que sobre vidro, e que o aumento em G' devido aos géis é substancialmente maior que em G'' , sugerindo que o aumento de rigidez das células se dá principalmente nos componentes do citoesqueleto que contribuem para o comportamento elástico das células. A hipótese mais plausível é que os géis induzem modificações no citoesqueleto, como observado na Figura 36.

Por fim, as Figuras 34 e 35 mostram que o expoente de fluidez dinâmico concorda qualitativamente com o modelo de dupla lei de potência. Para baixas frequências (1 Hz a 10 Hz), observa-se valores da ordem de 0,2 e que crescem com a concentração de bis-acrilamida no géis, e para altas frequências o expoente é da ordem de 0,6. A discordância entre as caracterizações nos domínios do tempo e da frequência é que, neste último, o expoente de fluidez dinâmico indica que as células sobre o vidro são exibem fluidez maior que as células sobre os géis. No domínio do tempo esta tendência não ficou muito clara.

Os dados obtidos pela análise viscoelástica puderam ser complementados pelos parâmetros de dimensão fractal das células sobre os substratos. A Figura 37 mostra como a dimensão fractal do citoesqueleto de f-actina mostra uma tendência de subida relacionada com o acréscimo da dureza do substrato, e a Figura 36 permite a visualização dos mecanismos atuantes: a dureza do substrato influencia a célula a organizar sua rede de actina, formando longas fibras para substratos mais rígidos. Este fato já foi já reportado em outros trabalhos [8, 36, 66].

REFERÊNCIAS

- [1] Rob Phillips, Jane Kondev, Julie Theriot, Hernan G Garcia, and Nigel Orme. Hodgkin–Huxley model. In *Physical Biology of the Cell*, pages 681–715. Garland Science, October 2012.
- [2] Diana E. Jaalouk and Jan Lammerding. Mechanotransduction gone awry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1):63–73, January 2009.
- [3] Ning Wang and Zhigang Suo. Long-distance propagation of forces in a cell. *Biochemical and biophysical research communications*, 328(4):1133–1138, 2005.
- [4] Amit Gefen and Daphne Weihs. Mechanical cytoprotection: A review of cytoskeleton-protection approaches for cells. *Journal of Biomechanics*, 49(8):1321–1329, May 2016.
- [5] Louise Guolla, Martin Bertrand, Kristina Haase, and Andrew E. Pelling. Force transduction and strain dynamics in actin stress fibres in response to nanonewton forces. *Journal of Cell Science*, 125(3):603–613, February 2012.
- [6] Christian Rotsch and Manfred Radmacher. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, 78(1):520–535, January 2000.
- [7] Yareni A. Ayala, Bruno Pontes, Barbara Hissa, Ana Carolina M. Monteiro, Marcos Farina, Vivaldo Moura-Neto, Nathan B. Viana, and H. Moysés Nussenzweig. Effects of cytoskeletal drugs on actin cortex elasticity. *Experimental Cell Research*, 351(2):173–181, February 2017.
- [8] Mukund Gupta, Bibhu Ranjan Sarangi, Joran Deschamps, Yasaman Nematbakhsh, Andrew Callan-Jones, Felix Margadant, René-Marc Mège, Chwee Teck Lim, Raphaël Voturiiez, and Benoît Ladoux. Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nature Communications*, 6(1), June 2015.
- [9] Jérôme Solon, Ilya Levental, Kheya Sengupta, Penelope C. Georges, and Paul A. Janmey. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophysical Journal*, 93(12):4453–4461, December 2007.
- [10] Fitzroy J. Byfield, Rashmeet K. Reen, Tzu-Pin Shentu, Irena Levitan, and Keith J. Gooch. Endothelial actin and cell stiffness is modulated by substrate stiffness in 2d and 3d. *Journal of Biomechanics*, 42(8):1114–1119, May 2009.
- [11] Muhammad Sulaiman Yousafzai, Giovanna Coceano, Serena Bonin, Joseph Niemela, Giacinto Scoles, and Dan Cojoc. Investigating the effect of cell substrate on cancer cell stiffness by optical tweezers. *Journal of Biomechanics*, 60:266–269, July 2017.
- [12] J. S. de Sousa, R. S. Freire, F. D. Sousa, M. Radmacher, A. F. B. Silva, M. V. Ramos, A. C. O. Monteiro-Moreira, F. P. Mesquita, M. E. A. Moraes, R. C. Montenegro, and C. L. N. Oliveira. Double power-law viscoelastic relaxation of living cells encodes motility trends. *Scientific Reports*, 10(1), March 2020.

- [13] Jian Zhang and Cynthia A Reinhart-King. Targeting tissue stiffness in metastasis: mechanomedicine improves cancer therapy. *Cancer Cell*, 37(6):754–755, 2020.
- [14] M Radmacher, R. Tillamnn, M Fritz, and H. Gaub. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*, 257(5078):1900–1905, September 1992.
- [15] M. Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4):128–138, 1988.
- [16] C Lenz. *Introdução a microscopia confocal*. Unicamp Press Inc, São Paulo, 2008.
- [17] Thomas D Pollard and Robert D Goldman. Overview of the cytoskeleton from an evolutionary perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(7):a030288, 2018.
- [18] Gary J. Brouhard and Luke M. Rice. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(7):451–463, April 2018.
- [19] F Gittes, B Mickey, J Nettleton, and J Howard. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *Journal of Cell Biology*, 120(4):923–934, February 1993.
- [20] Alexander R Paredez, Christopher R Somerville, and David W Ehrhardt. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312(5779):1491–1495, 2006.
- [21] Pauline Durand-Smet, Nicolas Chastrette, Axel Guiroy, Alain Richert, Annick Berne-Dedieu, Judit Szecsi, Arezki Boudaoud, Jean-Marie Frachisse, Mohammed Bendahmane, Oliver Hamant, et al. A comparative mechanical analysis of plant and animal cells reveals convergence across kingdoms. *Biophysical journal*, 107(10):2237–2244, 2014.
- [22] Pauline Durand-Smet, Tamsin A. Spelman, Elliot M. Meyerowitz, and Henrik Jönsson. Cytoskeletal organization in isolated plant cells under geometry control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(29):17399–17408, July 2020.
- [23] H. Ishikawa, R. Bischoff, and H. Holtzer. MITOSIS AND INTERMEDIATE-SIZED FILAMENTS IN DEVELOPING SKELETAL MUSCLE. *Journal of Cell Biology*, 38(3):538–555, September 1968.
- [24] David A.D. Parry, Sergei V. Strelkov, Peter Burkhard, Ueli Aebi, and Harald Herrmann. Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Experimental Cell Research*, 313(10):2204–2216, June 2007.
- [25] Robert D Goldman, Boris Grin, Melissa G Mendez, and Edward R Kuczmarski. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1):28–34, February 2008.
- [26] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. Linear and nonlinear rheology of living cells. *Annual Review of Materials Research*, 41(1):75–97, August 2011.
- [27] Kristina Haase and Andrew E. Pelling. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *Journal of The Royal Society Interface*, 12(104):20140970, March 2015.

- [28] Kevin J. Chalut and Ewa K. Paluch. The actin cortex: A bridge between cell shape and function. *Developmental Cell*, 38(6):571–573, September 2016.
- [29] J.J. Campbell, E.J. Blain, T.T. Chowdhury, and M.M. Knight. Loading alters actin dynamics and up-regulates cofilin gene expression in chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(2):329–334, September 2007.
- [30] Juan C Caicedo, Shantanu Singh, and Anne E Carpenter. Applications in image-based profiling of perturbations. *Current Opinion in Biotechnology*, 39:134–142, June 2016.
- [31] Gregory P. Way, Maria Kost-Alimova, Tsukasa Shibue, William F. Harrington, Stanley Gill, Federica Piccioni, Tim Becker, Hamdah Shafqat-Abbasi, William C. Hahn, Anne E. Carpenter, Francisca Vazquez, and Shantanu Singh. Predicting cell health phenotypes using image-based morphology profiling. July 2020.
- [32] Yuan-cheng Fung. *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [33] B.N. Narahari and John W. Microscopic formulation of fractional theory of viscoelasticity. In *Viscoelasticity - From Theory to Biological Applications*. InTech, November 2012.
- [34] Myriam Allieux-Guérin, Delphine Icard-Arcizet, Christiane Durieux, Sylvie Hénon, François Gallet, Jean-Claude Mevel, Marie-Jo Masse, Marc Tramier, and Maité Coppey-Moisan. Spatiotemporal analysis of cell response to a rigidity gradient: A quantitative study using multiple optical tweezers. *Biophysical Journal*, 96(1):238–247, January 2009.
- [35] Zahra Goli-Malekabadi, Mohammad Tafazzoli-shadpour, Ali Tamayol, and Ehsan Seyed-jafari. Time dependency of morphological remodeling of endothelial cells in response to substrate stiffness. *BioImpacts*, 7(1):41–47, March 2017.
- [36] Wei-Hsin Chen, Sin-Jhong Cheng, Jason T. C. Tzen, Chao-Min Cheng, and Yi-Wen Lin. Probing relevant molecules in modulating the neurite outgrowth of hippocampal neurons on substrates of different stiffness. *PLoS ONE*, 8(12):e83394, December 2013.
- [37] Manuel Théry, Anne Pépin, Emilie Dressaire, Yong Chen, and Michel Bornens. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63(6):341–355, June 2006.
- [38] Min Bao, Jing Xie, Aigars Piruska, and Wilhelm T. S. Huck. 3d microniches reveal the importance of cell size and shape. *Nature Communications*, 8(1), December 2017.
- [39] Marina Soares e Silva, José Alvarado, Jeanette Nguyen, Nefeli Georgoulia, Bela M. Mulder, and Gijsje H. Koenderink. Self-organized patterns of actin filaments in cell-sized confinement. *Soft Matter*, 7(22):10631, 2011.
- [40] Carmela Rianna, Manfred Radmacher, and Sanjay Kumar. Direct evidence that tumor cells soften when navigating confined spaces. *Molecular Biology of the Cell*, 31(16):1726–1734, July 2020.
- [41] Anthony C Fischer-Cripps. *Introduction to contact mechanics*, volume 101. Springer, 2007.

- [42] Ian Macmillan Ward and John Sweeney. *An introduction to the mechanical properties of solid polymers*. John Wiley & Sons, 2005.
- [43] FB de Sousa, PKV Babu, M Radmacher, CLN Oliveira, and JS de Sousa. Multiple power-law viscoelastic relaxation in time and frequency domains with atomic force microscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 54(33):335401, 2021.
- [44] Juan De Vicente. *Viscoelasticity: From Theory to Biological Applications*. BoD—Books on Demand, 2012.
- [45] A Franck and TI Germany. Viscoelasticity and dynamic mechanical testing. *TA Instruments, New Castle, DE, USA AN004*, 1993.
- [46] H Schiessel, R Metzler, A Blumen, and TF Nonnenmacher. Generalized viscoelastic models: their fractional equations with solutions. *Journal of physics A: Mathematical and General*, 28(23):6567, 1995.
- [47] Peter Eaton and Paul West. *Atomic force microscopy*. Oxford university press, 2010.
- [48] J. S. de Sousa, J. A. C. Santos, E. B. Barros, L. M. R. Alencar, W. T. Cruz, M. V. Ramos, and J. Mendes Filho. Analytical model of atomic-force-microscopy force curves in viscoelastic materials exhibiting power law relaxation. *Journal of Applied Physics*, 121(3):034901, January 2017.
- [49] R. T. Williams and J. W. Bridges. Fluorescence of solutions: A review. *Journal of Clinical Pathology*, 17(4):371–394, July 1964.
- [50] On the change of refrangibility of light. *Abstracts of the Papers Communicated to the Royal Society of London*, 6:195–200, December 1854.
- [51] Philip M Morse. Diatomic molecules according to the wave mechanics. ii. vibrational levels. *Physical review*, 34(1):57, 1929.
- [52] Edward U Condon. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Physical Review*, 32(6):858, 1928.
- [53] Paula G Coble, Jamie Lead, Andy Baker, Darren M Reynolds, and Robert GM Spencer. *Aquatic organic matter fluorescence*. Cambridge University Press, 2014.
- [54] Diogo Bruno ALMEIDA. *Pontos Quanticos coloidais de semicondutores: caracterizacoes e aplicacoes*. PhD thesis, Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- [55] T.G. Smith, W.B. Marks, G.D. Lange, W.H. Sheriff, and E.A. Neale. A fractal analysis of cell images. *Journal of Neuroscience Methods*, 27(2):173–180, March 1989.
- [56] Laura N. Borodinsky and Mónica L. Fiszman. A single-cell model to study changes in neuronal fractal dimension. *Methods*, 24(4):341–345, August 2001.
- [57] Benoit B Mandelbrot and Benoit B Mandelbrot. *The fractal geometry of nature*, volume 1. WH freeman New York, 1982.
- [58] Regina C Coelho and L da F Costa. The box-counting fractal. dimension: Does it provide an accurate subsidy for experimental shape characterization? if so, how to use it. *Anais do Sibgrapi*, 95:183–191, 1995.

- [59] Johannes Rheinlaender, Andrea Dimitracopoulos, Bernhard Wallmeyer, Nils M. Kronenberg, Kevin J. Chalut, Malte C. Gather, Timo Betz, Guillaume Charras, and Kristian Franze. Cortical cell stiffness is independent of substrate mechanics. *Nature Materials*, 19(9):1019–1025, May 2020.
- [60] Linhong Deng, Xavier Trepate, James P Butler, Emil Millet, Kathleen G Morgan, David A Weitz, and Jeffrey J Fredberg. Fast and slow dynamics of the cytoskeleton. *Nature materials*, 5(8):636–640, 2006.
- [61] Brenton D Hoffman, Gladys Massiera, Kathleen M Van Citters, and John C Crocker. The consensus mechanics of cultured mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27):10259–10264, 2006.
- [62] Brenton D Hoffman and John C Crocker. Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force. *Annual review of biomedical engineering*, 11:259–288, 2009.
- [63] Fabian M. Hecht, Johannes Rheinlaender, Nicolas Schierbaum, Wolfgang H. Goldmann, Ben Fabry, and Tilman E. Schäffer. Imaging viscoelastic properties of live cells by AFM: power-law rheology on the nanoscale. *Soft Matter*, 11(23):4584–4591, 2015.
- [64] Nobuyuki Otsu. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*, 9(1):62–66, 1979.
- [65] Annafrancesca Rigato, Atsushi Miyagi, Simon Scheuring, and Felix Rico. High-frequency microrheology reveals cytoskeleton dynamics in living cells. *Nature physics*, 13(8):771–775, 2017.
- [66] Tony Yeung, Penelope C Georges, Lisa A Flanagan, Beatrice Marg, Miguelina Ortiz, Makoto Funaki, Nastaran Zahir, Wenyu Ming, Valerie Weaver, and Paul A Janmey. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, 60(1):24–34, 2005.