



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

WALLACE VALE DOS SANTOS

**CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA FRACTAL DO CITOESQUELETO E A
VISCOELASTICIDADE DE FIBROBLASTOS**

FORTALEZA

2022

WALLACE VALE DOS SANTOS

CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA FRACTAL DO CITOESQUELETO E A
VISCOELASTICIDADE DE FIBROBLASTOS

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.

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)

- S239c Santos, Wallace Vale dos.
Correlação entre estrutura fractal do citoesqueleto e a viscoelasticidade de fibroblastos / Wallace Vale dos Santos. – 2022.
64 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: Prof. Dr. Claudio Lucas Nunes de Oliveira.
1. Filamentos de actina. 2. Fractais. 3. Processamento de imagem. 4. Microscopia confocal. 5. Microscopia de força atômica. I. Título.

CDD 530

WALLACE VALE DOS SANTOS

CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA FRACTAL DO CITOESQUELETO E A
VISCOELASTICIDADE DE FIBROBLASTOS

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 19/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Felipe Domingos de Sousa
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos Meus Pais, amigos e professores

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, *Francisco Mardônio Martins dos Santos e Wiliana Vale dos Santos*, pelo apoio e carinho incondicional. Agradeço ao meu orientador professor *Jeanlex Soares de Sousa, Claudio Lucas Nunes de Oliveira, Rosemayre Souza Freire* pela orientação nesse trabalho. Ao *Ascânio Dias de Araújo e Felipe Domingos de Sousa* pela disponibilidade de participar da banca avaliadora desse trabalho. Agradeço também aos meus queridos amigos: *Mailene Silva, Rafael de Lima, Wagner Pereira, Wiklyn Craveiro, Álamo Loureço, Clodomiro Neto, Willon Lessa, Carlos Raphael, Carolina de Lima, Antoni Silva, Rute Dourado, João Henrique, Afonso Luiz e Victor Hugo* por todos os incentivos, deses- peros e diversões criadas neste períodos de pós-graduação. E, finalmente, agradeço a todos os professores, funcionários e membros do grupo Laboratório de Física Biológica e que me ajuda- ram direto ou indiretamente nessa caminhada. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

Células são unidades presentes em todos os seres vivos e responsáveis por diversas atividades tanto estruturais como funcionais. Compreender como esta unidade se comporta é de grande importância visto a quantidade de doenças que afetam seu funcionamento e, conseqüentemente, o estado de saúde das pessoas. O objetivo deste trabalho é estudar de forma sistemática a correlação entre a estrutura da rede de actina filamentosa (f-actina) e a viscoelasticidade celular. O estudo da estrutura do citoesqueleto se dá através da dimensão fractal de imagens de microscopia confocal de fibroblastos (linhagem L929) fixados e tratados com fluoróforos que se ligam aos filamentos de f-actina, enquanto as propriedades viscoelásticas das células são caracterizadas por Microscopia de Força Atômica. As células são divididas em dois grupos, células controle e células tratadas com citocalasina, cujo efeito é despolimerizar a f-actina, modificando a estrutura do citoesqueleto. As modificações estruturais do citoesqueleto são quantificadas determinando-se a dimensão fractal das imagens do confocais do citoesqueleto celular.

Os resultados obtidos mostram que: (i) O principal efeito da citocalasina é observado na alteração dos expoentes de relaxação viscoelástica α (rápida) e β (lenta). O expoente α aumenta discretamente de 0.75 para 0.78 com a citocalasina, enquanto o expoente β aumenta fortemente de 0.23 para 0.37. (ii) A citocalasina começa a atuar nas células em menos de 1 minutos, e seu efeito nas propriedades viscoelásticas das estabiliza por volta de 5 minutos após a aplicação. As propriedades viscoelásticas se mantêm inalteradas pelo menos até 30 minutos após a aplicação de citocalasina. (iii) A citocalasina continua a despolimerizar o citoesqueleto até 30 minutos após a aplicação da droga, provocando uma redução da dimensão fractal. (iv) A dimensão fractal exibe um comportamento inversamente proporcional ao grau de fluidez celular. (v) O substrato onde as células foram cultivadas possui um importante efeito na estrutura do citoesqueleto, inclusive na sua dinâmica de despolimerização.

Palavras-chave: filamentos de actina; fractais; processamento de imagem; microscopia confocal; microscopia de força atômica.

ABSTRACT

Cells are units present in all living beings and are responsible for various activities, both structural and functional. Understanding how this unit behaves is of great importance given the number of diseases that affect its functioning and, consequently, the health status of a given population. The goal of this work is to systematically study the correlation between the structure of the filamentous actin network (f-actin) and the cells viscoelasticity. The study of the cytoskeleton structure will be carried out through the analysis of confocal microscopy images of fibroblasts (L929 lineage) fixed and treated with optical markers binded to f-actin filaments, while the viscoelastic properties of the cells are characterized by Atomic Force Microscopy. The cells are divided into two groups, healthy cells and cells treated with cytochalasin, whose effect is to depolymerize the f-actin network, modifying the cytoskeleton structure. The structural alterations of the cytoskeleton are determined by calculating the fractal dimension of confocal images of the cells cytoskeleton. The measured data show: (i) the main effect of the cytochalasin is observed in the alteration of the viscoelastic relaxation exponents. The fast exponent (α) slightly grows from 0.75 to 0.78, while the slow exponent (β) grows strongly from 0.23 to 0.37. (ii) The cytochalasin start to depolymerize f-actin less than a minute after drug application, and its effect stabilizes around 5 minutes after application. After that, viscoelastic properties remain unaltered for at least 30 minutes. (iii) The drug continues to depolymerize the cytoskeleton at least until 30 minutes after application, and provoking a reduction of the fractal dimension. (iv) The fractal dimension exhibits an inversely proportional behavior with respect to cell fluidity. (v) The substrate where cells are cultivated exhibits an important effect in the structure of the cytoskeleton, including the depolymerization dynamics.

Keywords: actin filaments; fractal; image analysis; confocal microscopy; atomic force microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem confocal dos principais biopolímeros que compõem o citoesqueleto celular: actina (azul), filamentos intermediários (vermelho) e microtúbulos (verde). Fonte: Thomas D. Pollard [1], 2018, p. 2.	16
Figura 2 – Representação gráfica do tensor de <i>stress</i>	18
Figura 3 – Representação esquemática de uma força de tração aplicada em um corpo de comprimento L_0 , e a deformação gerada nele ΔL	19
Figura 4 – Símbolos dos elementos elástico e viscoso utilizados na construção de modelos viscoelásticos.	20
Figura 5 – Diagrama esquemático da resposta viscoelástica de uma material sujeito a um teste de <i>creep compliance</i>	21
Figura 6 – Diagrama esquemático da resposta viscoelástica de uma material sujeito a um teste de relaxação de <i>stress</i>	22
Figura 7 – Comparação da resposta viscoelástica de materiais elásticos, viscosos e células vivas em um experimento de <i>creep compliance</i> , onde $\varepsilon(t) = d(t)/d_{max}$. Figura adaptada da referência [2].	22
Figura 8 – As imagens em verde representam células antes do corte de uma única fibra. As imagens em margenta representam células após o corte de uma unica fibra. A ultima imagem representa a sobreposição de ambas imagens verde e margenta [3].	23
Figura 9 – Imagens de simples objetos geométricos: linhas, quadrados e linhas cruzadas de diferentes tamanhos. As dimensões fractais destes objetos são mostradas na Figura 10.	26
Figura 10 – Distribuição da dimensão fractal D_f de simples objetos geométricos como linhas, quadrados e linhas cruzadas de diferentes tamanhos (ver Figura 9).	26
Figura 11 – Fluxograma seguido na realização do trabalho.	27
Figura 12 – Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Cytochalasin_D.png Data de acesso: 22 de dez. de 2021.	29
Figura 13 – Imagens do citoesqueleto de células obtida através de microscopia confocal de fluorescência. Imagem a) representa uma imagem sem o efeito da citocalasina D. Imagem b) representa uma imagem sobre o efeito da citocalasina D durante um tempo de 20 minutos.	30

Figura 14	–Na figura a) temos as esquematização de um monômero de actina. b) Representa os Pontos Ativos de crescimento da cadeia encontrado em cada monômero. c) A representação de uma fibra de actina formada por uma cadeia de actinas interligadas. Na Figura d) podemos observar a representação da citocalasina se ligado a rede de actina formando pequenas cadeias.	30
Figura 15	–Esquema de funcionamento do microscopio de força atomica	32
Figura 16	–Curva de força do tipo <i>dwell</i>	34
Figura 17	–(esq.) Curvas de força simuladas pela Eq. 2.3 de materiais que obedecem a uma dupla lei de potência com expoente rápido $\alpha = 0.75$, e dois expoentes lentos diferentes $\beta = 0$ e $\beta = 0.2$. O parâmetro τ é uma escala de tempo que está relacionado com o tempo de cruzamento entres os regimes rápido e lento. (dir) Funções de relaxação $R(t)$ usadas para gerar as curvas de forças simuladas.	35
Figura 18	–Fonte: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File%3AFluorescent_and_confocal_microscopes.ogv Data de acesso: 23 de nov. de 2021.	37
Figura 19	–A Figura A mostra uma imagem criada a partir de um microscopio convencional em comparação a Figura B criada a partir de um microscopio confocal. Fonte: Ambar López-Macay[4], 2016, p. 159.	38
Figura 20	–A figura mostra elemetos priorizados no tratamento das imagens.	39
Figura 21	–Exemplo do comportamento do histograma feito em cima de uma imagem sem picos definidos. O histograma b mostra o maior valor do pixel encontrado no <i>Background</i> varrido na área do quadrado amarelo. O histograma logo abaixo mostra onde o valor máximo encontrado se localiza para ser desconsiderado da imagem.	40
Figura 22	–A figura mostra um exemplo de histograma de uma imagem bimodal. Azul: O pico mais próximos do zero da escala indica o background da imagem; Vermelho: O vale indica a região ideal do <i>Threshold</i> ; Preto: O pico mais distante do zero da escala indica o objeto estudado na imagem	41
Figura 23	–A figura mostra um exemplo de uma imagem teste e o seu respectivo histograma	41
Figura 24	–A figura mostra histograma separada entre duas classes(preto e branco)	42
Figura 25	–A figura mostra o valor da variância ideal calculada para escolher as classes e a imagem final após aplicação do Thresholding	43

Figura 26	–A figura mostra o fractal chamado <i>Curva de koch</i> onde o método de box-couting foi aplicando, sendo representado por um cor diferente nas caixas que contém qualquer parte da figura em seu interior, respectivamente: $N_1 = 9$, $\delta_1 = 1/6$, $N_2 = 15$, $\delta_2 = 1/9$, $N_3 = 23$, $\delta_3 = 1/12$, $N_4 = 28$, $\delta_4 = 1/15$ e $N_5 = 41$, $\delta_5 = 1/19$	43
Figura 27	–Gráfico obtido após aplicar o box-couting na figura exemplo 26	43
Figura 28	–A imagem mostra os efeitos da citocalasina em uma mesma célula. A imagem a) mostra uma célula sem o efeito da citocalasina. A imagem b) mostra a mesma célula sobre o efeito de trinta minutos da citocalasina, sendo possível observar o aspecto mais esponjoso no corpo celular.	44
Figura 29	–Protocolo de aplicação de citocalasina e de medidas de AFM em função do tempo. Em cada placa de Petri, foram medidas 3 células individuais nos instantes 0 (sem citocalasina), 10, 20 e 30 minutos. Ao todo foram utilizadas 6 placas de Petri, totalizando 18 células.	45
Figura 30	–(a) Curva de força típica em células L929 não-tratadas com citocalasina. A curva de força é transladada horizontalmente de forma que o ponto de contato entre a ponta do AFM e a superfície da célula ocorra em $t = 0$ s. Adotou-se $F_{MAX} = 3$ nN e $t_d = 1$ s em todas as medidas realizadas neste trabalho. O ajuste da curva experimental pelo modelo de dupla lei de potência resulta em $r^2 = 0.9958$. (b) Relaxação aparente obtida na região de aproximação (região azul) mostrando um regime de relaxação rápida ($\alpha = 0.72$) e um regime de relaxação lenta ($\beta = 0.27$).	46
Figura 31	–Parâmetros fundamentais das curvas de força medidas em um grupo controle nos instantes $t = 0$, 10 e 30 minutos.	47
Figura 32	–Evolução temporal das propriedades viscoelásticas do grupo controle (sem citocalasina): (a) módulo de Young E_H , (b) módulo elástico E_{scaled} em $t = 1$ s, (c) Relação entre E_{scaled} e E_H , e (d) expoentes de relaxação rápida α (caixas verdes) e lento β (caixas amarelas).	48
Figura 33	–Propriedades viscoelásticas das células em função do tempo de ação da citocalasina: (a) constante de mola efetiva, (b) módulo de Young, (c) módulo elástico E_{scaled} em $t = 1$ s, e (d) expoentes de relaxação rápida α (caixas verdes) e lento β (caixas amarelas).	49
Figura 34	–Efeito da citocalasina nas curvas de força em função do tempo medida sobre a mesma célula. As curvas podem ter sido medidas em pontos diferentes da superfície celular.	50

Figura 35 –Evolução temporal do módulo elástico E_{scaled} (a) e do expoente de relaxação lenta β (b) nos primeiros 10 minutos de ação da citocalasina sobre as células. Cada distribuição foi construída a partir de 4 curvas de força medidas em duas células.	51
Figura 36 –Diagrama comparativo do tamanho da área de varredura realizada pelo AFM em células tratadas e não-tratadas com citocalasina. As regiões de varredura são escolhidas a olho nu no microscópio na região central da célula. A localização exata do núcleo não é conhecida. E uma área de varredura maior (16 curvas distribuídas em uma área de $4\mu m \times 4\mu m$) tem maior chance de medir partes do núcleo do que uma região menor (4 curvas distribuídas em uma área de $2\mu m \times 2\mu m$).	52
Figura 37 –Imagens confocais de células sem (a) e com (b) citocalasina após 30 minutos de aplicação. Na imagem (b) o citoesqueleto fragmentado pouco contribui para o sinal óptico, e a localização da célula só é possível devido ao sinal de fluorescência do núcleo.	53
Figura 38 –Imagens confocais do citoesqueleto de actina para diferentes tempos de ação da citocalasina em <i>células aderidas em vidro</i> . A linha superior (inferior) mostra as imagens antes (depois) do <i>threshold</i> Otsu aplicado.	54
Figura 39 –Imagens confocais do citoesqueleto de actina para diferentes tempos de ação da citocalasina em <i>células aderidas em colágeno</i> . A linha superior (inferior) mostra as imagens antes (depois) do <i>threshold</i> Otsu aplicado.	55
Figura 40 –Distribuição da dimensão fractal D_f do citoesqueleto de actina para diferentes tempos de ação da citocalasina em <i>células aderidas em vidro</i> . O número de células utilizado em cada distribuição é de 30 (T0), 4 (T10), 19 (T20) e 27 (T30).	56
Figura 41 –Distribuição da dimensão fractal D_f do citoesqueleto de actina para diferentes tempos de ação da citocalasina em <i>células aderidas em colágeno</i> . O número de células utilizado em cada distribuição é de 25 (T0), 23 (T10), 23 (T20) e 24 (T30).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dependência dos parâmetros λ e $\Omega(\lambda)$ da geometria do indentador. Abaixo, ν representa a razão de Poisson e δ é indentação.	34
Tabela 2 – Valores referentes a imagem da Figura 25	42

LISTA DE SIGLAS

δ	Tamanho do quadrado
W_o	Números de píxeis do objeto
W_b	Números de píxeis no Background
μ_o	Médias da intensidade do objeto
μ_b	Médias da intensidade do background
σ	Variância
σ_b^2	Variância intra-classe
AFM	Atomic Force Microscope

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Referencial teórico	17
2	MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1	Cultivo de células	28
2.2	Tratamento com citocalasina	29
2.3	Microscopia de força atômica	31
2.4	Curvas de força	33
2.5	Microreologia celular	33
2.6	Microscopia confocal	36
2.7	Análise de imagens	37
3	RESULTADOS: MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	44
3.1	Protocolo de medida	44
3.2	Propriedades mecânicas do grupo controle	45
3.3	O efeito da citocalasina	48
3.4	Discussões	51
4	RESULTADOS: MICROSCOPIA CONFOCAL	53
4.1	O efeito da citocalasina	54
4.2	Discussões	55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O citoesqueleto celular é um emaranhado de redes altamente complexas formado por três principais filamentos: microtúbulos filamentos de actina e filamentos intermediários tais componentes são responsáveis por diferentes funções estruturais e metabólicas das células. Podemos pensar no citoesqueleto como sendo um alicerce, robusto e estruturado, mas com a habilidade de modelar seus componentes conforme as necessidades como crescimento, divisão e adaptação a diferentes ambientes. Essas estruturas tem um comportamento mais dinâmico, visto que sua autorregulação do comprimento e estabilidade das fibras são realizados via filamentos e outros componentes, e modificações covalentes formando uma grande variedade de macromoléculas[5].

Os microtúbulos são componentes importantes que formam a estrutura e o formato das células, além de responsável por determinar as posições das organelas, possuem uma aparência tubular com o diâmetro de 25 nm e seu comprimento pode chegar até 50 micrômetros. São formados por duas proteínas globulares chamadas alfa-tubulina e beta-tubulina, que se ligam formando um tubo oco, onde, assim como na actina, essas unidades se ligam de tal forma a criar uma polaridade nessa estrutura que ganham um caráter diferente para suas extremidades. A extremidade (+) é composta apenas por unidades de beta-tubulina, enquanto a extremidade (-) é composta por unidades de alfa-tubulina, sendo que ambas conseguem crescer, sendo que a (+) em uma taxa maior [5, 6]. Possuem também papel importante no movimento celular, visto que formam cílios e flagelos, além de originar o alicerce que permite a movimentação das organelas e vesículas [5, 7].

Os filamentos intermediários, por outro lado, são estruturas filamentosas que desempenham um papel geral de resistência mecânica, absorção de choques e possuem diâmetro entre 7 e 11 nm , tamanho este intermediário entre as fibras de actina e microtubos, portanto seu nome. Também possuem a capacidade de esticar varias vezes o seu tamanho original [8], característica essa vinda da sua estrutura hierárquica que desencadeia níveis de deformações diferentes [9]. Estão localizados próximo ao núcleo e se estendem até a periferia da célula onde se ancora na membrana plasmática tornando-se capazes de transmitir sinais e direcionar moléculas por todo o corpo celular. Além de serem responsáveis pela resistência a tensão[10], são altamente insolúveis a altas concentrações de sal, onde não se dissociam em tampões de alta força iônica [8]. Existem atualmente sete diferentes tipos, sendo estes: Queratinas, Plectina, Vimentina, Desmina, Neurofilamentos, Laminas e a Nestina.

A actina localizadas nas células apresentam dois diferentes estados, sendo eles G-actina (globular) formada por monômeros livres e F-actina (filamentosa) formado por polímeros

lineares. Possuem a característica de serem bastante flexíveis quando estão isoladas ou rígidas, quando associadas formando ramos. Os filamentos podem se organizar formando uma rede no citoplasma e se concentram no córtex celular [11]. São responsáveis pela movimentação e exploração do meio, além de se localizarem no ouvido interno encarregado por vibrar em resposta aos sons externos, localizados também nas fibras dos músculos, responsável pela contração [5] e apresentam a função de sustentação de células animais[2].

Uma forma conhecida de mudar a configuração da estrutura interna das células é através do substrato, visto que células estão a todo momento sentindo e se fixando no meio onde estão inseridas. A sua capacidade de analisar a rigidez do substrato pela matriz celular é de extrema importância para diversos processos celulares como, migração [12], diferenciação [13] [14] e proliferação [15]. Uma forma para identificar essa mudança no citoesqueleto devido ao aumento na rigidez do substrato é observar as orientações das fibras, onde é possível verificar as ordenações das fibras de actinas e medir a forças de tração usando pilares microfabricados para controlar a rigidez alterando sua altura. Em substratos macios, o citoesqueleto apresenta comportamento viscoso, entretanto em substratos rígidos ele mostra um comportamento predominantemente elástico[16, 17].

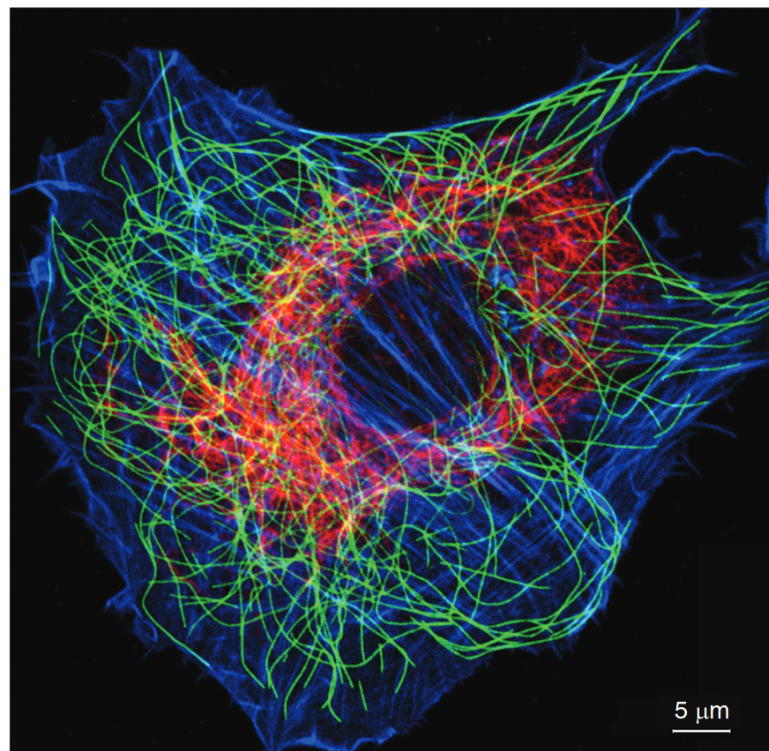


Figura 1 – Imagem confocal dos principais biopolímeros que compõem o citoesqueleto celular: actina (azul), filamentos intermediários (vermelho) e microtúbulos (verde). Fonte: Thomas D. Pollard [1], 2018, p. 2.

O principal objetivo do presente trabalho é estudar a correlação entre a estrutura da rede de actina filamentosa (f-actina) e a viscoelasticidade celular. O estudo da estrutura do citoesqueleto se dá através de análise de imagens de microscopia confocal de fibroblastos (linhagem L929) fixados e tratados com fluoróforos que se ligam aos filamentos de f-actina, enquanto as propriedades viscoelásticas das células são caracterizadas por Microscopia de Força Atômica. As células são divididas em dois grupos, grupo controle e células tratadas com citocalasina, cujo efeito é despolimerizar a f-actina, modificando a estrutura do citoesqueleto. As modificações estruturais do citoesqueleto são quantificadas determinando-se a dimensão fractal das imagens de microscopia confocal do citoesqueleto.

Este trabalho está organizado da seguinte forma. O Capítulo 2 descreve os materiais e métodos utilizadas na cultura das células, fixação, marcação e imageamento do citoesqueleto. Descreve também a metodologia de aplicação da citocalasina como agente despolimerizador do citoesqueleto, e os experimentos de caracterização viscoelástica por AFM. O Capítulo 3 descreve os resultados da caracterização viscoelástica das células sob diferentes condições. O Capítulo 4 descreve os resultados da quantificação do citoesqueleto através do conceito de dimensão fractal, e o Capítulo 5 dedica-se a discutir os resultados e conclusões desta dissertação.

1.1 Referencial teórico

É possível encontrar diversos trabalhos na literatura que visam quantificar a estrutura do citoesqueleto de diferentes formas. No estudo da rigidez dos substratos em células com glioma [18], por exemplo, é possível analisar através da área e da rigidez do substrato mudanças expressivas na organização do citoesqueleto com o aumento da dureza do substrato, e através mobilidade média de migração é possível observar uma grande diminuição em substratos macios e indistinguíveis para os mais duros. Outro exemplo é por meio da ruptura de uma única fibra de actina em células ancoradas a substratos de matriz extracelular que atrapalhar todo o equilíbrio estrutural, forçando uma mudança no arranjo na ordem de microns[3].

São alguns casos que utilizam a resposta do citoesqueleto como base, porém o elo entre estrutura e propriedades mecânicas ainda é uma área em aberto. Nesse trabalho desenvolveremos métodos de análise de imagem que consiste em enquadrar e limpar resquícios de fluorescência provenientes de outras células ou pedaços próximos de modo a melhorar os dados, além de escolher o valor ideal para a aplicação de *threshold* utilizando método *Otsu*, método este que se mostrou superior aos demais por guardar características relevantes do citoesqueleto. Para quantificar a rede de f-actina utilizamos o cálculo da dimensão fractal por meio do *box counting*, abordagem muito utilizada quando se trabalha com imagem biomédicas [19]. Realizamos também interferências controladas no citoesqueleto e mensuramos através dos métodos citados acima, além de realizar medidas de viscoelasticidade em grupo controle e sob intervenção

da citocalasina, correlacionando as variações das propriedades mecânicas com os parâmetros estruturais.

Células são objetos viscoelásticos, ou seja, apresentam propriedades tanto de sólidos quanto de fluidos. O conceito de viscoelasticidade pode ser melhor compreendido a partir dos comportamentos elástico e viscoso individualmente, e interpolando-se estas propriedades para descrever um comportamento intermediário.

Elasticidade é definida como a capacidade de um corpo sofrer uma deformação instantânea sob o efeito de uma força externa, criando uma força restauradora no sentido contrário. Esta força restauradora existe enquanto a força externa atua sobre o corpo, e retorna a sua forma original quando a força externa é removida. Por outro lado, viscosidade é definida como a característica de fluido de resistir ao escoamento, ou seja, de resistir a tensões de cisalhamento. Estas duas quantidades possuem relações matemáticas entre *stress* (tensão) e *strain* (deformação) diferentes.

Stress é definido como sendo a força externa aplicada a um material dividido pela área de atuação da força sobre o corpo [20]. Na forma diferencial, *stress* é definido como:

$$\sigma = \frac{dF}{dA}, \quad (1.1)$$

onde essa força pode ser aplicada tanto perpendicularmente, chamado *stress* normal ou ser aplicado no sentido paralelo à área de contato, assim chamado *stress* de cisalhamento. Estes dois tipos de *stress* podem ser condensados definindo-se *stress* como uma quantidade tensorial e simétrica $\sigma_{ij} = \sigma_{ji}$, onde o índice i se refere à direção do vetor normal à área e j a direção da força atuante na área. Os elementos da diagonal principal, isto é σ_{xx} , σ_{yy} e σ_{zz} , representam as componentes do *stress* normal, enquanto os componente não-diagonais se referem ao *stress* de cisalhamento. O tensor de *stress* está diagramaticamente representado na Figura 2

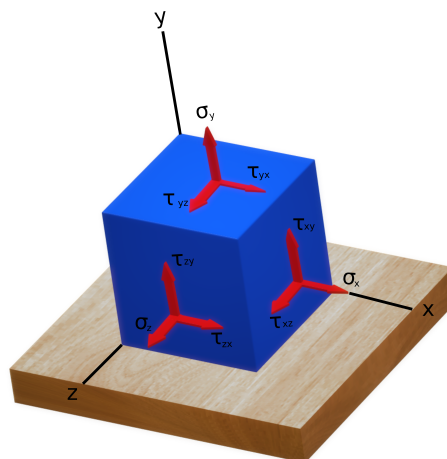


Figura 2 – Representação gráfica do tensor de *stress*.

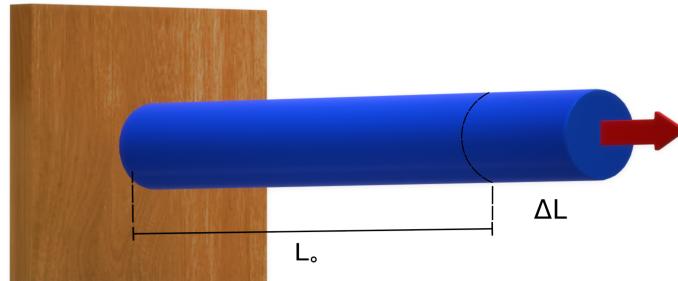


Figura 3 – Representação esquemática de uma força de tração aplicada em um corpo de comprimento L_0 , e a deformação gerada nele ΔL .

Strain é uma quantidade adimensional que representa o grau de deformação sentido pelo corpo devido à ação de um *stress* externo. Forças que executam tração/compressão em um objeto tendem a aumentar/diminuir o comprimento de objetos na direção de aplicação da força. Uma força de tração e a deformação gerada no corpo é mostrada na Figura 3. Nestes casos, o *strain* pode ser definido como:

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}. \quad (1.2)$$

onde L_0 é o tamanho inicial da barra, e ΔL é a variação de tamanho causada pela força de tração. No caso mais geral, o *strain* também é definido como um tensor simétrico $\varepsilon_{ij} = (\partial u_i / \partial x_j + \partial u_j / \partial x_i) / 2$, onde u_i a deformação de um determinado ponto do corpo na i -ésima direção.

A equação constitutiva, ou seja a relação entre *stress* e *strain*, de materiais elásticos no regime linear (pequenas deformações) é dado pela lei de Hooke[20]

$$\sigma = E\varepsilon. \quad (1.3)$$

onde E é módulo elástico do material. Por outro lado, a equação constitutiva de um fluido viscoso obedece a lei de Newton para fluidos,

$$\sigma = \eta \frac{d\varepsilon}{dt}, \quad (1.4)$$

onde η representa a viscosidade do fluido. Fluidos que obedecem a equação acima são chamados de fluidos newtonianos.

O comportamento viscoelástico pode ser construído combinando-se as equações constitutivas de materiais elásticos e viscosos. Modelos viscoelásticos são normalmente construídos combinando elementos elásticos e viscosos discretos, da mesma maneira que a associação de resistores e capacitores em circuitos elétricos. Os símbolos utilizados para representar elementos elásticos e viscosos são mostrados na Figura 4.

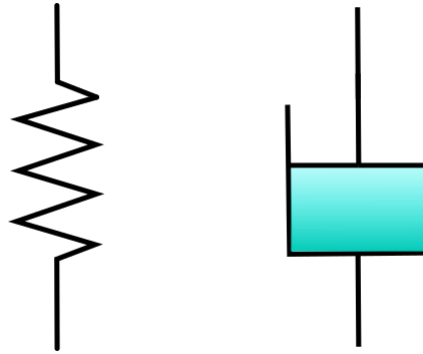


Figura 4 – Símbolos dos elementos elástico e viscoso utilizados na construção de modelos viscoelásticos.

Há diversos modelos viscoelásticos, sendo os mais comuns os modelos de Maxwell, e Kelvin-Voigt e modelo do sólido viscoelástico padrão, que podem ser usados para representar o comportamento viscoelástico de diferentes tipos de materiais. Para exemplificar o comportamento de um material viscoelástico simples, partimos do modelo de Kelvin-Voigt, que combina a associação em série de um elemento elástico e um viscoso, e possui a seguinte equação constitutiva:

$$\sigma = E\varepsilon + \eta \frac{d\varepsilon}{dt}. \quad (1.5)$$

A solução de uma equação constitutiva qualquer, como a equação acima, depende do tipo de experimento (condição inicial da equação diferencial) que pode ser realizado para caracterizar os materiais viscoelásticos. Os dois tipos de experimentos mais simples são os testes de fluência e de relaxação.

O teste de fluência é caracterizado por submeter uma amostra a um *Stress* constante (σ_0), e observar como o *strain* varia com o tempo. Neste caso as amostras são caracterizadas pela função chamada de fluência definido como $J(t) = \varepsilon(t)/\sigma_0$. Quanto maior o *creep compliance*, menor é a rigidez mecânica do material.

O teste de relaxação é oposto. A amostra é submetida a uma deformação (*strain*) constante ε_0 , e observa-se como o *stress* relaxa com o tempo. Nestes casos, o comportamento da amostra é através do módulo de relaxação definido como $G(t) = \sigma(t)/\varepsilon_0$. Quanto maior o $G(t)$, mais rígida é a amostra. Representações esquemáticas da resposta viscoelástica de amostras sujeitas aos testes de *creep compliance* e relaxação de *stress* são mostrados nas Figuras 5 e 6,

respectivamente.

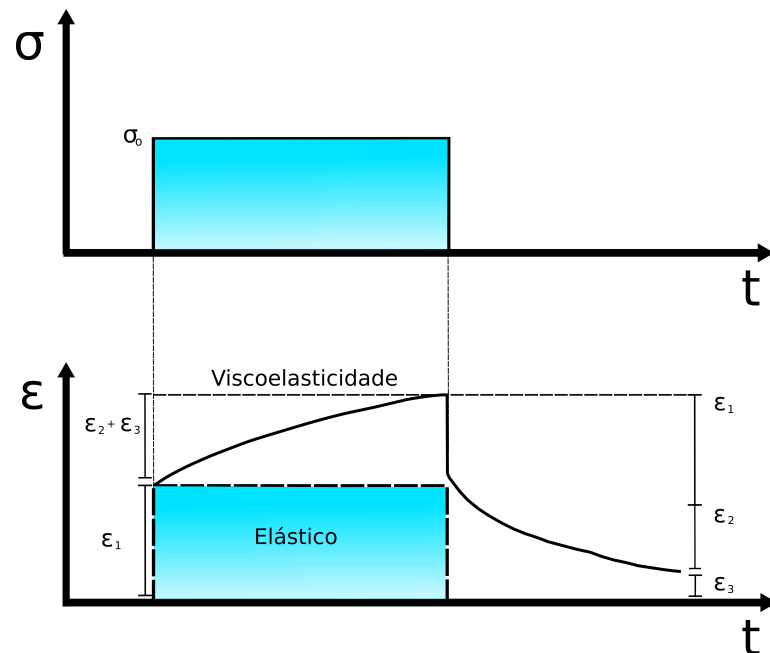


Figura 5 – Diagrama esquemático da resposta viscoelástica de uma material sujeito a um teste de *creep compliance*.

É importante ressaltar que há muitos outros tipos de testes viscoelásticos além daqueles que submetem as amostras a *strain* ou *stress* constantes. Uma classe de testes muito importantes são os testes oscilatórios nos quais submete-se as amostra a um *strain* ou *stress* do tipo senoidal, e observa-se a resposta do material para diferente frequências de oscilação. Variando-se esta frequência, é possível estudar a resposta viscoelástica do material em diferentes escalar de tempo. Outro ponto importante a ser ressaltado é que experimentos de nanoindentação por Microscopia de Força Atômica (AFM) funcionam como um experimento nos quais nem o *strain* e nem o *stress* se mantêm constantes, e necessitam de uma teoria apropriada para que possamos extrair as propriedades viscoelásticas dos materiais. A teoria necessária para extrair os parâmetros viscoelásticos dos experimentos de AFM será apresentada no próximo capítulo.

De uma forma geral, o objetivo principal da caracterização viscoelástica dos materiais é determinar a função $R(t)$ (também descrita como $E(t)$ ou $G(t)$) que descreve como o módulo elástico dos materiais relaxa com o tempo. Os modelos viscoelásticos mais simples como os modelos de Maxwell, Kelvin-Voigt e o modelo viscoelástico padrão resultam em funções $R(t) \propto e^{(-t/\tau)}$ que descrevem uma relaxação do tipo exponencial, onde τ é um tempo característico de relaxação. Contudo estudos recentes mostram que células apresentam resposta viscoelástica do tipo lei de potência $R(t) \propto t^{-\beta}$, onde β é o expoente de relaxação que está intrinsicamente ligado a estrutura interna do citoesqueleto, e que pode ser alterado por intervenções farmacológicas e pelo estado de saúde das células [21, 22]. O expoente β varia entre 0 e 1, onde $\beta = 0$ representa um material puramente elástico, $\beta = 1$ representa um ma-

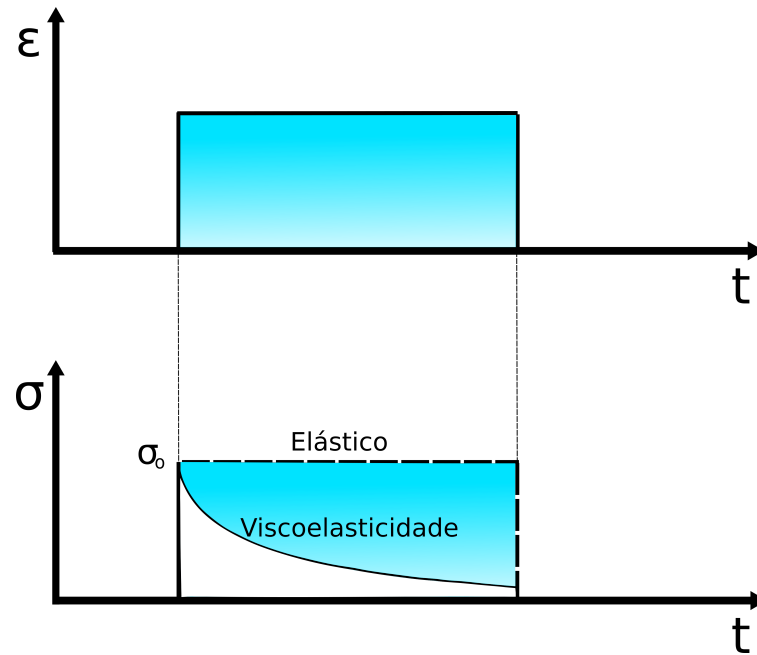


Figura 6 – Diagrama esquemático da resposta viscoelástica de uma material sujeito a um teste de relaxação de *stress*.

terial puramente viscoso. O valor típico de células varia entre 0.05 e 0.4. A Figura 7 mostra as diferenças da resposta viscoelástica de materiais puramente elástico, puramente viscoso e células vivas.

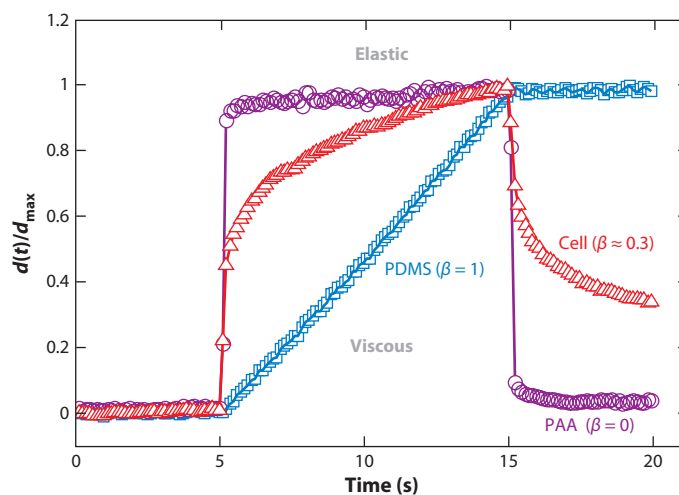


Figura 7 – Comparação da resposta viscoelástica de materiais elásticos, viscosos e células vivas em um experimento de *creep compliance*, onde $\varepsilon(t) = d(t)/d_{max}$. Figura adaptada da referência [2].

Alguns estudos de reologia dinâmica mostram que células exibem dois regimes de relaxação, um regime descrito por um expoente de relaxação rápida que varia entre 0.5 e 0.75 que domina em escalas de tempo muito curtas da ordem de poucos milissegundos. Este regime é atribuído o comportamento da resposta das fibras individuais de actina. O outro regime é lento, com expoentes variando entre 0.05 e 0.4, que domina a relaxação em escalas de tempo

acima de centenas de milissegundos até poucos minutos. Esta larga faixa de escalas de tempo superpõe-se com a escala de tempo de vários processos metabólicos das células [23, 24, 22].

A estrutura celular e sua viscoelasticidade são características que estão intimamente interligadas. De fato, é possível determinar mudanças no comportamento viscoelástico de uma célula a partir do corte de uma única fibra de actina tensionada [3]. Fibras de actinas forçam a matriz extracelular através da ação de actomiosina, onde com a proteína motora conseguem tracioná-las. Este trabalho utilizou um nanotesoura a *laser* capaz de cortar o material em foco através absorção de multifótons. O comportamento de retração da fibra cortada descreve o comportamento viscoelástico de um sistema mola e amortecedor em paralelo. Os resultados mostram que células sobre substratos duros, como vidro, não modificaram sua estrutura ou suas fibras vizinhas após o corte de uma, ou mais fibras, permanecendo notavelmente constante por vários minutos de observação. Em contrapartida células sobre substratos moles, como géis, após o corte de uma única fibra consegue mudar local e globalmente a estrutura total da célula, concluindo que fibras de tensão retraem a viscoelasticidade no citoplasma. Estes resultados são mostrados na Figura 8.

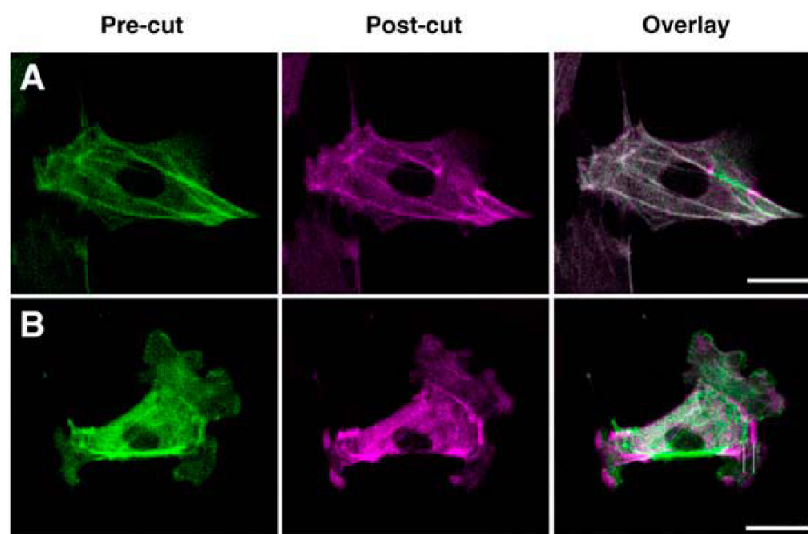


Figura 8 – As imagens em verde representam células antes do corte de uma única fibra. As imagens em margenta representam células após o corte de uma unica fibra. A ultima imagem representa a sobreposição de ambas imagens verde e margenta [3].

Rotsh *et al.* mostrou a influência das estruturas do citoesqueleto na elasticidade da célula [25]. Utilizando a citocalasina B e D em baixas concentrações, não é possível observar mudanças expressivas no modo elástico, entretanto para concentrações maiores ocorre mudanças notáveis na elasticidade. A citocalasina degrada os filamentos de actina seguidos por retrações do lamelipódio modificando sua morfologia, onde fibras menores de actina desaparecem entre 10 e 15 minutos e fibras maiores duram até próximos aos 30 minutos, mostrando que mudanças na geometria celular, através do uso de drogas, consegue influenciar a sua elas-

ticidade. Também foram realizados testes utilizando colchicine, droga essa empregada para desfragmentar os microtúbulos, onde não ocorreu mudanças na elasticidade das células, mesmo para altas concentrações. A diferença na elasticidade entre a actina e microtúbulos pode ser explicada através da morfologia da mesma, visto que os microtúbulos se localizam próximos ao núcleo e não se estendem por toda a célula.

A referência [26] relaciona viscoelasticidade e geometria celular através de um sistema microfluídico capaz de analisar propriedades viscoelásticas de hemácias por intermédio do formato, velocidade e pressão em microcanais criados em PDMS (Dimetil polissiloxano) com o diâmetro interno semelhante aos micro capilares de vidros, mostrando assim sua relevância para o estudo do comportamento de escoamento micro confinado. Neste trabalho, eles criaram dois diferentes micro capilares, sendo o primeiro com formato transversal circular comparável aos microcanais retangulares, a fim de mostrar que ambos apresentam comportamento semelhante quando comparados. Outro canal criado de modo a medir as propriedades viscoelásticas apresenta três regiões diferentes, sendo (1) uma seção transversal constante, (2) uma seção transversal divergente e (3) uma seção transversal constante maior que a primeira, onde é possível relacionar o gradiente de velocidade, a partir da seção transversal, para determinar a viscoelasticidade.

Além de células serem objetos viscoelásticos também apresentam uma fractalidade que muda mediante algumas interferências controladas de sua morfologia [27]. A dimensão fractal D_f é matematicamente definida como uma razão que determina um índice estatístico de complexidade comparando como um detalhe em um padrão geométrico muda com a escala em que é medido. Também pode ser caracterizado como uma medida da capacidade de preenchimento espacial de um padrão geométrico que descreve a relação de escala entre um fractal e o espaço em que ele se encontra. Um detalhe importante é que a dimensão fractal não necessariamente é descrita por um número inteiro.

Antes de estudar a dimensão fractal de uma rede complexa como o do citoesqueleto de actina, é importante entender a dimensão fractal de imagens de objetos simples como linhas retas e planos. A Figura 9 mostra uma imagem de objetos simples como linhas, quadrados e linhas cruzadas com diferentes tamanhos. As linhas representam objetos perfeitamente unidimensionais, e os quadrados objetos perfeitamente bi-dimensionais. As linhas cruzadas representam um modelo simplificado do citoesqueleto de actina. A Figura 10 mostra a distribuição das dimensões fractais dos diferentes objetos. Observa-se que a dimensão fractais das linhas de diferentes tamanhos possui dispersão praticamente nula, e o valor médio $D_f \approx 1$. Pelo significado geométrico da dimensão fractal, linhas retas são capazes de preencher perfeitamente espaços unidimensionais de diferentes tamanhos. No caso dos quadrados, a dispersão da distribuição também desprezível, e o valor médio de $D_f \approx 2$ indica que quadrados também

são capazes de preencher perfeitamente um espaço bi-dimensional em diferentes escalas de tamanho. No caso de linhas retas cruzadas em diferentes ângulos, observa-se uma dispersão maior, e um valor médio $D_f \approx 1.4$ intermediário entre objetos 1D e 2D. Estes resultados são importantes para oferecer uma referência para os valores de D_f do citoesqueleto de células reais.

Para obter as imagens do citoesqueleto é necessário submeter às células a um processo combinado de fixação e imunohistoquímica. Este último consiste em fixar um fluorófilo nas fibras de actina. As moléculas do fluorófilo serão opticamente excitadas pelo laser do microscópio confocal, e as imagens de fluorescência resultantes exibem a estrutura da rede de actina.

Os núcleos das células não são contabilizados no cálculo da dimensão fractal. O núcleo serve apenas como guia visual para identificar a localização das células em situações a fluorescência do citoesqueleto não foi forte o suficiente para auxiliar a localização das células isoladas. Frequentemente ocorrem casos em que duas ou mais células estão próximas o suficiente para dificultar seu reconhecimento, a marcação do núcleo também auxiliar a localizar células expostas a citocalasina por longos tempos, nas quais as fibras polimerizadas de citoesqueleto praticamente inexistem, como mostra a Figura 37.

Para estudar o efeito do tempo de ação da citocalasina no citoesqueleto, o procedimento adotado é similar ao do estudo da microreologia celular. As células presentes em um grupo de 4 placas de Petri são analisadas nos instantes nos instantes 0 (sem citocalasina), 10, 20 e 30 minutos após a aplicação de droga. Após o tempo de esperado desejado, as células são fixadas e levadas ao microscópio confocal.

O microscópio utilizado foi um Nikon LSM 710, com uma objetiva Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27. Um *laser* de argônio foi usado para excitar o fluoróforo que marca a actina com o comprimento de onda de $488nm$, e para o núcleo um *laser* contínuo de $405nm$. No *software* de controle do microscópio, foi realizado um pré-tratamento nas imagens das células com o tempo de citocalasina elevado, visto que fragmentação aumentada do citoesqueleto reduz a intensidade de fluorescência, e dificulta a captação das imagens. Neste caso, realiza-se um aumento do ganho de captação conforme as adversidades de cada célula.

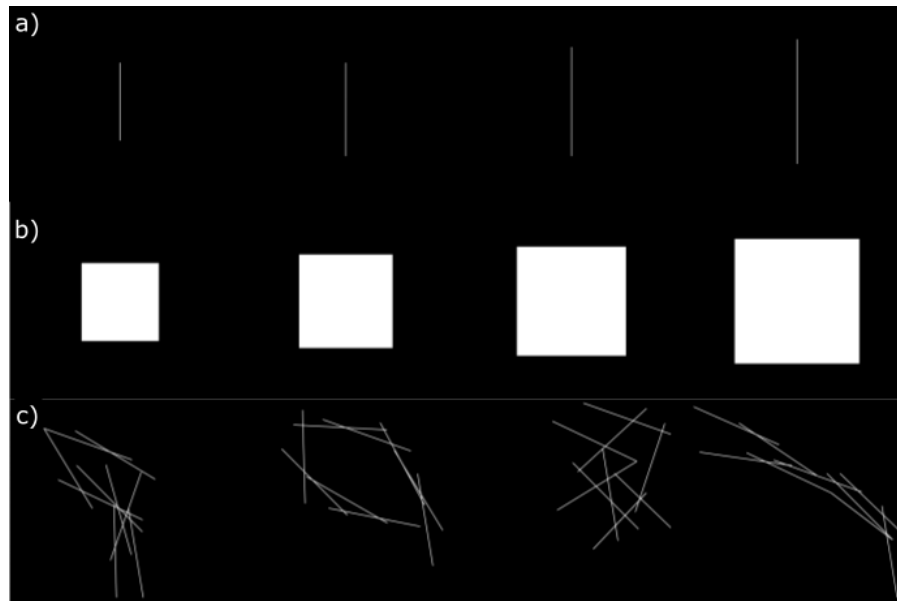


Figura 9: Imagens de simples objetos geométricos: linhas, quadrados e linhas cruzadas de diferentes tamanhos. As dimensões fractais destes objetos são mostradas na Figura 10.

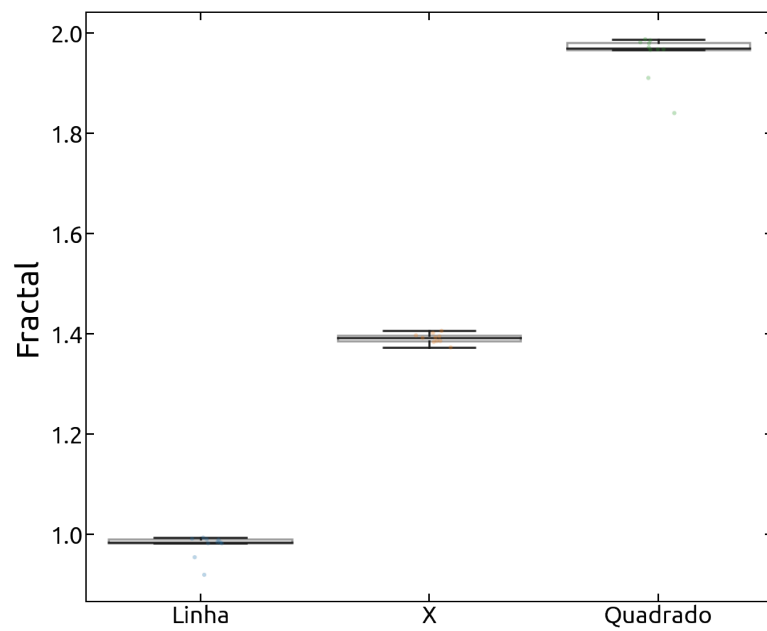


Figura 10: Distribuição da dimensão fractal D_f de simples objetos geométricos como linhas, quadrados e linhas cruzadas de diferentes tamanhos (ver Figura 9).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A estratégia geral utilizada nesta dissertação é melhor descrita pelo fluxograma da Figura 11, começando com a cultivo de células e seguindo até a correlação entre estrutura e viscoelasticidade. As etapas individuais representam metodologia teóricas ou experimentais adotadas e serão descritas nas seções subsequentes.

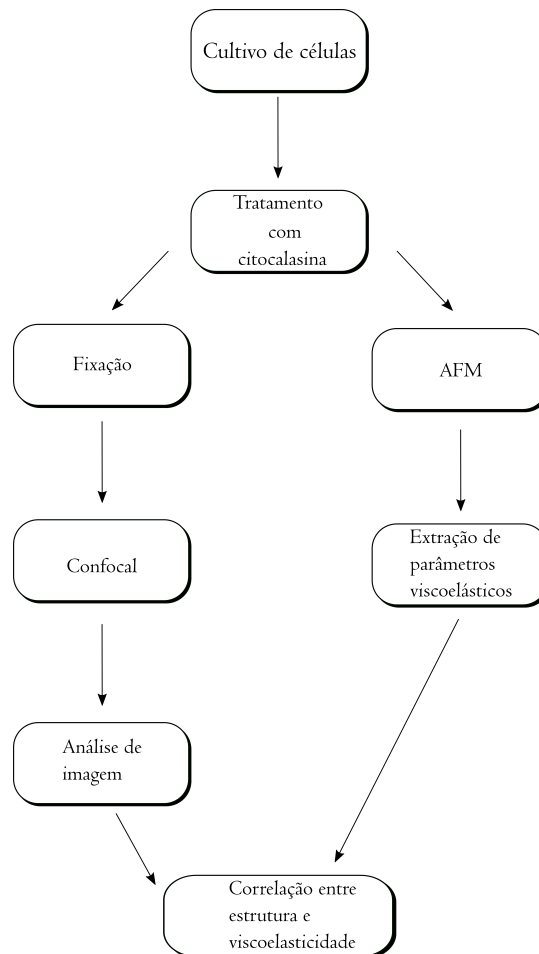


Figura 11 – Fluxograma seguido na realização do trabalho.

2.1 Cultivo de células

Existem diferentes categorias de células quando falamos em culturas *in vitro*, onde é possível encontrar células aderentes e não aderentes. As células aderentes são encontradas no fundo dos recipientes, onde ao se espalhar por todo o vidro recebendo o nome de monocamada celular. As células não aderentes ficam em suspensão, onde podem se proliferar ou sobreviver. As chamadas “primárias” são provenientes de células obtidas por separação mecânicas ou enzimáticas, porém para estudos são utilizadas “células contínuas” por terem a característica de maior duração quando comparadas com as primárias. Por fim as chamadas “transformadas” são células que perderam sua semelhança morfológica e genética.

Neste trabalho utilizamos fibroblastos de uma linhagem chamada L929 pertencentes a um conjunto de tecido conjuntivo subcutâneo normal de um camundongo. Os fibroblastos são células pertencentes ao grupo de tecidos conectivos responsáveis por funções, como unir tecidos, sustentação e preenchimento para o corpo. Ao sofrer algum corte os fibroblastos ajudam a proteger o corpo através da proliferação e reparo do tecido com um aumento na produção de colágeno no local [5].

As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado de Dulbecco de alta glicose (GIBCO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, USA) e 1% de penicilina-estreptomicina e incubadas a 37°C em 5% CO₂, mesmos protocolos seguindo na referencia [28].

2.2 Tratamento com citocalasina

A citocalasina [29] é um composto metabólico fúngico, representado pela sua molécula na Figura 12, responsável por se ligar a rede de actina das células dificultando a criação de cadeias longas e induz a despolimerização das fibras[30], além de alterar a morfologia permanentemente e interferir diretamente na divisão celular levando até mesmo a morte da célula, chamada apoptose [31]. É possível encontrar diversos trabalhos da década de 70 utilizando a citocalasina em diversas tentativas de entender seus efeitos no citoesqueleto das células [32, 33, 34, 35]. Para esse composto também foi estudado pela comunidade científica a existência de diversas atividades não relacionadas à actina como, por exemplo, a Citocalasina B responsável pela inibição do transporte de glicose [36], além do seu efeito na rede contrátil do citoplasma [37]. Citocalasina H regula o crescimento de plantas [38] e Citocalasina E atuando na inibição do crescimento de novos vasos, isto é impede a angiogênese [39]. Para a plicação da citocalasina D, no presente trabalho, foram usadas quatro placas de células, onde em uma placa é realizada a fixação imediata. As outras três coloca-se a citocalasina durante os respectivos tempos de 10, 20 e 30 minutos. Lava-se as placas três vezes e fixa as células para prosseguir com a imuno-histoquímica. A concentração usada de citocalasina foi de $10\mu M$

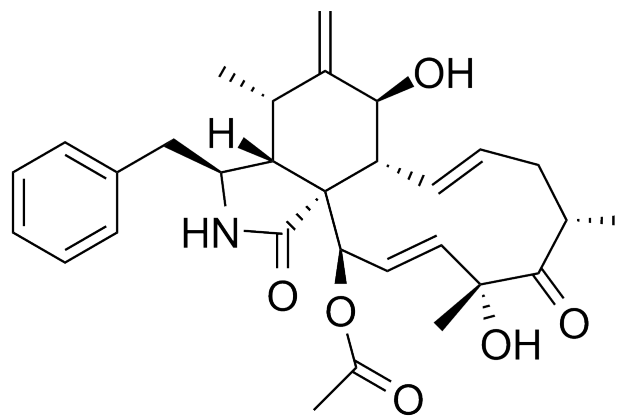


Figura 12 – Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Cytochalasin_D.png

Data de acesso: 22 de dez. de 2021.

Observando a rede de actina é possível explorar algumas características visíveis na sua estrutura, como o surgimento de aglomerados de actina e um aumento no número de extremidades[40].

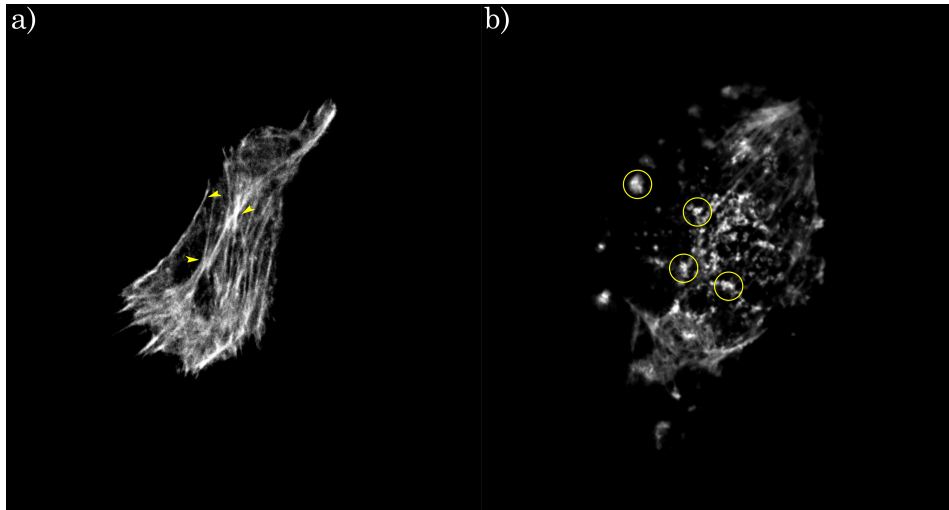


Figura 13 – Imagens do citoesqueleto de células obtida através de microscopia confocal de fluorescência. Imagem a) representa uma imagem sem o efeito da citocalasina D. Imagem b) representa uma imagem sobre o efeito da citocalasina D durante um tempo de 20 minutos.

Na Figura 13b) é possível observar o surgimento de aglomerados de actina que se formaram após 20 minutos de atuação da citocalasina D, em contrapartida, a Figura 13a) representa uma imagem controle de uma célula sem citocalasina, sendo possível observar fibras longas distribuídas sobre grande parte do citoesqueleto. As actinas formam uma rede de polimerização, isto é actinas se ligam a actinas criando assim cadeias longas. A Citocalasina, como dito anteriormente, se liga a uma dessas cadeias de fibras dificultando assim a ligação actina-actina, criando monômeros solitárias ou de sequências pequenas como representado na Figura 14.

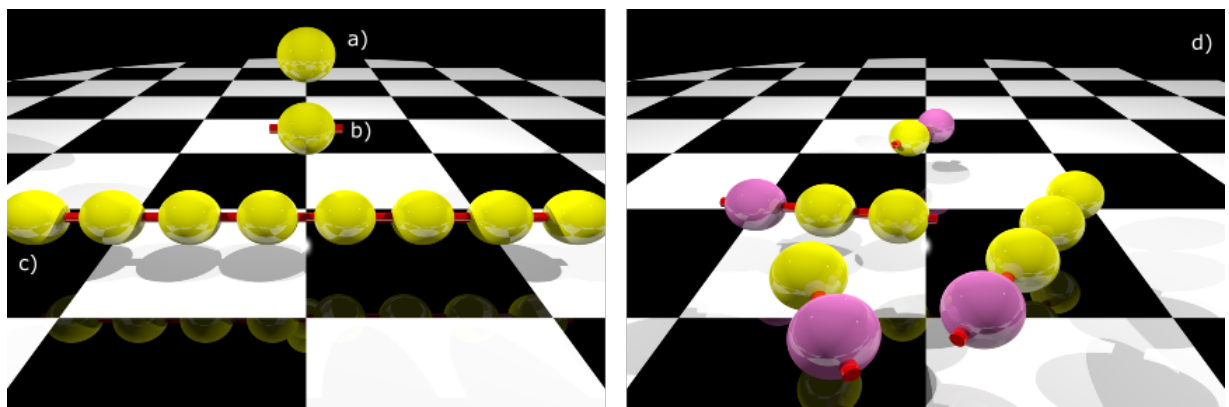


Figura 14 – Na figura a) temos a esquematização de um monômero de actina. b) Representa os Pontos Ativos de crescimento da cadeia encontrado em cada monômero. c) A representação de uma fibra de actina formada por uma cadeia de actinas interligadas. Na Figura d) podemos observar a representação da citocalasina se ligando a rede de actina formando pequenas cadeias.

As células foram fixadas com paraformaldeído(4% em PBS por 15 min), permeabilizadas com Triton X-100(0,5% em PBS por 30 min), e tratado com BSA(3% em PBS por 60 min) para bloqueio à temperatura ambiente (25°C). Os filamentos de actina F foram corados com faloidina (5 g/ml em PBS). Os núcleos foram corados Cloridrato de 4', 6-diamidina-2-fenilindol(DAPI) (100 ng/ml em PBS). As imagens confocais foram obtidas em temperatura ambiente (25 °C) com um sistema de microscopia confocal de varredura a laser LSM 710(Zeiss, Jena, Alemanha) com excitação em 488 nm e emissão entre 515 nm e 540 nm.

2.3 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica[41](AFM - atomic force microscopy) é uma técnica de microscopia muito utilizada na obtenção de imagem topológicas de amostras micro e nanométricas em ar ou fluídos. Mas o AFM vai muito além da topologia e, dependendo do modo de funcionamento, ele permite estudar as propriedades mecânicas, elétricas, magnéticas e até físico-químicas dos materiais.

O funcionamento essencial do AFM baseia-se em dois parâmetros: (i) a distância relativa entre a ponta de um cantiléver flexível (e reflexivo) e a amostra, e (ii) pequenas forças de interação entre a ponta do cantiléver e a amostra, conforme mostrado na Figura 15. Estes parâmetros são monitorados enquanto um sistema de posicionamento lateral realiza a varredura da superfície da amostra.

O cantiléver é uma haste flexível cujo tamanho é da ordem de dezenas de micrômetros, normalmente feito de nitreto de silício (Si_3N_4). Ao se aproximar das amostras, o cantiléver sofre ações de pequenas forças que causam deflexões mensuráveis por um sistema óptico acoplado. Este sistema óptico consiste em um feixe *laser* apontado para parte superior (reflexiva e oposta à amostra) do cantiléver, refletido sobre um diodo fotosensor de quatro quadrantes. À medida que o cantiléver é flexionado para cima (forças repulsivas), para baixo (forças atrativas), ou para a esquerda/direita (torções laterais), o *spot* refletido se move sobre os quadrantes do foto diodo. O sinal elétrico gerado pelo movimento do *spot* sobre os diferentes quadrantes é convertido em um sinal de força de interação entre ponta e amostra.

O controle e detecção da distância relativa e a força de interação entre ponta e amostra pode ser feito de diversas formas que compõem os diferentes modos de operação do AFM [42]. Estes modos podem ser resumidos em:

- **Contato:** Neste modo, a ponta permanece em contato com a amostra gerando uma deflexão positiva no cantiléver (para cima) à medida que a ponta varre a superfície da amostra. O AFM permite realizar esta varredura de forma que os mapas topográficos obtidos sejam adquiridos com força constante. Dependendo da constante de mola do cantiléver e

da rigidez dos materiais, pode-se obter imagens de amostras macias como células vivas (da ordem de poucos Pa) e de materiais metálicos (da ordem de 10^9 Pa). A ordem de grandeza das forças envolvidas nesse modo varia de 10^{-6} a 10^{-9} Newtons.

- **Contato intermitente:** Também conhecido como modo *tapping*, neste modo a ponta oscila verticalmente com frequência próxima da sua frequência natural de vibração bem perto da amostra, tocando-a no ponto mais baixo da oscilação, e perdendo o contato no ponto mais alto da oscilação. Dependendo das características do cantilever, a sua frequência natural de oscilação varia entre dezenas a centenas de kHz. Este modo é menos agressivo para as amostras macias e elimina as forças laterais responsáveis por danificar as amostras.
- **Não-contato:** Este modo tem como princípio detectar as forças de longo alcance (da ordem centenas de nanômetros) entre ponta e amostra. As forças envolvidas normalmente são as de Van Der Waals, eletrostáticas e magnéticas.

Nesta dissertação, deseja-se obter as propriedades viscoelásticas de células, e para obter as propriedades mecânicas de qualquer material é necessário aplicar uma força de intensidade conhecida e medir a deformação produzida em função do tempo. Desta forma, o modo de funcionamento do AFM mais apropriado a este propósito é o modo contato.

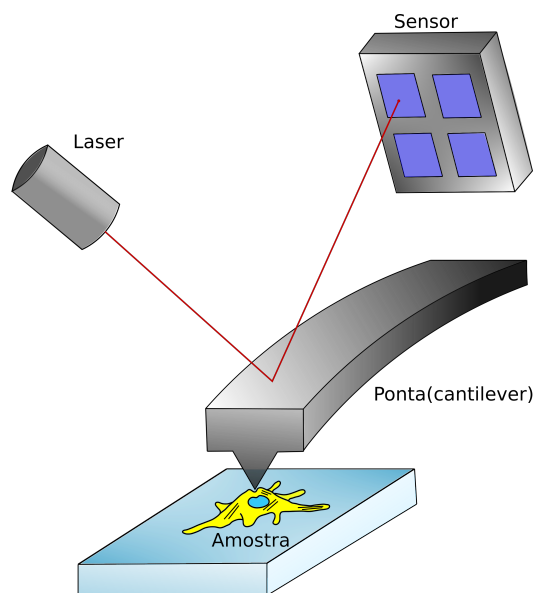


Figura 15 – Esquema de funcionamento do microscópio de força atômica

Para esta dissertação foi utilizado curvas de força com *dwell* (DFC) para estudar quatro grupos de células sobre diferentes tempos de atuação da citocalasina. O parâmetro de controle do AFM são transformados em força sentida pelo cantiléver e indentação da amostra para uma melhor visualização dos dados.

2.4 Curvas de força

No modo contato o AFM monitora a distância relativa entre cantiléver e amostra $z(t)$ e a deflexão do cantiléver $d(t)$ em cada ponto de uma determinada área da amostra. A relação entre $z(t)$ e $d(t)$ é chamada de *curva de força*. O AFM permite realizar diversas curvas de força, mas nesta dissertação adota-se o tipo *dwell* (DFC - dwell force curve) [43]. Este tipo de força é mostrado na Figura 16. Resumidamente, a curva de força possui 3 etapas: (i) aproximação, (ii) *dwell* e (iii) retração. Na aproximação, o cantiléver aproxima-se da célula movendo-se para baixo com uma velocidade v ainda sem tocar a amostra, e sua posição é monitorada pela quantidade $z(t)$. No momento do contato possui um valor d_0 , e a posição do cantiléver é z_0 . Ao tocar a amostra, a deflexão começa crescer $d(t) > d_0$ até atingir um valor máximo d_{max} . Neste momento, o cantiléver cessa seu movimento de aproximação quando $z(t) = z_{max}$, e inicia a fase *dwell* da curva de força. Durante o *dwell*, o cantiléver permanece imóvel em $z(t) = z_{max}$ durante um intervalo de tempo t_d . Após t_d , inicia-se a fase de retração onde o cantiléver se afasta da amostra com velocidade constante v até o contato ser desfeito. Estas etapas estão detalhadas na Figura 16.

A partir da curva $d(t)$ e $z(t)$ obtém-se o perfil de força $F(t)$ sobre o cantilever e o perfil de indentação $\delta(t)$ na amostra, respectivamente dados por:

$$F(t) = k_c(d(t) - d_0), \quad (2.1)$$

$$\delta(t) = (z(t) - z_0) - (d(t) - d_0), \quad (2.2)$$

onde k_c representa a constante de mola do cantiléver e depende da ponta, e seu valor é normalmente calibrado antes das medidas. O valor típico de constante de mola k_c para experimento de microreologia de células varia entre 0.01 M/m e 0.1 N/m . Nesta dissertação utilizamos pontas com valor nominal de $k_c = 0.08 \text{ N/m}$.

2.5 Microreologia celular

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 [44]:

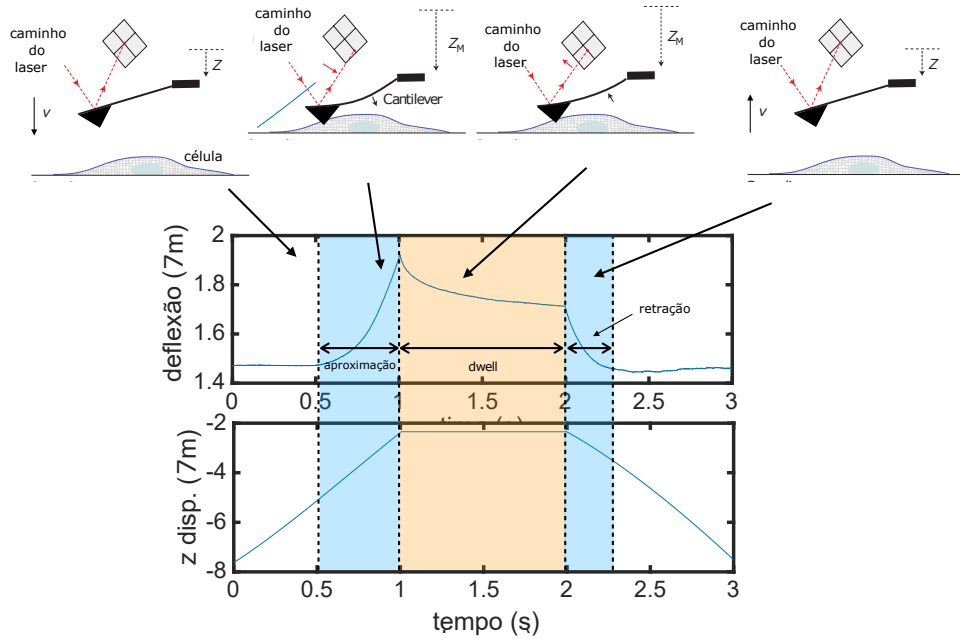


Figura 16 – Curva de força do tipo *dwell*

Tabela 1: Dependência dos parâmetros λ e $\Omega(\lambda)$ da geometria do indentedor. Abaixo, ν representa a razão de Poisson e δ é indentação.

Geometria	λ	$\Omega(\lambda)$	raio de contato radius	Obs.
cilindro	1.0	$\frac{2r}{(1-\nu^2)}$	r	r é o raio do cilindro
esfera	1.5	$\frac{4}{3} \frac{\sqrt{r}}{(1-\nu^2)}$	$\sqrt{r\delta}$	r é o raio da esfera
cone	2.0	$\frac{2}{\pi} \frac{\tan \theta}{(1-\nu^2)}$	$\delta \tan \theta$	θ é o ângulo de meia abertura do cone

$$F(t) = \Omega(\lambda) \int_0^t R(t-t') \frac{d\delta^\lambda(t')}{dt'} dt' \quad (2.3)$$

Onde $\Omega(\lambda)$ e λ são parâmetros estruturais do indentedor, mostrados na Tabela 1, $\delta(t)$ é a função que descreve o histórico de indentação, e $R(t)$ é a função relaxação do material dependente do tempo. No caso de uma DFC, a indentação pode ser escrita como [44]:

$$\delta(t) = \delta_0 \begin{cases} t/\tau_l & 0 \leq t \leq \tau_l, \\ 1 & \tau_l < t \leq \tau_l + \tau_d. \end{cases} \quad (2.4)$$

onde $\delta_0 = (z_{max} - z_0) - (d_{max} - d_0)$ é a indentação máxima durante a aproximação, τ_l é o tempo de fase de aproximação, e τ_d é a duração da fase de dwell.

Um dos principais objetivos dos experimentos de reologia é caracterizar as proprie-

dades viscoelásticas dos materiais através de sua função de relaxação $R(t)$, que descreve como a rigidez mecânica do material relaxa quando sujeito às forças externas. No caso de células, é bem aceito que elas exibem propriedades viscoelásticas compatíveis com uma ou duas leis de potência [22, 43]. Nesta dissertação, adota-se o modelo de dupla lei de potência. Este modelo é definido por dois expoentes de relaxação e um tempo de transição. Cada expoente de relaxação descreve uma lei de potência com função relaxação diferentes, o efeito da relaxação de um dos expoentes domina em relação ao outro. Estas duas contribuições são usualmente chamadas regimes de relaxação rápida e lenta, onde a relaxação rápida predomina no começo da curva de força, mais especificamente em tempos da ordem poucas centenas de milissegundos após o contato entre a ponta e a amostra. O regime lento domina em escalas de tempos acima de centenas de milissegundos, dominante no final da fase de aproximação e toda a fase de *dwell*. Este mecanismo é mostrado na Figura 17.

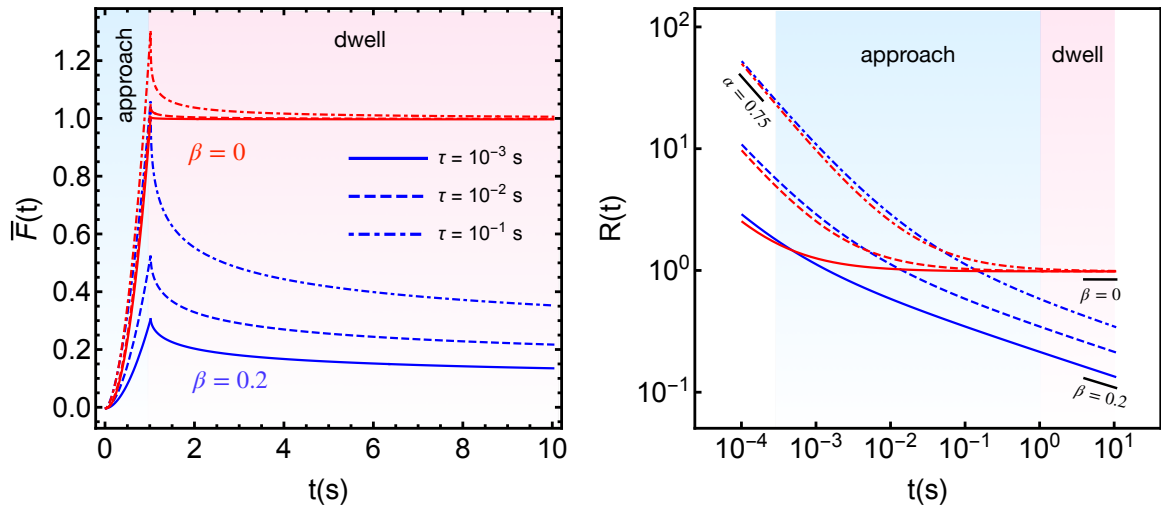


Figura 17 – (esq.) Curvas de força simuladas pela Eq. 2.3 de materiais que obedecem a uma dupla lei de potência com expoente rápido $\alpha = 0.75$, e dois expoentes lentos diferentes $\beta = 0$ e $\beta = 0.2$. O parâmetro τ é uma escala de tempo que está relacionado com o tempo de cruzamento entres os regimes rápido e lento. (dir) Funções de relaxação $R(t)$ usadas para gerar as curvas de forças simuladas.

A função relaxação do modelo de dupla lei de potência é dada por:

$$R(t) = R_{\alpha}(t) + R_{\beta}(t), \quad (2.5)$$

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 relaxação lenta (β) e a relaxação rápida (α) do material. A função $R_n(t)$ é dada por:

$$R_n(t) = R_n(t_{ref}) \left(\frac{t}{t_{ref}} \right)^{-n}, \quad (2.6)$$

onde n é o expoente de relaxação, t_{ref} é um instante de tempo de referência, e $R(t_{ref})$ é o valor

da função de relaxação em t_{ref} .

A existência de dois expoentes de relaxação, implica na existência de dois módulos elásticos $R_\alpha(t_{ref})$ e $R_\beta(t_{ref})$, que cada um descreve as respostas rápida e lenta da amostra, respectivamente. Contudo, para escalas de tempo de duração das curvas DFC adotadas nesta dissertação (aproximadamente 2s), $R_\alpha(t_{ref}) \approx 0$, e as rigidez mecânica das células será descrita apenas por $R_\beta(t_{ref})$. O significado de t_{ref} será descrito logo adiante.

A forma analítica da curva de força DFC de um material que relaxa de acordo com a uma dupla lei de potência obtida a partir da Equação 2.3 possui a seguinte forma:

$$F(t) = F_\alpha(t) + F_\beta(t) \quad (2.7)$$

onde

$$F_n(t) = \begin{cases} F_n(t) & 0 \leq t \leq t_l, \\ F_n(t)I(t_l/t, \lambda, 1 - \beta) & t_l \leq t \leq t_l + t_d, \end{cases} \quad (2.8)$$

τ_l é a duração da fase de aproximação, e τ_d é a duração da fase de *dwell*. A função $F_n(t)$ é dada por:

$$F_n(t) = \lambda \Omega_\lambda \delta_0^\lambda R_n(\tau_l) B(\lambda, 1 - n) \left(\frac{t}{\tau_l} \right)^{\lambda - \beta}. \quad (2.9)$$

Nas equações acima, a função $R(t_l)$ é a função relação em $t = \tau_l$, $B(x; n, m)$ é a função Beta incompleta que obedece $B(n, m) = B(1; n, m)$, e $I(x; n, m) = B(x; n, m)/B(n, m)$ é função Beta incompleta regularizada. τ_l and δ_0 são extraídos diretamente das curvas DFC experimentais. τ_l é controlada controlado pela frequência vertical de medida do AFM f_z ($f_z = 1$ Hz em todas as medidas). As curvas de forças experimentais serão ajustadas com as Equações 2.7 e 2.9 para determinar os principais parâmetros viscoelásticos α , β e $R_\beta(\tau_l)$. Vale ressaltar que em cada medida há pequenas variações de τ_l e, para que as comparações de módulos elásticos sejam feitas sempre no mesmo tempo de referência $t_{ref} = 1$ s, utilizou-se o escalonamento da Equação 2.6 para obtermos os módulos elásticos $E_{scaled} = R_\beta(1)$ da seguinte forma:

$$E_{scaled} = R_\beta(1) = R_\beta(\tau_l) \tau_l^\beta. \quad (2.10)$$

2.6 Microscopia confocal

A microscopia confocal apresenta uma característica bastante distinta quando comparada com a convencional, sendo sua capacidade de desconsiderar luz captada de objetos fora do plano focal. O *Pin-hole* tem a função de bloquear parte desta luz fora de foco, diferente de microscopias que utilizam fluorescência convencional onde as amostras são excitadas simulta-

neamente, dificultado o sensor obter uma maior resolução e tornando-a desfocada. Também é possível através desse aparelho capturar imagem bidimensionais de profundidade diferentes, criando imagem tridimensionais da amostra, visto que toda luz que passa pelo *Pin-hole* tem a característica de ser confocal e apenas da região focal da amostra. As células utilizadas foram preparadas através de um processo de Imunofluorescência, onde objetos que não possuem fluorescência passam por etapas de imuno-histoquímica induzindo assim adquiri-la. Fluoróforo ou fluorocromo são substancias responsáveis por absorver e emitir gradualmente sua energia, isto é, luz, assim temos uma amostra sendo a fonte de luz que será captada pelos sensores e processada de modo a se tornar uma imagem digitalizada.

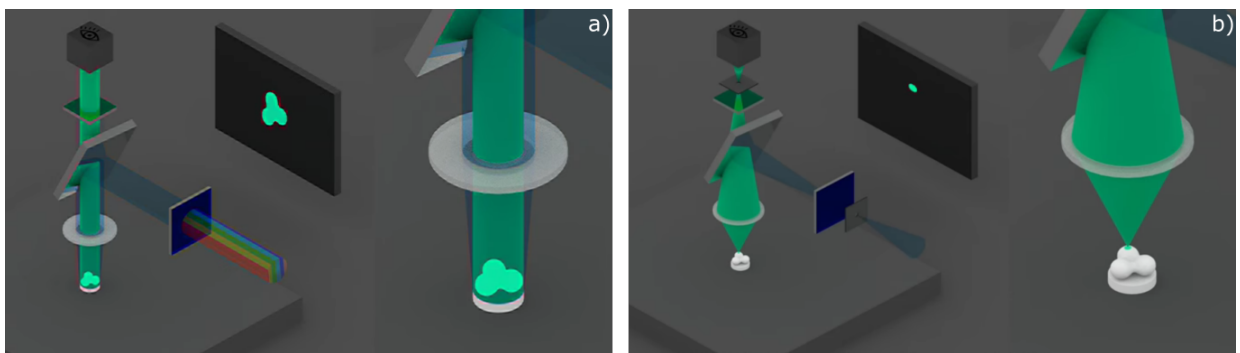


Figura 18 – Fonte: https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File%3AFluorescent_and_confocal_microscopes.ogv Data de acesso: 23 de nov. de 2021.

Na Figura 18 mostra uma representação esquemática do funcionamento de um microscópio confocal, onde é possível observar na Figura 18a) uma microscopia de fluorescência comum. Ao emitir um feixe de luz em uma frequência específica através de um conjunto de espelho até chegar na amostra, é possível observar o mesmo inundando uniformemente toda a amostra, criando uma imagem digital. Ao introduzir um *Pin-hole* no início do conjunto de espelhos, temos agora um feixe mais concentrado em um determinado ponto resultando no foco em uma área menor, responsável por obter mais detalhes das estruturas das amostras estudadas. Observando a Figura 19 é possível distinguir como o *Pin-hole* acrescenta na nitidez e qualidade em uma imagem real do citoesqueleto, visto a capacidade de escolher camadas finas nas amostras a partir do controle do diâmetro do *Pin-hole*.

2.7 Análise de imagens

Para o uso efetivo das imagens são precisos alguns passos de grande importância para garantir que os cálculos da dimensão fractal não sejam sub ou superestimados, pois o mesmo considera qualquer píxel presente em nossas imagens como caixas preenchidas. O tratamento é feito em cada imagem individualmente, onde as células são enquadradas, mesmo que o microscópio tenha captado mais de uma célula por imagem. Para a remoção do ruído é feita

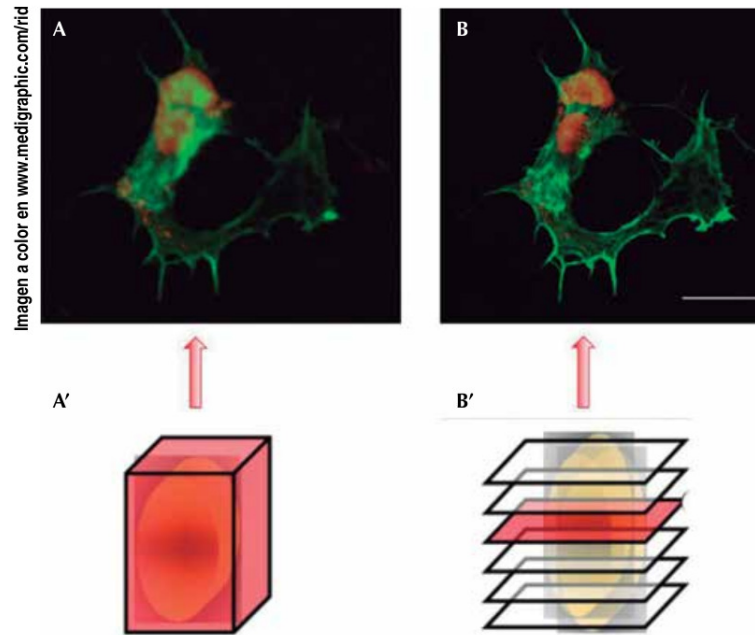


Figura 19 – A Figura A mostra uma imagem criada a partir de um microscópio convencional em comparação a Figura B criada a partir de um microscópio confocal. Fonte: Ambar López-Macay[4], 2016, p. 159.

uma análise no histograma onde retiramos os píxeis mais próximos do zero da escala de cinza. Esse píxeis de intensidade próximas ao valor zero, são normalmente fluoróforos que não se ligaram às células ou aos pedaços pequenos de células destruídas. É possível diminuir bastante esse efeito também no Software que controla o microscópio através do ganho de captação da imagem. Cada imagem é tratada individualmente para garantir que partes importantes das células sejam preservadas, como as fibras longas que passam pelo centro das células, pseudópodes responsáveis pela locomoção e as unidades de actinas, sendo bem importantes no estudo com citocalasina como podemos constatar na Figura 21. Células com alto tempo de atuação da citocalasina, não são possíveis de observar com muita frequência os pseudópode e fibras centrais longas, porém uma alta quantidade de aglomerados de actina é encontrado.

Imagens com uma boa fluorescência são representadas por histogramas com picos bem pronunciados, garantindo assim uma maior facilidade na hora de retirar o ruído do *Background*, porém algumas imagens, principalmente em tempos de atuação alta da citocalasina, não apresentavam um histograma com picos bem definidos. Para esses casos um cuidado maior é tomado de modo a aproveitar o máximo de informações possíveis da imagem. Além de todos os cuidados citados, também medimos os valores máximos do ruído e assim retirado de toda a imagem.

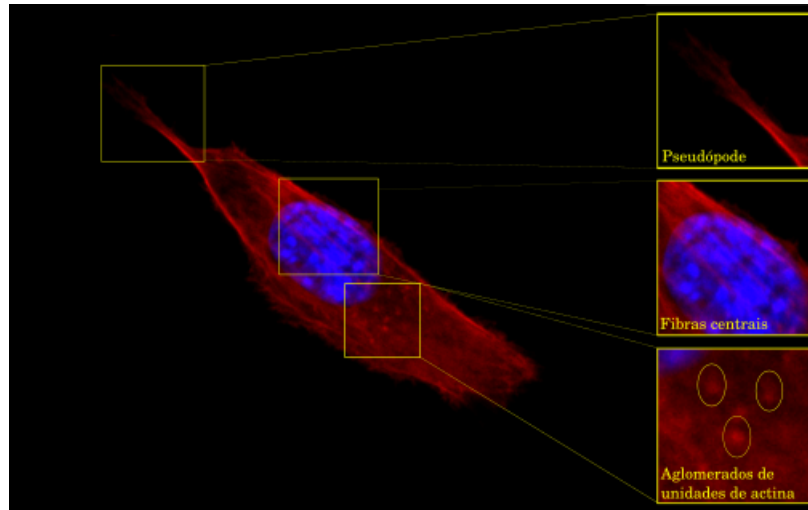


Figura 20 – A figura mostra elementos priorizados no tratamento das imagens.

O método escolhido para traçar o limiar foi Otsu [45], onde um limiar (threshold) é escolhido para remover o fundo da imagem. O mesmo consiste em encontrar a frequência máxima entre duas classes para imagens em tons de cinza, sendo elas o objeto a ser segmentado e o *Background* da imagem. Observando o histograma podemos diferenciar, normalmente, o objeto do restante da imagem por picos pronunciados e separados. Para imagens desse tipo fica claro que o *Threshold* ideal a ser escolhido deve se encontrar no vale entre os dois picos, chamado também de histograma bimodal como exemplificado na Figura 22.

Podemos encontrar frequência máxima entre as classes através da equação 2.11. Onde o W_o e W_b são os números de píxeis do objeto e *Background*, respectivamente, dividido pelo número total de píxeis. O μ_b e μ_o são as médias da frequência do *Background* e do objeto.

$$\sigma_B^2 = W_b W_o (\mu_b - \mu_o)^2, \quad (2.11)$$

O valor ideal será escolhido após o algoritmo maximizar variância intraclases, isto é, a partir dos pesos e médias, o algoritmo encontrar a variâncias entre duas classes previamente definidas através da escolha de um valor na escala de tons de cinza. Após as interações em todos os valores da escala (0 a 255) o maior valor encontrado, da variância, será o *Threshold* escolhido para a imagem. Observando a Figura 25 podemos ver um exemplo de um histograma separado em duas classes. Como citado anteriormente para o cálculo do *Threshold* é preciso varrer toda a escala de tons da imagem, dito isso podemos escolher um limiar a título de exemplificação. Escolhido o valor 2 temos que para qualquer valor menor que o limiar será considerado como *Background*. Podemos então utilizar a equação 2.11 e calcular a variância entre as classes. Calculando o W_b e W_o referente as classes *Background* e Objeto respectivamente, variáveis interpretadas como a contribuição ou peso de cada classe, onde temos:

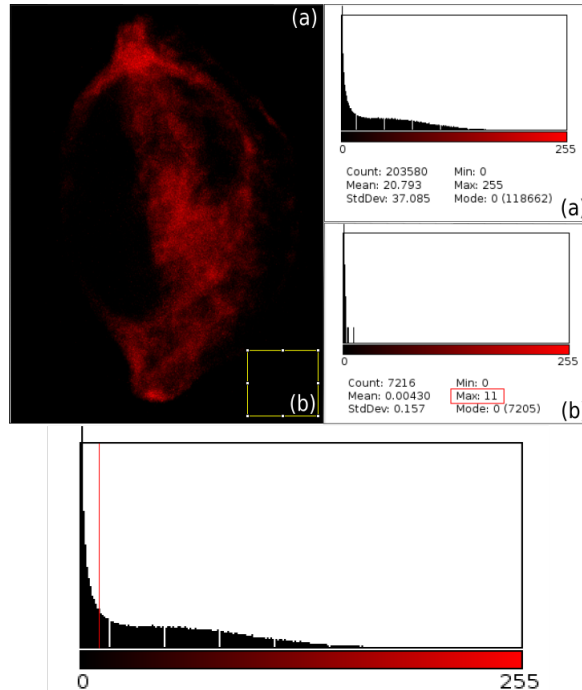


Figura 21 – Exemplo do comportamento do histograma feito em cima de uma imagem sem picos definidos. O histograma b mostra o maior valor do pixel encontrado no *Background* varrido na área do quadrado amarelo. O histograma logo abaixo mostra onde o valor máximo encontrado se localiza para ser desconsiderado da imagem.

$$W_b = \frac{9 + 3}{25} = 0.48, \quad (2.12)$$

$$W_o = \frac{2 + 4 + 7}{25} = 0.52, \quad (2.13)$$

Para as variáveis μ_b e μ_o , sendo elas a média da intensidade do *Background* e do objeto respectivamente temos:

$$\mu_b = \frac{9 \times 0 + 3 \times 1}{12} = 0.25, \quad (2.14)$$

$$\mu_o = \frac{2 \times 2 + 4 \times 3 + 7 \times 4}{13} = 3.38. \quad (2.15)$$

Temos então a variância para o valor escolhido como sendo:

$$\sigma_B^2 = W_b W_o (\mu_b - \mu_o)^2 = 2.45. \quad (2.16)$$

Com isso podemos então repetir esses passos para toda a escala, isto é, todos os tons de cinza da imagem, que para o nosso exemplo está entre 0 e 4. Assim obtemos os seguintes valores:

O observando a Tabela 2 podemos identificar que o maior valor da variância é refe-

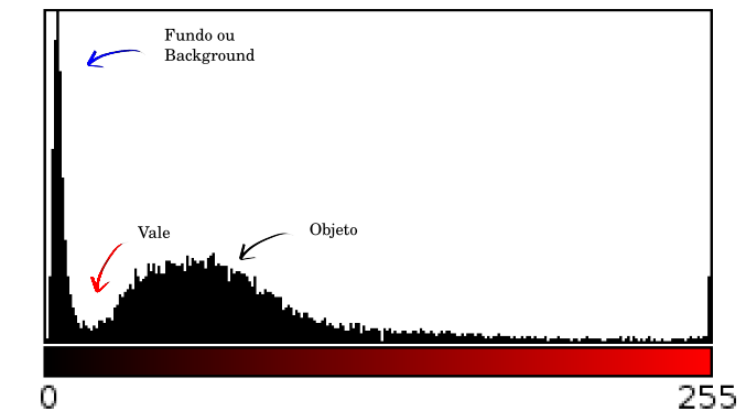


Figura 22 – A figura mostra um exemplo de histograma de uma imagem bimodal. Azul: O pico mais próximo do zero da escala indica o background da imagem; Vermelho: O vale indica a região ideal do *Threshold*; Preto: O pico mais distante do zero da escala indica o objeto estudado na imagem

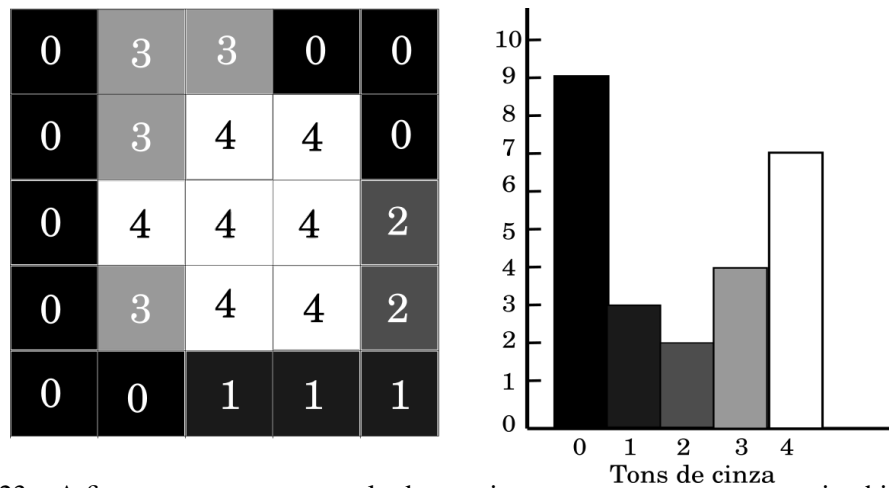


Figura 23 – A figura mostra um exemplo de uma imagem teste e o seu respectivo histograma

rente a intensidade 2, logo esse deve ser o *Threshold*. Uma vez definido a imagem binaria, nós podemos calcular a dimensão fractal através do *box-counting*.

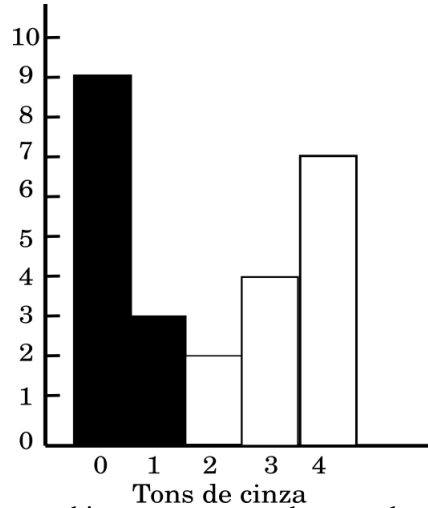


Figura 24 – A figura mostra histograma separada entre duas classes(preto e branco)

Intesidade	0	1	2	3	4
σ_B^2	0	1.99	2.45	2.42	1.75

Tabela 2: Valores referentes a imagem da Figura 25

O método escolhido, como já foi dito anteriormente, para se calcular a dimensão fractal das imagens foi o *box counting* [46], onde a ideia consiste em criar caixas na forma de grade sobre toda a figura escolhida. Com essa grade é possível contar quantas caixas preenchidas pela imagem em um determinado tamanho de caixa. A imagem a ser estudada deve ser preta e branco, pois apenas importa para o cálculo a existência ou não de um píxel na caixa, mostrando assim a importância do tratamento anterior a este passo, onde imagens em escala de cinza podem conter píxeis invisíveis aos olhos, porém com valores diferentes de zero. Com as quantidades de caixas preenchidas e o tamanho da caixa, altera-se o tamanho das caixas e são realizados novamente os passos anteriores. Com os números de caixas preenchidas e os valores do tamanho é possível utilizar a equação de *Hausdorff* 2.17 e obter um gráfico 27, que em escala logarítmica, o coeficiente angular da reta é o próprio valor da dimensão fractal.

$$D_f = \frac{\log [N]}{\log [\frac{1}{M}]} \quad (2.17)$$

A Figura 26 mostra um exemplo do *box counting* aplicado em uma figura fractal chamado *Curva de koch*. Sabendo as caixas preenchidas com algum elemento da figura fractal e a escala utilizada, podemos então criar um gráfico representado na Figura 27, onde é verificado que aumentando o número de caixas e diminuindo a escala, é possível obter resultados mais próximos do valor real.

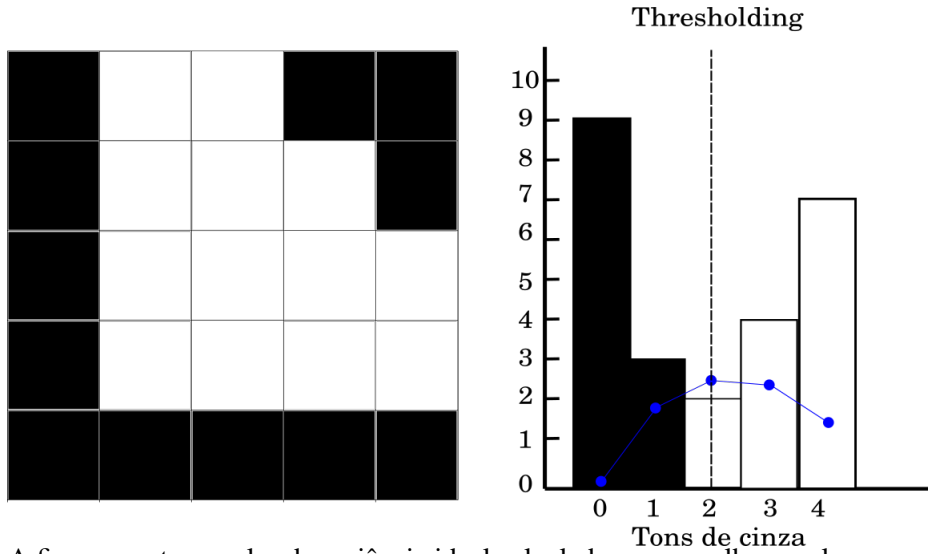


Figura 25 – A figura mostra o valor da variância ideal calculada para escolher as classes e a imagem final após aplicação do Thresholding

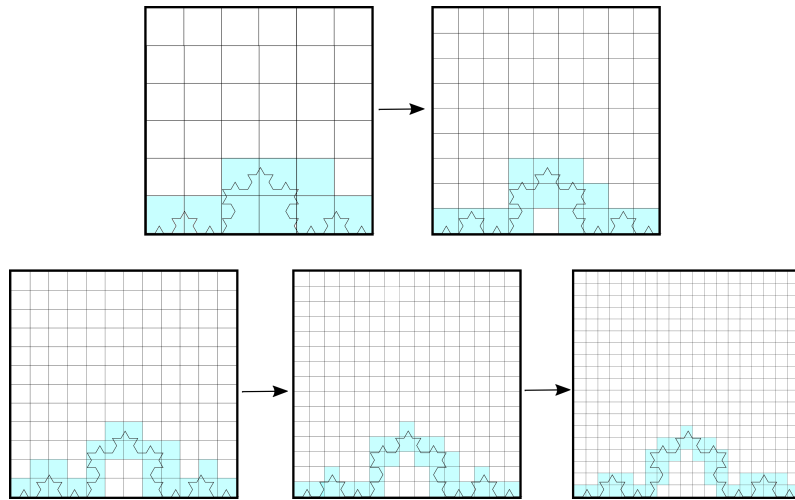


Figura 26 – A figura mostra o fractal chamado *Curva de koch* onde o método de box-couting foi aplicando, sendo representado por um cor diferente nas caixas que contém qualquer parte da figura em seu interior, respectivamente: $N_1 = 9, \delta_1 = 1/6, N_2 = 15, \delta_2 = 1/9, N_3 = 23, \delta_3 = 1/12, N_4 = 28, \delta_4 = 1/15$ e $N_5 = 41, \delta_5 = 1/19$.

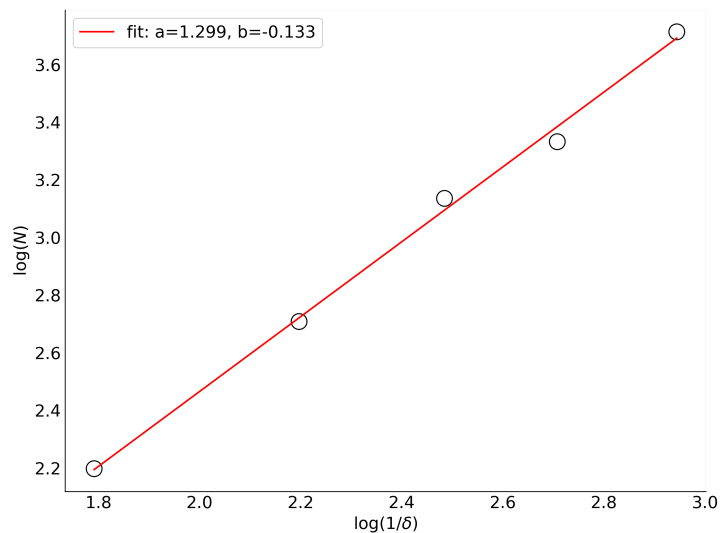


Figura 27 – Gráfico obtido após aplicar o box-couting na figura exemplo 26

3 RESULTADOS: MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O efeito biomecânico da citocalasina sobre células vivas pode ser estudado em detalhe através de experimentos de nanoindentação em um microscópio de força atômica, cuja teoria foi descrita no capítulo anterior. Dada a rápida ação da citocalasina sobre as células, é necessário adotar um protocolo de medidas no que o tempo de ação é uma variável importante a ser controlada, e será descrito a seguir.

3.1 Protocolo de medida

A Figura 29 mostra a estratégia geral de medidas de AFM visando determinar o efeito da citocalasina em função do tempo de ação desta droga. As células foram analisadas nos instantes 0 (sem citocalasina), dez, vinte e trinta minutos após a aplicação do fármaco. Como mostra a Figura, a citocalasina (na concentração de $5 \mu\text{M}$) não causa morte celular, mas faz com que as células tenham uma aparência mais *esponjosa*, como mostrado na figura 28.

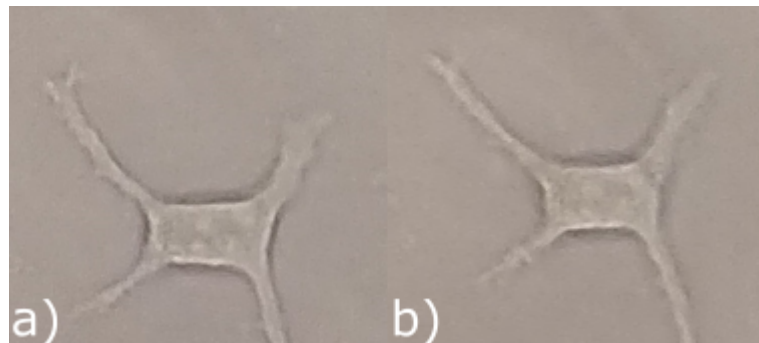


Figura 28 – A imagem mostra os efeitos da citocalasina em uma mesma célula. A imagem a) mostra uma célula sem o efeito da citocalasina. A imagem b) mostra a mesma célula sobre o efeito de trinta minutos da citocalasina, sendo possível observar o aspecto mais esponjoso no corpo celular.

Antes da aplicação de citocalasina, escolhe-se 3 células próximas e realizam-se as medidas de nanoindentação. Sobre a parte central de cada célula, são efetuadas 16 curvas de força do tipo DFC (dwell force curves) distribuídas por uma região de $16 (\mu\text{m}^2 \ 4 \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m})$. DFC é caracterizado por manter o cantilever a uma força constante sobre a amostra por um determinado tempo, medindo assim o comportamento de relaxação da célula. Como células são demasiadamente complexas e heterogêneas, espera-se que 16 curvas sobre a área central da célula seja suficiente para descrever seu comportamento mecânico médio. Estas são as medidas realizadas no instante t_0 da Figura 29.

Após as medidas, aplica-se diretamente no superfície de cultivo $5 \mu\text{M}$ de citocalasina com ajuda de um micropipetador, espalhando a droga de maneira uniforme sobre toda a

placa de Petri. Espera-se 10 min, e repetem-se as medidas mecânicas nas mesmas 3 células escolhidas inicialmente. Estas são as medidas realizadas no instante t_1 da Figura 29. As medidas mecânicas são repetidas nas mesmas 3 células nos instantes $t_2 = 20$ minutos e $t_3 = 30$ minutos. Em cada rodada de medidas, leva-se aproximadamente 2 minutos para medir as 3 células, de forma as medidas referentes a $t_1 = 10$ min ocorrem, na prática entre $t_1 \pm 1$ minutos.

Para esta dissertação, foram 3 células em 6 placas de Petri diferentes, totalizando 18 células, para as quais foram obtidas medidas mecânicas em função do tempo em um intervalo de até 30 minutos. No total, foram medidas 1152 curvas de força (64 curvas por célula) para formar uma estatística mais confiável.

Para compreender possíveis efeitos da passagem do tempo das células fora da incubadora e os efeitos do ato de medir, o mesmo protocolo foi aplicado a um conjunto controle de 3 células sem aplicação da citocalasina.

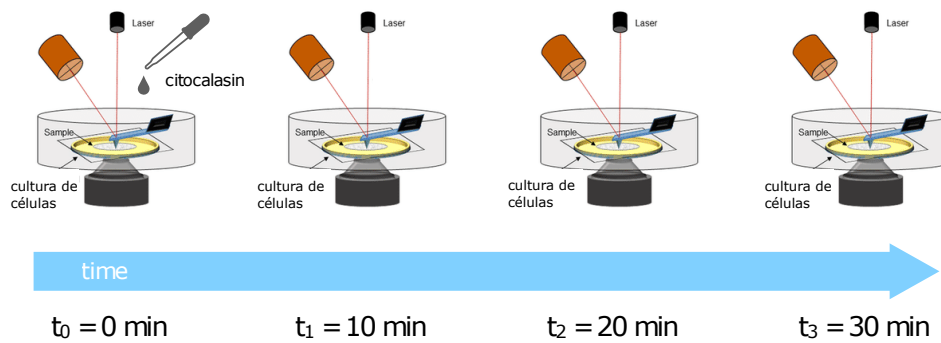


Figura 29 – Protocolo de aplicação de citocalasina e de medidas de AFM em função do tempo. Em cada placa de Petri, foram medidas 3 células individuais nos instantes 0 (sem citocalasina), 10, 20 e 30 minutos. Ao todo foram utilizadas 6 placas de Petri, totalizando 18 células.

3.2 Propriedades mecânicas do grupo controle

A Figura 30(a) mostra uma curva de força experimental do tipo DFC medida em uma célula L929 não-tratada com citocalasina. Em todas as medidas realizadas neste trabalho, adotou-se uma força máxima de $F_{MAX} = 3$ nN e um tempo de *dwell* $t_d = 1$ s. A curva experimental é perfeitamente ajustada pelo modelo teórico ($r^2 = 0.9958$) que adota uma relaxação viscoelástica do tipo dupla lei de potência para as células [22, 43]. Neste modelo, as células apresentam uma função relaxação do tipo

$$R(t) = at^{-\alpha} + bt^{-\beta} \quad (3.1)$$

onde os expoentes α e β descrevem diferentes regimes de relaxação viscoelástica, sendo um

rápido (α) e outro lento (β). O regime de relaxação rápida domina apenas nas primeiras dezenas de milissegundos após o início da indentação da célula pelo cantilever, enquanto o regime domina toda a relaxação viscoelástica para escalas de tempo acima de 100 - 200 ms. Na prática, a dupla lei de potência só é observada na região de aproximação das curvas de força (área azul da Figura 29(a)), como mostra a curva de relaxação aparente da Figura 29(b), obtida a partir da curva de força. É possível ver que a transição entre os regimes de relaxação rápida e lenta ocorre em uma escala de tempo aproximada de 100 ms.

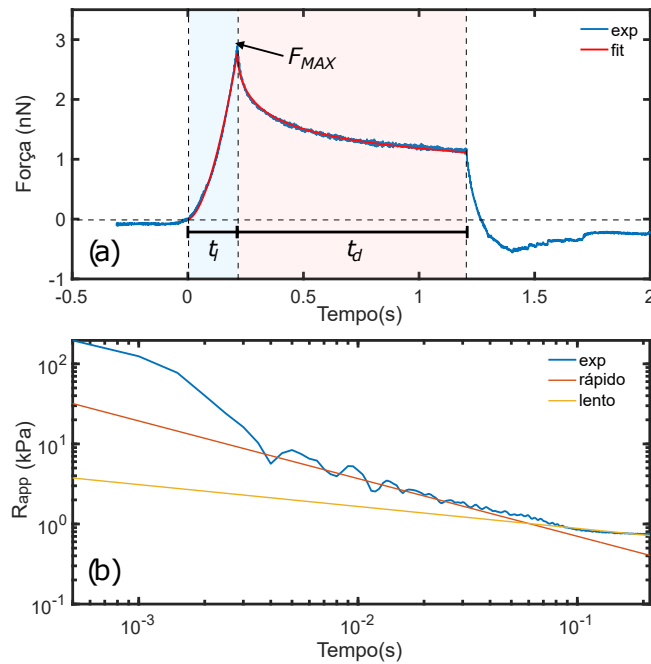


Figura 30 – (a) Curva de força típica em células L929 não-tratadas com citocalasina. A curva de força é transladada horizontalmente de forma que o ponto de contato entre a ponta do AFM e a superfície da célula ocorra em $t = 0$ s. Adotou-se $F_{MAX} = 3$ nN e $t_d = 1$ s em todas as medidas realizadas neste trabalho. O ajuste da curva experimental pelo modelo de dupla lei de potência resulta em $r^2 = 0.9958$. (b) Relaxação aparente obtida na região de aproximação (região azul) mostrando um regime de relaxação rápida ($\alpha = 0.72$) e um regime de relaxação lenta ($\beta = 0.27$).

A Figura 31 mostra a distribuição dos parâmetros fundamentais das curvas de força medidas em 3 células do grupo controle nos instantes $t = 0$, 10 e 30 minutos. Cada *box-plot* é construído a partir de 48 curvas de força medidas em 3 células distintas. Geralmente, as forças máximas aplicadas sobre as células foram menos de 10% abaixo do valor nominal de referência $F_{MAX} = 3$ nN adotado na operação do AFM. A indentação máxima δ_0 média nas células foi da ordem de 1400 nm sem variação apreciável entre 0 e 30 min, mas a dispersão aumenta com o tempo. A constante de mola efetiva das células, estimada como:

$$k = \frac{F_{MAX}}{\delta_0},$$

também não varia com tempo, exibindo um valor médio de 1.9 mN/m. É preciso ressaltar que a constante de mola efetiva das células depende fortemente aumenta linearmente com a δ_0 (para indentadores cônicos/piramidais) e determinado apenas como referência para estimar se as propriedades mecânicas das células mudam com o passar do tempo.

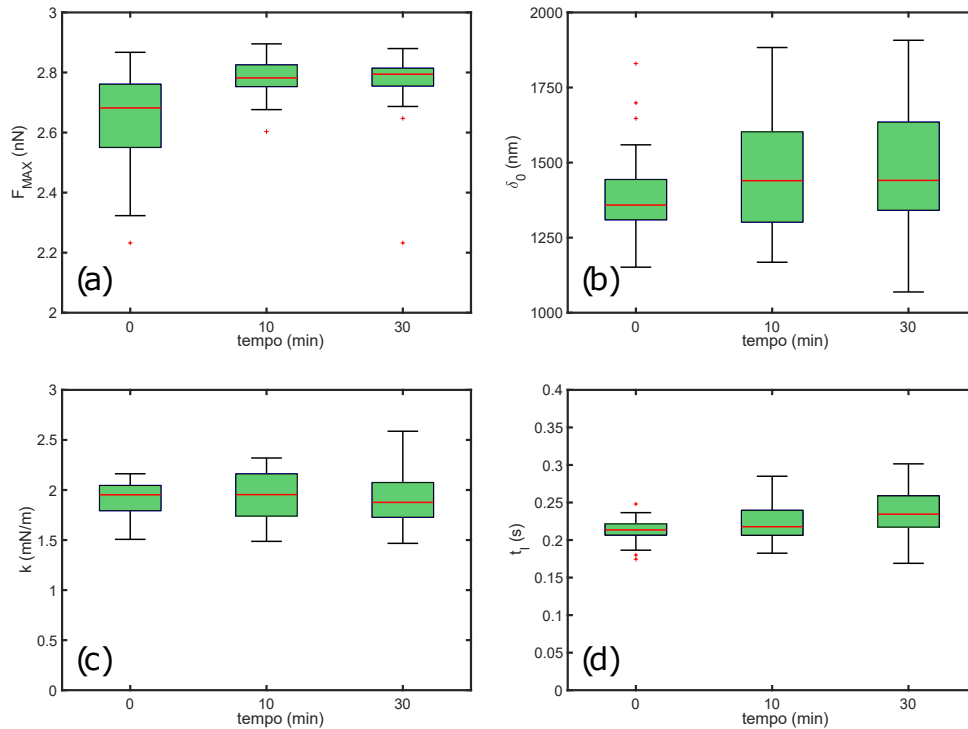


Figura 31 – Parâmetros fundamentais das curvas de força medidas em um grupo controle nos instantes $t = 0, 10$ e 30 minutos.

A análise viscoelástica das curvas de força obtidas no grupo controle são exibidas na Figura 32. Um ajuste simples da curva de aproximação utilizando o modelo de Hertz que assume a células é perfeitamente elástica mostra que o módulo elástico médio é da ordem de $E_H = 2$ kPa e não muda com o tempo. O mesmo comportamento constante ao longo do tempo é observado no módulo elástico estimado como o modelo viscoelástico da dupla lei de potência, mas com um valor médio de $E_{scaled} = 1$ kPa.

O modelo de Hertz não prevê o comportamento viscoelástico da célula, enquanto o modelo viscoelástico assume o módulo elástico dependente do tempo. No caso particular da Figura 32(b), tem-se que $E_{scaled} = E(t = 1 s)$. Portanto, a comparação direta entre E_H e E_{scaled} nem sempre é óbvia. Contudo, a Figura 32(c) mostra que estas duas quantidades estão fortemente correlacionadas através da expressão $E_H = 0.3066 + 1.86E_{scaled}$. Apesar destas quantidades fornecerem valores numéricos diferentes, elas certamente seguem as mesmas tendências.

Finalmente, a Figura 32(d) mostra a evolução temporal dos expoentes de relaxação α (caixas verdes) e β (caixas amarelas) em função do tempo nas células de controle. Percebe-se

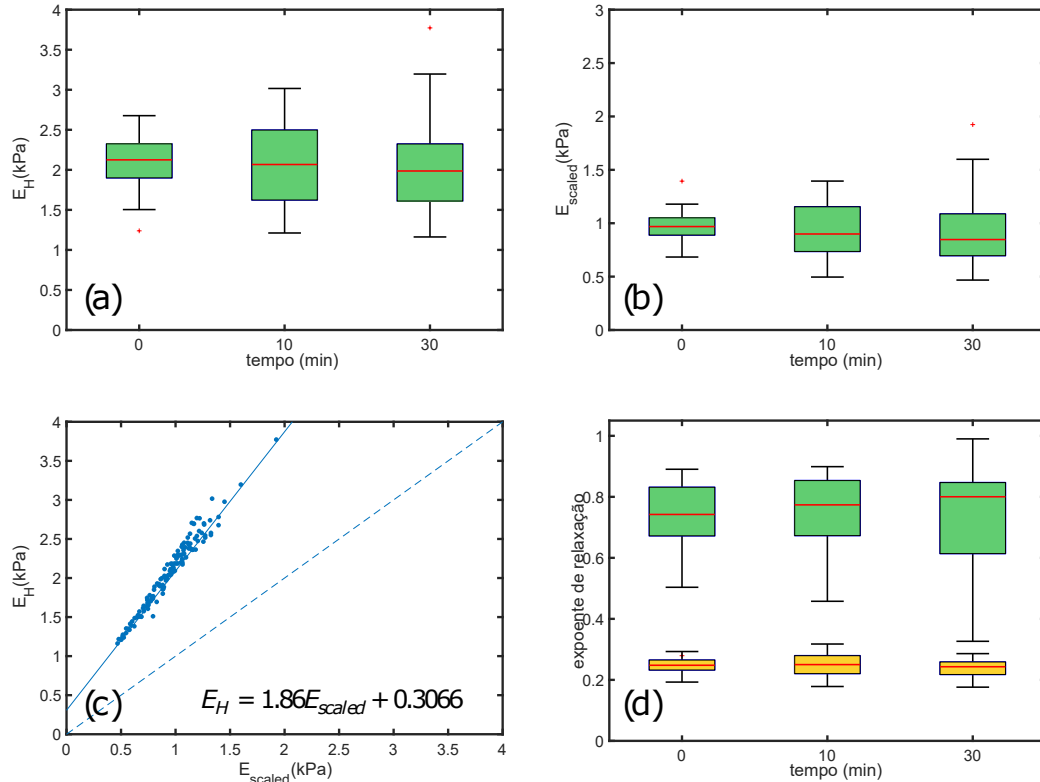


Figura 32 – Evolução temporal das propriedades viscoelásticas do grupo controle (sem citocalasina): (a) módulo de Young E_H , (b) módulo elástico E_{scaled} em $t = 1$ s, (c) Relação entre E_{scaled} e E_H , e (d) expoentes de relaxação rápida α (caixas verdes) e lento β (caixas amarelas).

que os valores médios expoentes de relaxação viscoelástica não variam apreciavelmente com tempo. É importante ressaltar que a dispersão dos expoentes rápidos (α) ser maior que a dispersão dos expoentes lentos é esperado, visto que para cada curva de força o expoente rápido é determinado nos primeiros 100 ms da curva de força, que contem substancialmente menos pontos do que na escala de tempo dominada pela relaxação lenta.

Em suma, as Figuras 31 e 32 mostram claramente que as propriedades mecânicas das células permanecem constantes no intervalo de 0 a 30 minutos.

3.3 O efeito da citocalasina

A Figura 33 mostra o efeito geral da citocalasina ao longo de 30 minutos sobre as propriedades viscoelásticas das células. Cada *boxplot* é construído com os valores médios de cada célula, em cada instante de tempo. Ou seja, trata-se de uma distribuição das médias de cada célula individual. Os *boxplot* dos instantes de 10, 20 e 30 minutos possuem 18 pontos cada, enquanto o instante 0 minuto possui 21 pontos, referentes às 18 células nas quais foram aplicadas a citocalasina mais 3 células do grupo controle.

É possível observar que o valor médio da constante de mola efetiva é da ordem de

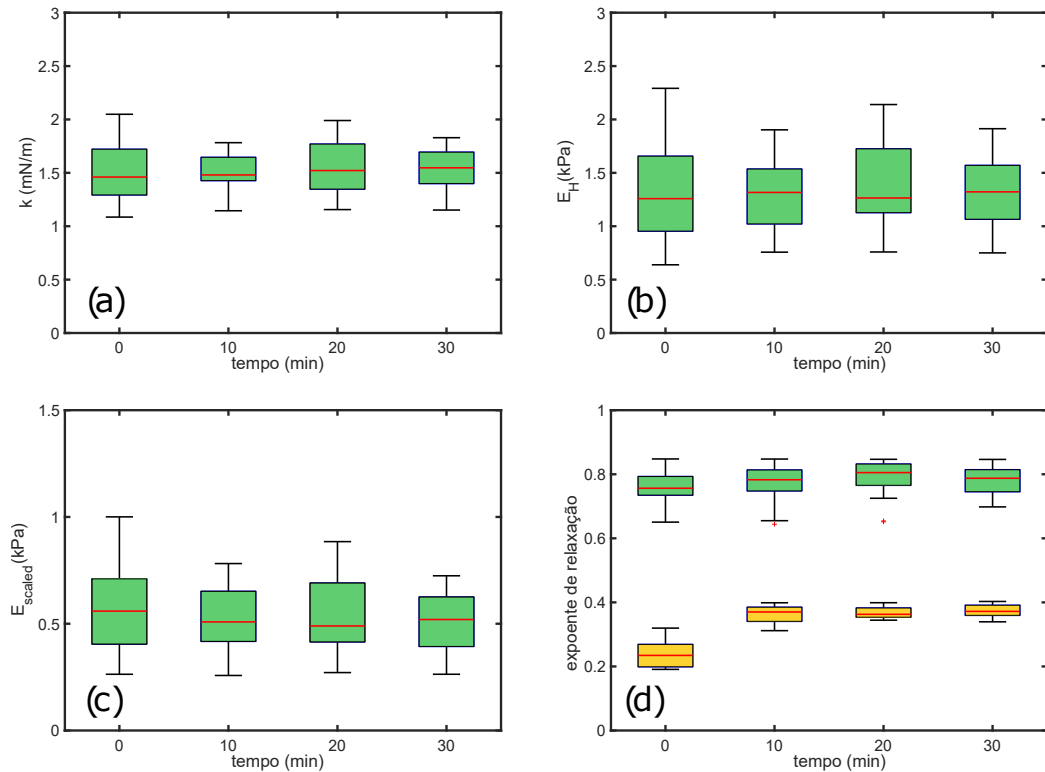


Figura 33 – Propriedades viscoelásticas das células em função do tempo de ação da citocalasina: (a) constante de mola efetiva, (b) módulo de Young, (c) módulo elástico E_{scaled} em $t = 1$ s, e (d) expoentes de relaxação rápido α (caixas verdes) e lento β (caixas amarelas).

1.5 mN/n e não muda devido à aplicação da citocalasina. A mesma tendência é observada nos módulos elásticos E_H e E_{scaled} . Em todas estas quantidades descritas acima, não há diferença estatisticamente significativa entre os diferentes instantes de tempo.

Contudo, quando se observa a distribuição dos expoentes viscoelásticos em função do tempo, é possível notar de forma inequívoca o efeito da citocalasina. O valor médio do expoente lento é de $\langle\beta\rangle = 0.23$ para as células não-tratadas, e cresce mais de 50% para $\langle\beta\rangle = 0.37$ para apenas 10 minutos após a aplicação de citocalasina. Para os instantes posteriores, não se observa nenhuma mudança no valor médio do expoente β . Para o expoente rápido tem-se $\langle\alpha\rangle = 0.75$ para as células não tratadas, e cresce cerca de 4% chegando a $\langle\alpha\rangle = 0.78$, e se mantém flutuando ao redor deste valor nos instantes posteriores.

Os dados presentes Figura 33 permite concluir que a principal ação da citocalasina é sentida no aumento do expoente de relaxação lenta das células. Um aumento deste expoente indica que a citocalasina aumenta o grau de fluidez das células. A Figura também mostra um aumento rápido do expoente β entre 0 e 10 minutos. Para tempos posteriores, as propriedades permanecem constantes. Para compreender melhor o que ocorre entre 0 e 10 minutos, realizou-se medidas em intervalos de tempo menores com uma ligeira modificação do protocolo: (i) apenas duas células foram estudadas, e em cada célula apenas 4 curvas de força foram medidas. Estes resultados são mostrados nas Figuras 34 e 35.

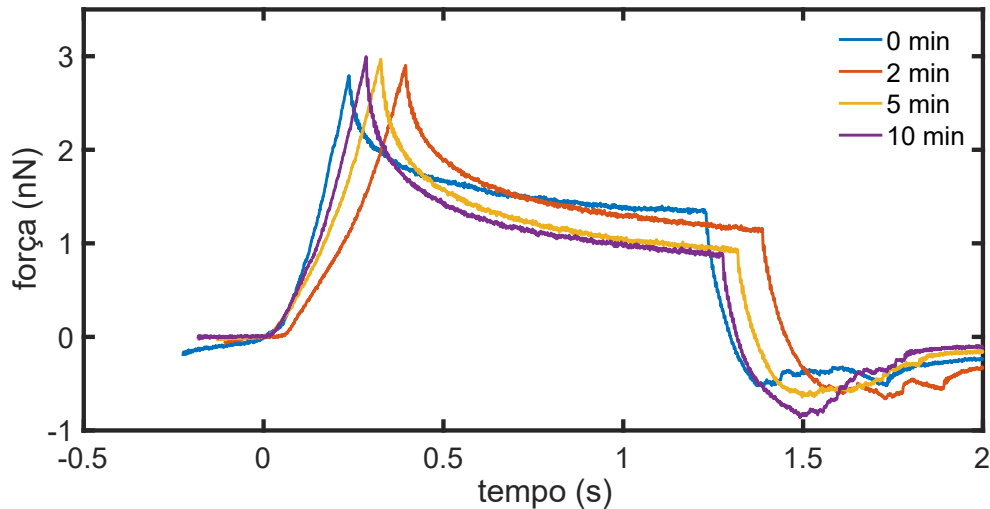


Figura 34 – Efeito da citocalasina nas curvas de força em função do tempo medida sobre a mesma célula. As curvas podem ter sido medidas em pontos diferentes da superfície celular.

Primeiramente, é possível observar que as mudanças ocorridas nas curvas de força são sutis, sendo o principal efeito observado na fase de *dwell* das curvas. A amplitude da relaxação da força, dada pela diferença entre a força máxima e a força no final do *dwell*, para a célula não-tratada é de 1.57 nN. Estes valores crescem para 1.74 nN em $t = 2$ minutos, e 2.1 nN em $t = 10$ minutos. Este aumento da amplitude da relaxação da força nas células e consequência direta da do aumento do grau de fluidização promovida pela citocalasina nas células, e matematicamente descrita por um aumento do expoente β .

A evolução temporal de β na Figura 35(b) mostra que a citocalasina começa a agir em menos de 1 minuto, e as modificações em β estabilizam em cerca de 5 minutos, sendo este o tempo estimado de ação da citocalasina *in vitro*. Apesar de o número de células estudado aqui ser pequeno (apenas 2 células), este resultado é consistente com os dados da Figura 33(d), em que o expoente médio das células cresce de 0.23 até 0.4 entre 0 e 10 minutos.

Curiosamente, a evolução temporal de E_{scaled} (Figura 35(a)) minuto a minuto mostra uma redução do módulo elástico das células como resultado da ação da citocalasina. Este resultado contradiz o resultado da Figura 33(c) que mostra que o valor médio de E_{scaled} se mantém praticamente inalterado até 30 minutos após a aplicação da citocalasina.

Para compreender as possíveis razões desta contradição é preciso entender que os valores médios na Figura 33 foram construídos para um número muito maior de células ($n = 18$), e que as distribuições foram construídas a partir dos valores médios das propriedades viscoelásticas das células. A média por célula, foi determinada a partir de 16 curvas de força uniformemente distribuídas sobre a região central da célula. Já no experimento minuto-a-minuto da Figura 35 foi realizado com um número bem menor de células ($n = 2$), e apenas 4 curvas de força foram obtidas por célula. Desta forma, a estatística dos resultados da Figura 33 é bem mais robusta e menos susceptível a casos excepcionais muito distantes do comportamento

médio. Vale ressaltar que apenas a evolução temporal de E_{scaled} na Figura 33 difere quantitativamente do comportamento médio, enquanto os valores de β reproduzem adequadamente o comportamento estatístico do grupo maior de células.

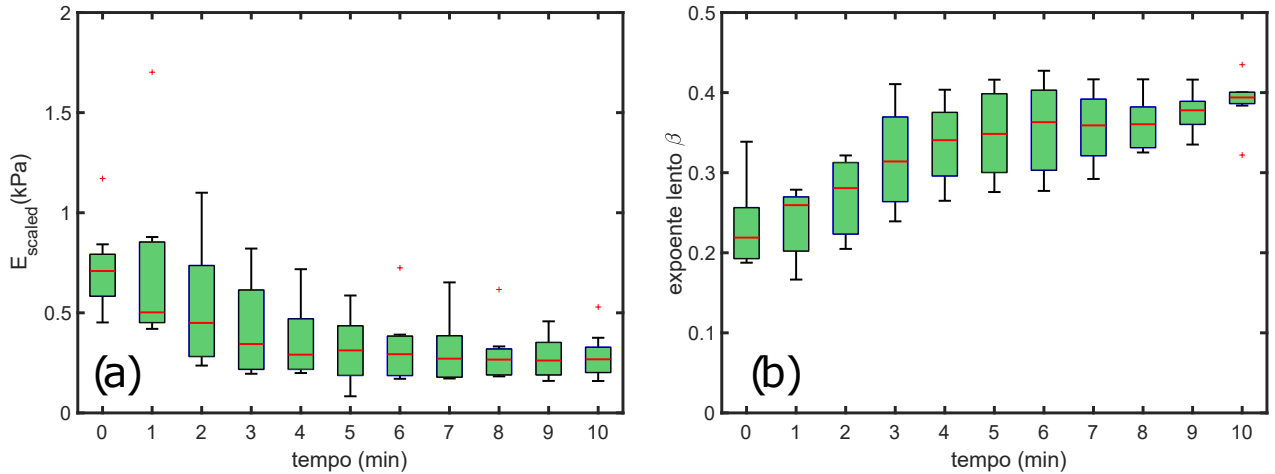


Figura 35 – Evolução temporal do módulo elástico E_{scaled} (a) e do expoente de relaxação lenta β (b) nos primeiros 10 minutos de ação da citocalasina sobre as células. Cada distribuição foi construída a partir de 4 curvas de força medidas em duas células.

Uma outro motivo possível além do tamanho da amostra para a diferença de comportamento entre as Figuras 33(c) e 34(a) é que no grupo maior foram obtidas 16 curvas de força em uma região de $16 \mu m^2$, em comparação com as 4 curvas medidas em uma área de apenas $4 \mu m^2$ no grupo menor. Isto aumenta drasticamente a chance do núcleo celular, sendo mais rígido que uma região de citoesqueleto sem núcleo, contribuir para as propriedades viscoelásticas de cada célula individualmente. Sabe-se que a citocalasina atua somente na despolimerização das fibras de f-actina, e não afeta a membrana nuclear. Desta forma, a tendência da média de E_{scaled} em permanecer constante para o grupo maior ($n = 18$) pode ser ocasionada pelo fato de que o núcleo celular não foi afetado pela citocalasina. Este efeito está diagramaticamente detalhado na Figura 36.

3.4 Discussões

Sucintamente, os resultados da micro-reologia por AFM de fibroblastos L929 tratadas ou não com citocalasina mostram que:

- As propriedades viscoelásticas das células não tratadas se mantêm inalteradas por ao menos 30 minutos.
- A citocalasina começa a atuar nas células em menos de 1 minutos, e seu efeito nas propriedades viscoelásticas das estabiliza por volta de 5 minutos após a aplicação. As propriedades viscoelásticas se mantêm inalteradas pelo menos até 30 minutos após a aplicação de citocalasina.

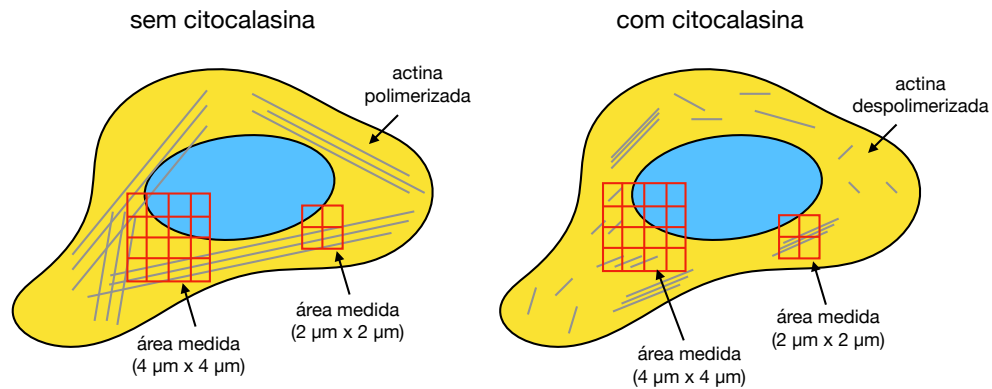


Figura 36 – Diagrama comparativo do tamanho da área de varredura realizada pelo AFM em células tratadas e não-tratadas com citocalasina. As regiões de varredura são escolhidas a olho nu no microscópio na região central da célula. A localização exata do núcleo não é conhecida. E uma área de varredura maior (16 curvas distribuídas em uma área de $4\mu m \times 4\mu m$) tem maior chance de medir partes do núcleo do que uma região menor (4 curvas distribuídas em uma área de $2\mu m \times 2\mu m$).

- O Módulo elástico médio E_{scaled} , padronizado em $t = 1$ s, reduz levemente ($\approx 12\%$) com aplicação da citocalasina. Outros parâmetros como E_H (módulo de Young obtido pelo modelo de Hertz, que trata as células como perfeitamente elásticas) e a constante de mola efetiva k permanecem inalterados.
- O principal efeito da citocalasina é observado na alteração dos expoentes de relaxação viscoelástica α (rápida) e β (lenta). O expoente α aumenta discretamente de 0.75 para 0.78 com a citocalasina, enquanto o expoente β aumenta fortemente de 0.23 para 0.37. Um aumento de expoente similar (0.20 para 0.33) foi observado em células HASM medidas por citometria magnética dinâmica [21].

4 RESULTADOS: MICROSCOPIA CONFOCAL

No capítulo anterior, as medidas de AFM mostraram que a citocalasina aumenta o grau de fluidez celular. Este aumento de fluidez é decorrente da despolimerização dos filamentos de actina, que são as estruturas co-responsáveis pela rigidez e estrutura celular. Contudo, a fragmentação destas fibras pode impactar a morfologia celular.

A morfologia celular é muito heterogênea até mesmo dentro da mesma população de células, como é possível observar na Figura 29. Apesar da quantificação da morfologia celular ter avançado tremendamente nos últimos anos, efetivamente classificar formas celulares, avaliar a extensão da heterogeneidade e definir padrões morfológicos para diferentes tipos de células é uma tarefa bastante desafiadora. A referência [47] descreve métodos sofisticados de classificação morfológica através da de parâmetros geométricos como área, excentricidade, rugosidade, e outros parâmetros matemáticos. Estes métodos baseiam-se em imagens de microscopia óptica convencional ou de contraste de fase, e são incapazes de quantificar diretamente as modificações do citoesqueleto.

A abordagem adotada nesta dissertação baseia-se na quantificação da morfologia do citoesqueleto de actina, cujas imagens são obtidas através de microscopia confocal de fluorescência, e o parâmetro matemático utilizado para quantificar a morfologia do citoesqueleto é a dimensão fractal da imagem confocal das fibras de actina de uma célula individual. Optou-se por quantificar a estrutura da rede de actina pois é nela que a citocalasina age diretamente. A dimensão fractal da rede de actina como indicador de alterações morfológicas nas células já foi utilizada em diversos trabalhos na literatura [48, 49, 27]. Os protocolos para o tratamento de imagens confocal e cálculo da dimensão fractal foram descritos detalhadamente no Capítulo 2.

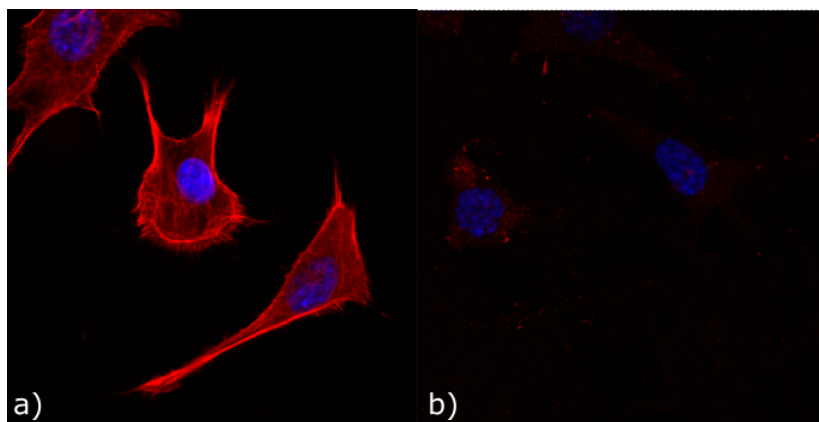


Figura 37 – Imagens confocais de células sem (a) e com (b) citocalasina após 30 minutos de aplicação. Na imagem (b) o citoesqueleto fragmentado pouco contribui para o sinal óptico, e a localização da célula só é possível devido ao sinal de fluorescência do núcleo.

4.1 O efeito da citocalasina

O estudo do tempo de ação da citocalasina foi dividido em dois grupos: (i) células cultivadas em uma superfície de cultivo pré-tratadas com colágeno, e (ii) células cultivadas diretamente no vidro sem o pré-tratamento com colágeno. A evolução temporal da ação da citocalasina no citoesqueleto de células cultivadas em vidro e colágeno é mostrada nas Figuras 38 e 39, respectivamente. Nas células sem citocalasina é possível observar a complexa rede formada pela actina em praticamente todo corpo celular. Na periferia celular há regiões de grande concentração de actina, provavelmente devido a formação dos filopódios (protusões alongadas) e outras estruturas que auxiliam nos processos de motilidade celular. Contudo, 10 minutos após a aplicação da citocalasina, a fragmentação do citoesqueleto torna-se bastante visível. Em $t = 20$ min, as longas fibras de citoesqueleto já não existem mais, apresentando apenas pequenos *clusters* de actina. Para $t = 30$ min, o citoesqueleto está quase integralmente despolimerizado. Neste caso, apesar do citoesqueleto estar praticamente invisível, as células continuam vivas como mostra a Figura 29.

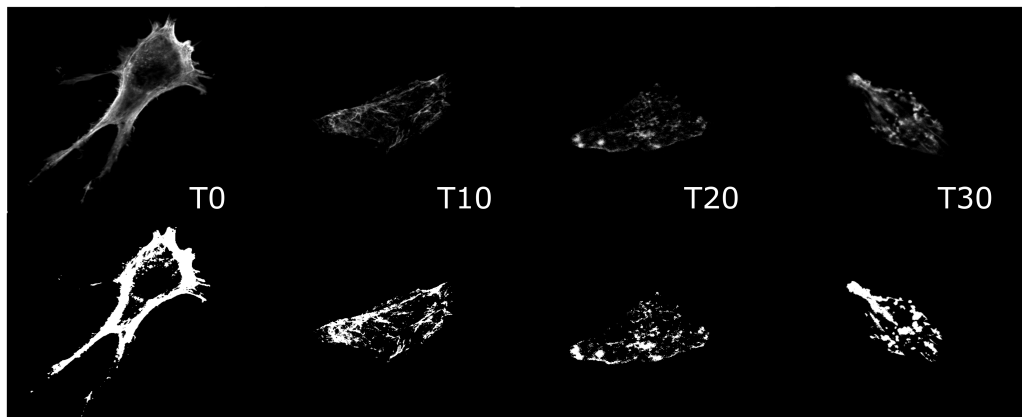


Figura 38 – Imagens confocais do citoesqueleto de actina para diferentes tempos de ação da citocalasina em *células aderidas em vidro*. A linha superior (inferior) mostra as imagens antes (depois) do *threshold* Otsu aplicado.

As Figuras 40 e 41 mostram a distribuição de D_f em função do tempo de aplicação da citocalasina de células individuais aderidas em vidro e colágeno, respectivamente. Comparando-se as células em vidro e em colágeno, observa-se um valor médio de D_f da ordem de 1.6, sendo ligeiramente maior para células aderidas em colágeno, provavelmente porque o colágeno ajuda as células aderirem melhor à superfície. Observa-se uma tendência clara na redução de D_f em função do tempo de atuação da droga tanto no vidro quanto em colágeno. Contudo, a amplitude da redução é bem maior para células em colágeno, que exibe $D_f \approx 1.1$ em comparação com $D_f \approx 1.5$ no vidro após 30 minutos de ação da citocalasina. Esta diminuição é explicada pelo fato da citocalasina quebra as ligações actina-actina, tornando as longas fibras cada vez menores, e conseqüentemente reduzindo a fluorescência captadas nas imagens.

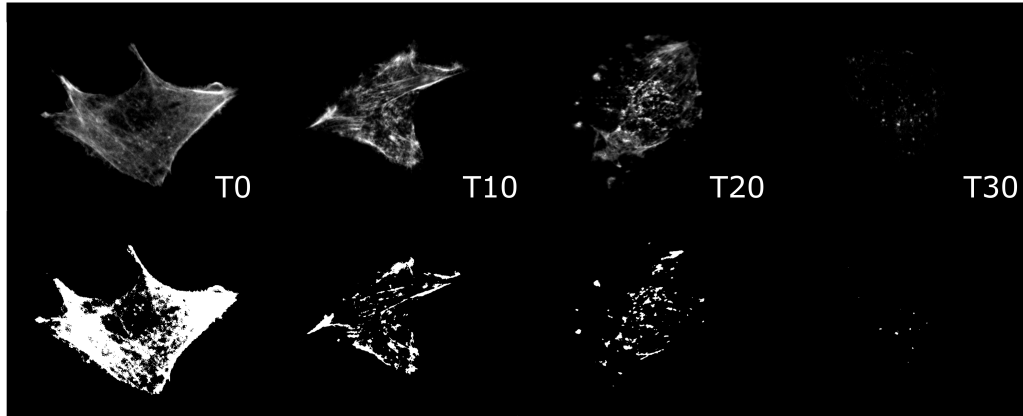


Figura 39 – Imagens confocais do citoesqueleto de actina para diferentes tempos de ação da citocalasina em *células aderidas em colágeno*. A linha superior (inferior) mostra as imagens antes (depois) do *threshold* Otsu aplicado.

4.2 Discussões

Sucintamente, os resultados da análise morfológica do citoesqueleto de actina da linhagem de fibroblastos L929 tratadas ou não com citocalasina mostram que:

- O citoesqueleto sem citocalasina são estruturas fractais com valores de D_f compatíveis com outros trabalhos da literatura [50, 27, 51, 52]. Porém, o tipo de metodologia usada na determinação de D_f e o tipo de célula estudado, dificultam uma comparação direta entre os trabalhos. Por exemplo, a dimensão fractal de células-tronco mesenquimais obtida por Revittser *et al.* é de $D_f = 1.41$ [27], inferior ao valor obtido nos fibroblastos L929.
- Em vez de citocalasina, Revittser *et al.* aplicou Lantruculina B em diferentes concentrações. Esta droga que bloqueia polimerização da actina, produzindo um efeito similar ao da citocalasina. Assim como nesta dissertação, eles também observam uma redução de D_f de aproximadamente 1.41 para cerca de 1.3. Mas isto só ocorre para altas concentrações da droga. Baixas concentrações de Lantruculina B praticamente não afetam D_f .
- Kim *et al.* determinou D_f de células epiteliais e mama (MCF10A) de uma forma diferente [52]. Eles usaram imagens em alta resolução do contorno das células obtido por Microscopia de Força Atômica no modo topografia. O valor encontrado foi de $D_f = 1.35$.
- Diferentemente do expoente de relaxação, cujas alterações estabilizam em menos de 5 minutos após a aplicação da citocalasina, esta droga continua a despolimerizar o citoesqueleto até 30 minutos após a aplicação da droga.
- Observou-se que substrato onde as células foram cultivadas possui um importante efeito na estrutura do citoesqueleto, inclusive na sua dinâmica de despolimerização. A amplitude de redução em D_f no colágeno foi muito superior ao vidro.

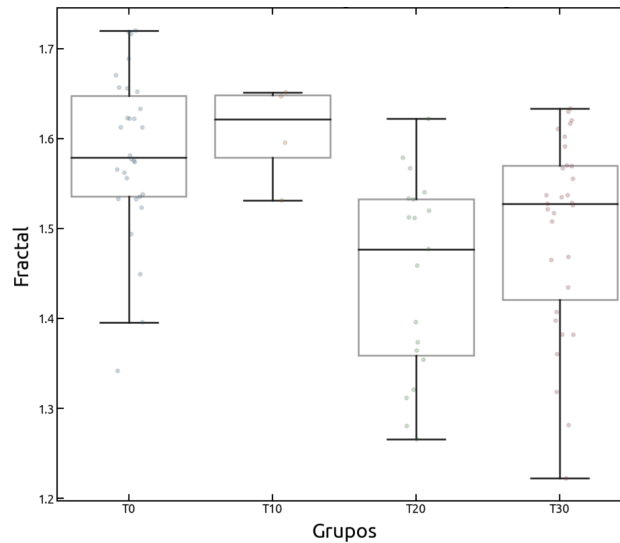


Figura 40 – Distribuição da dimensão fractal D_f do citoesqueleto de actina para diferentes tempos de ação da citocalasina em *células aderidas em vidro*. O número de células utilizado em cada distribuição é de 30 (T0), 4 (T10), 19 (T20) e 27 (T30).

- Após um longo tempo de aplicação da droga, o grau de despolimerização do citoesqueleto torna-se muito alto, reduzindo a fluorescência e dificultando a captação da imagem. O *desaparecimento* de estruturas nas imagens pode afetar os valores de D_f .
- Baseado nos resultados desta dissertação e de outros trabalhos na literatura, é possível concluir que a dimensão fractal é uma quantidade bastante sensível a alterações no citoesqueleto, e representa um importante método para quantificar a morfologia celular.

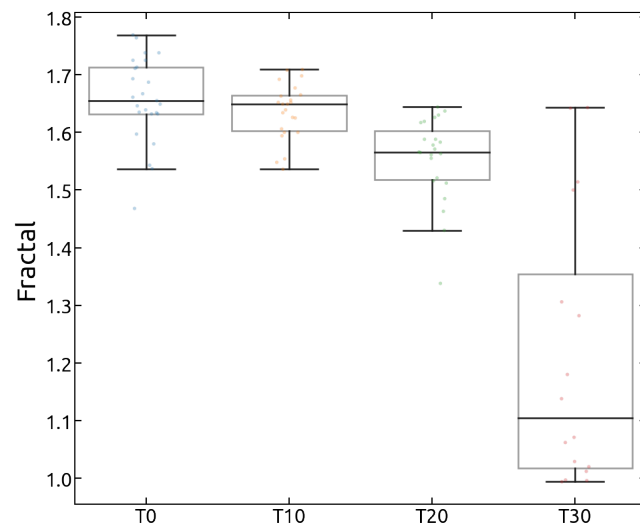


Figura 41 – Distribuição da dimensão fractal D_f do citoesqueleto de actina para diferentes tempos de ação da citocalasina em *células aderidas em colágeno*. O número de células utilizado em cada distribuição é de 25 (T0), 23 (T10), 23 (T20) e 24 (T30).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de microreologia mostraram que a fragmentação do citoesqueleto, por meio da aplicação de citocalasina, aumenta a fluidez celular. Adotando-se a dimensão fractal do citoesqueleto de actina como parâmetro para quantificar a morfologia do citoesqueleto, os resultados de microscopia confocal mostraram que a citocalasina promove uma redução de D_f . Além disso, observou-se que o substrato onde as células são cultivadas promovem pequenas variações de arranjo do citoesqueleto, e que a dimensão fractal tem sensibilidade para capturar estas pequenas modificações. O fator tempo de aplicação da droga afeta de forma diferente os fatores fluidez celular (através do expoente de relaxação lenta β) e D_f . A citocalasina age na fluidização da célula nos primeiros 5 minutos após a aplicação da droga, e após isso, o grau de fluidez estabiliza. No caso de D_f , a droga continua a despolimerizar as fibras de actina ao menos até 30 minutos após a aplicação. Isto permite concluir que há um grau mínimo de fragmentação do citoesqueleto que produz um grau máximo de fluidização das células.

Trinta minutos após a aplicação da citocalasina, a desfragmentação das fibras de actina é tanta, que torna-se muito difícil localizar as células nas imagens confocais sem que o núcleo seja também marcado. Mas mesmo neste caso extremo em que todos os filamentos de actina estejam despolimerizados e que a actina esteja na sua forma globular, e cujo tamanho é muito menor que a resolução do microscópio confocal (≈ 100 nm), o expoente de fluidez cresceu de cerca de 0.2 para aproximadamente 0.4, indicando que não houve fluidização total do corpo celular (quando $\beta = 1$). Fluidização total indica que todo o conteúdo celular encontra-se em estado perfeitamente líquido. Contudo, a citocalasina atua exclusivamente na actina, e não age sobre as outras fibras do citoesqueleto como os filamentos intermediários e microtúbulos. Além disso, há as organelas e núcleo celular cujas propriedades viscoelásticas são bastante distintas das propriedades das células como um todo [53].

Revittser *et al.* argumenta que a orientação das células, aleatoriamente posicionadas no fundo da placa de Petri, pode afetar o cálculo da dimensão fractal, mas que este efeito pode ser mitigado rotacionando-se cada imagem individual em várias vezes, e calculando o D_f de cada orientação de imagem. O valor médio de todas estas rotações é o valor de D_f mais realista, e permite uma comparação mais precisa das alterações morfológicas causadas por intervenções farmacológicas [27]. Nesta dissertação, não foi utilizada este artifício de rotação das imagens na determinação de D_f . Esta correção é vislumbrada como perspectiva de continuidade deste trabalho.

Neste trabalho investigamos a correlação da viscoelasticidade de fibroblastos e a estrutura do citoesqueleto celular, quantificada através da dimensão fractal das imagens confo-

cais. Já a viscoelasticidade celular foi determinada através de experimentos de microreologia via curvas de força de AFM. Os resultados obtidos apontam para uma relação inversa entre a dimensão fractal e o grau de fluidez das células. Um resultado surpreendente foi a capacidade dos experimentos de nanoindentação de determinar o tempo de atuação de drogas similar aos ensaios de farmacocinética [54].

A dimensão fractal revelou-se uma importante quantidade para descrever alterações diferenciais no citoesqueleto que podem causar variações das propriedades mecânicas das células. Os resultados aqui obtidos são promissores, e deixam abertas questões como:

- Outras drogas que alteram as fibras de actina produzem as mesmas variações de dimensão fractal e fluidez celular?
- Qual o efeito da fragmentação filamentos intermediários e microtúbulos na fluidez celular?
- Substratos de diferentes rigidez mecânica promovem alterações morfológicas no citoesqueleto e na fluidez celular?
- Farmacocinética por nanoindentação é uma técnica viável para estudar o maquinário celular?

Todas as questões acima são importantes para desvendar os mecanismos de homeostase e de mecanotransdução e serão investigados em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- [1] T. D. Pollard and R. D. Goldman, “Overview of the cytoskeleton from an evolutionary perspective,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 10, no. 7, p. a030288, 2018.
- [2] P. Kollmannsberger and B. Fabry, “Linear and nonlinear rheology of living cells,” *Annual review of materials research*, vol. 41, pp. 75–97, 2011.
- [3] S. Kumar, I. Z. Maxwell, A. Heisterkamp, T. R. Polte, T. P. Lele, M. Salanga, E. Mazur, and D. E. Ingber, “Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics,” *Biophysical journal*, vol. 90, no. 10, pp. 3762–3773, 2006.
- [4] A. López-Macay, J. Fernández-Torres, and A. Zepeda, “Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica,” *Investigación en discapacidad*, vol. 5, no. 3, pp. 156–164, 2016.
- [5] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, J. Wilson, and T. Hunt, *Biologia molecular da célula*. Artmed Editora, 2010.
- [6] R. Walker, E. O’Brien, N. Pryer, and M. Soboeiro, “A voter, w.; erickson, hp; salmon, ed dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: Rate constants and transition frequencies,” *J. Cell Biol*, vol. 107, pp. 1437–1448, 1988.
- [7] R. Becker, M. Leone, and F. B. Engel, “Microtubule organization in striated muscle cells,” *Cells*, vol. 9, no. 6, p. 1395, 2020.
- [8] H. Herrmann, H. Bär, L. Kreplak, S. V. Strelkov, and U. Aebi, “Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics,” *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 8, no. 7, pp. 562–573, 2007.
- [9] Z. Qin, L. Kreplak, and M. J. Buehler, “Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments,” *PloS one*, vol. 4, no. 10, p. e7294, 2009.
- [10] M. B. Omary, P. A. Coulombe, and W. I. McLean, “Intermediate filament proteins and their associated diseases,” *New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 20, pp. 2087–2100, 2004.
- [11] F. C. Ramaekers and F. T. Bosman, “The cytoskeleton and disease,” *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, vol. 204, no. 4, pp. 351–354, 2004.
- [12] C.-M. Lo, H.-B. Wang, M. Dembo, and Y.-l. Wang, “Cell movement is guided by the rigidity of the substrate,” *Biophysical journal*, vol. 79, no. 1, pp. 144–152, 2000.
- [13] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, “Matrix elasticity directs stem cell lineage specification,” *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–689, 2006.

- [14] R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, “Cell shape, cytoskeletal tension, and rhoa regulate stem cell lineage commitment,” *Developmental cell*, vol. 6, no. 4, pp. 483–495, 2004.
- [15] T. A. Ulrich, E. M. de Juan Pardo, and S. Kumar, “The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells,” *Cancer research*, vol. 69, no. 10, pp. 4167–4174, 2009.
- [16] M. Gupta, B. R. Sarangi, J. Deschamps, Y. Nematbakhsh, A. Callan-Jones, F. Margadant, R.-M. Mège, C. T. Lim, R. Voituriez, and B. Ladoux, “Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing,” *Nature communications*, vol. 6, no. 1, pp. 1–9, 2015.
- [17] S. F. Kemeny and A. M. Clyne, “A simplified implementation of edge detection in matlab is faster and more sensitive than fast fourier transform for actin fiber alignment quantification,” *Microscopy and Microanalysis*, vol. 17, no. 2, pp. 156–166, 2011.
- [18] T. A. Ulrich, E. M. de Juan Pardo, and S. Kumar, “The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells,” *Cancer research*, vol. 69, no. 10, pp. 4167–4174, 2009.
- [19] I. Konatar, T. Popovic, and N. Popovic, “Box-counting method in python for fractal analysis of biomedical images,” in *2020 24th International Conference on Information Technology (IT)*, pp. 1–4, IEEE, 2020.
- [20] A. C. Fischer-Cripps, *Introduction to contact mechanics*, vol. 101. Springer, 2007.
- [21] B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N. A. Taback, E. J. Millet, and J. J. Fredberg, “Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells,” *Physical Review E*, vol. 68, Oct. 2003.
- [22] 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*, vol. 10, Mar. 2020.
- [23] B. D. Hoffman, G. Massiera, K. M. V. Citters, and J. C. Crocker, “The consensus mechanics of cultured mammalian cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, pp. 10259–10264, July 2006.
- [24] B. D. Hoffman and J. C. Crocker, “Cell mechanics: Dissecting the physical responses of cells to force,” *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 11, pp. 259–288, Aug. 2009.
- [25] C. Rotsch and M. Radmacher, “Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study,” *Biophysical journal*, vol. 78, no. 1, pp. 520–535, 2000.
- [26] G. Tomaiuolo, M. Barra, V. Preziosi, A. Cassinese, B. Rotoli, and S. Guido, “Microfluidics analysis of red blood cell membrane viscoelasticity,” *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 3, pp. 449–454, 2011.

- [27] A. Revittser, I. Selin, Y. Negulyaev, and V. Chubinskiy-Nadezhdin, "The analysis of f-actin structure of mesenchymal stem cells by quantification of fractal dimension," *Plos one*, vol. 16, no. 11, p. e0260727, 2021.
- [28] J. De Sousa, R. Freire, F. Sousa, M. Radmacher, A. Silva, M. Ramos, A. Monteiro-Moreira, F. Mesquita, M. Moraes, R. Montenegro, *et al.*, "Double power-law viscoelastic relaxation of living cells encodes motility trends," *Scientific reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2020.
- [29] J. A. Cooper, "Effects of cytochalasin and phalloidin on actin.," *Journal of Cell Biology*, vol. 105, no. 4, pp. 1473–1478, 1987.
- [30] J. F. Casella, M. D. Flanagan, and S. Lin, "Cytochalasin d inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change," *Nature*, vol. 293, no. 5830, pp. 302–305, 1981.
- [31] A. M. Haidle and A. G. Myers, "An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: Synthesis of l-696,474 and cytochalasin b," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 33, pp. 12048–12053, 2004.
- [32] M. D. Flanagan and S. Lin, "Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with f-actin.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 255, no. 3, pp. 835–838, 1980.
- [33] A. F. Miranda, G. C. Godman, A. D. Deitch, and S. W. Tanenbaum, "Action of cytochalasin d on cells of established lines: I. early events," *The Journal of cell biology*, vol. 61, no. 2, pp. 481–500, 1974.
- [34] S. S. Brown and J. A. Spudich, "Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments," *The Journal of cell biology*, vol. 83, no. 3, pp. 657–662, 1979.
- [35] D. C. Lin, K. D. Tobin, M. Grumet, and S. Lin, "Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation.," *The Journal of cell biology*, vol. 84, no. 2, pp. 455–460, 1980.
- [36] A. L. Rampal, H. B. Pinkofsky, and C. Y. Jung, "Structure of cytochalasins and cytochalasin b binding sites in human erythrocyte membranes," *Biochemistry*, vol. 19, no. 4, pp. 679–683, 1980.
- [37] M. Britch and T. D. Allen, "The effects of cytochalasin b on the cytoplasmic contractile network revealed by whole-cell transmission electron microscopy," *Experimental Cell Research*, vol. 131, no. 1, pp. 161–172, 1981.
- [38] R. H. Cox, P. Morris, H. G. Cutler, R. E. Hurd, and R. J. Cole, "Proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of the conformation of cytochalasin h derivatives and plant growth regulating effects of cytochalasins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 405–408, 1983.
- [39] T. Udagawa, J. Yuan, D. Panigrahy, Y.-H. Chang, J. Shah, and R. J. D'Amato, "Cytochalasin e, an epoxide containing aspergillus-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 294, no. 2, pp. 421–427, 2000.

- [40] M. Schliwa, "Action of cytochalasin d on cytoskeletal networks.," *Journal of Cell Biology*, vol. 92, no. 1, pp. 79–91, 1982.
- [41] S. Vahabi, B. N. Salman, and A. Javanmard, "Atomic force microscopy application in biological research: a review study," *Iranian journal of medical sciences*, vol. 38, no. 2, p. 76, 2013.
- [42] P. S. Herrmann, M. A. da Silva, R. Bernardes F^o, A. E. Job, L. A. Colnago, J. E. Frommer, and L. H. Mattoso, "Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros," *Polímeros*, vol. 7, pp. 51–61, 1997.
- [43] F. B. de Sousa, P. K. V. Babu, M. Radmacher, C. L. N. Oliveira, and J. S. de Sousa, "Multiple power-law viscoelastic relaxation in time and frequency domains with atomic force microscopy," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 54, p. 335401, June 2021.
- [44] J. De Sousa, J. Santos, E. Barros, L. Alencar, W. Cruz, M. Ramos, and J. Mendes Filho, "Analytical model of atomic-force-microscopy force curves in viscoelastic materials exhibiting power law relaxation," *Journal of Applied Physics*, vol. 121, no. 3, p. 034901, 2017.
- [45] N. Otsu, "A threshold selection method from gray-level histograms," *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*, vol. 9, no. 1, pp. 62–66, 1979.
- [46] R. C. Coelho and L. d. 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*, vol. 95, pp. 183–191, 1995.
- [47] J. M. Phillip, K.-S. Han, W.-C. Chen, D. Wirtz, and P.-H. Wu, "A robust unsupervised machine-learning method to quantify the morphological heterogeneity of cells and nuclei," *Nature Protocols*, vol. 16, pp. 754–774, Jan. 2021.
- [48] J. W. Fuseler, C. F. Millette, J. M. Davis, and W. Carver, "Fractal and image analysis of morphological changes in the actin cytoskeleton of neonatal cardiac fibroblasts in response to mechanical stretch," *Microscopy and Microanalysis*, vol. 13, pp. 133–143, Mar. 2007.
- [49] A. R. Qian, D. Li, J. Han, X. Gao, S. M. Di, W. Zhang, L. F. Hu, and P. Shang, "Fractal dimension as a measure of altered actin cytoskeleton in MC3t3-e1 cells under simulated microgravity using 3-d/2-d clinostats," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 59, pp. 1374–1380, May 2012.
- [50] T. Smith Jr, W. Marks, G. Lange, W. Sheriff Jr, and E. Neale, "A fractal analysis of cell images," *Journal of neuroscience methods*, vol. 27, no. 2, pp. 173–180, 1989.
- [51] D. Ristanović, B. D. Stefanović, and N. Puškaš, "Fractal analysis of dendrite morphology using modified box-counting method," *Neuroscience Research*, vol. 84, pp. 64–67, 2014.
- [52] Y. J. Kim, H.-D. Kim, H. H. Kim, S.-M. Shin, C. J. Kang, and K. H. Lee, "Fractal analysis of cell boundary ultrastructure imaged by atomic force microscopy," *Animal Cells and Systems*, vol. 19, no. 3, pp. 161–167, 2015.
- [53] F. Guilak, J. R. Tedrow, and R. Burgkart, "Viscoelastic properties of the cell nucleus," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 269, pp. 781–786, Mar. 2000.

- [54] A. Ruiz-Garcia, M. Bermejo, A. Moss, and V. G. Casabo, "Pharmacokinetics in drug discovery," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, pp. 654–690, Feb. 2008.