



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA
CURSO DE DOUTORADO

ANTÔNIO VINNIE DOS SANTOS SILVA

**ANÁLISE BIOMECÂNICA E PERFIL
PROTEÔMICO DE CÉLULAS EM RESPOSTA À
ABSORÇÃO DE LUZ VERMELHA**

FORTALEZA – CEARÁ

2025

ANTÔNIO VINNIE DOS SANTOS SILVA

ANÁLISE BIOMECÂNICA E PERFIL
PROTEÔMICO DE CÉLULAS EM RESPOSTA À ABSORÇÃO DE
LUZ VERMELHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Física.
Área de concentração: Física.

Orientador: Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa.

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Domingos de Sousa.

FORTALEZA – CEARÁ

2025

ANTÔNIO VINNIE DOS SANTOS SILVA

ANÁLISE BIOMECÂNICA E PERFIL PROTEÔMICO DE CÉLULAS EM
RESPOSTA À ABSORÇÃO DE LUZ VERMELHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Física. Área de concentração: Física.

Aprovada em: 24/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Felipe Domingos de Sousa (Coorientador)
Universidade de Fortaleza (Unifor)

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

Profa. Dra. Adriana Fontes
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Marcelo Victor Pires de Sousa
Instituto Federal de Sergipe (IFSE)

Ao meu filho Ian Oliveira (*in memoriam*) e à
minha filha Melissa.

AGRADECIMENTOS

À querida Dra. Daniele Bezerra dos Santos (minha amiga-irmã), pela inestimável amizade e apoio, que se mostraram fundamentais nos períodos de maior adversidade, particularmente durante o luto pela perda de meu filho. Suas palavras diárias de conforto foram essenciais para minha resiliência. Foi um privilégio tê-la como colega de trabalho no IFRN e sou profundamente grato por seu incentivo constante.

À minha família: à minha esposa Caroline, companheira incondicional em todas as horas; à minha mãe, meu alicerce e porto seguro; e aos meus irmãos, pelo orgulho ao trilharem caminhos de retidão.

Às minhas primeiras educadoras do Educandário Madre Tereza de Calcutá, da Escola Gondim de Lima e da Escola Milton Dias. O tempo não apagou a admiração que nutro por estas mulheres que me introduziram ao universo da leitura e da aritmética. Todo o meu reconhecimento às professoras Irenilza, Laila, Ana Eleuses, Neuma Bezerra e Lúcia Lavôr; guardo comigo as melhores lembranças de seus ensinamentos.

Às queridas Amélia Reis e Antonia Francimar, pela valiosa companhia e amizade ao longo destes anos. Gestoras e profissionais de excelência que o IFRN me proporcionou conhecer. Estendo este agradecimento aos amigos e colegas do IFRN: Kaiser, Michelle, Thárcio, Sérgio, Lucas Chnaiderman, Marcílio, Adriana e Abreu, exemplos de lealdade e profissionalismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa, pela paciência, dedicação e orientação constante ao longo destes anos. Minha profunda gratidão por sua condução, fundamental para minha imersão e amadurecimento como cientista.

Ao meu coorientador, Dr. Felipe Sousa, pela parceria e pelo comprometimento em viabilizar a execução deste trabalho.

Ao Professor Cláudio Lucas, pela profícua parceria. A todos os integrantes do Laboratório de Física Biológica e do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex-Unifor).

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), em especial à Professora Nylane, pela acolhida e pela oportunidade de aprendizado em técnicas de bancada.

Ao Professor Marcelo Sousa, pelo fundamental suporte durante a realização desta pesquisa.

Às queridas Fernanda, Liviane e Jussara, pela recepção que tive no NPDM e pela amizade que certamente perdurará para além da pós-graduação. Ao querido Brandon, pelo companheirismo e ensinamentos de bancada.

Aos meus companheiros de longa data, Thiago Moura e Thiago Santiago, pelo apoio e amizade cultivados desde a graduação.

Aos meus ex-alunos do IFRN, que tanto contribuíram para minha evolução docente e que hoje seguem trajetórias de sucesso: Isabelly Soares, Izabel Alencar, Kaliane Oliveira, Isabela Alves, Emilayne, Idaiana, Halison, Roseane, Letícia, Francisco Valentim, Amanda Batista, Sara Nogueira e Viviane Rêgo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física da UFC.

À Fundação Edson Queiroz, através do Nubex-Unifor, por toda a infraestrutura fornecida para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento FUNCAP e CNPq pelo suporte financeiro indispensável.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Quando você tem uma ideia e não realizou nada, te consideram um louco. Quando já realizou alguma coisa, a loucura já não é tão grande. Até que acabam dizendo: ‘Ele tem visão’.”

(João Augusto Conrado do Amaral Gurgel)

RESUMO

A fotobiomodulação (FBM) é uma técnica não invasiva para reparação tecidual cujos mecanismos celulares subjacentes ainda carecem de compreensão plena. Investigaram-se as respostas biomecânicas de seis linhagens celulares submetidas à luz vermelha (633 nm) sob diferentes parâmetros de irradiância e tempo (25 e 50 mW/cm² por 10 e 20 minutos). As células foram agrupadas em: (i) fibroblastos L929, queratinócitos HaCaT e osteoblastos OFCOL II; e (ii) mioblastos C2C12, osteossarcoma MG-63 e macrófagos RAW 264.7. Adicionalmente, realizou-se uma análise proteômica integrada do primeiro grupo para caracterizar os efeitos da irradiação desde a epiderme até o tecido ósseo. Utilizando microscopia de força atômica (AFM) e espectrometria de massas, observou-se que a luz vermelha induziu alterações viscoelásticas específicas a cada tipo celular. Os fibroblastos L929 apresentaram aumento da fluidez, redução da rigidez e maior motilidade, enquanto os queratinócitos HaCaT exibiram respostas dependentes da intensidade de irradiação. Em contraste, os osteoblastos OFCOL II mostraram-se relativamente insensíveis ao tratamento. Os macrófagos RAW 264.7 demonstraram enrijecimento acentuado sob maior dose e duração, refletindo sua função imune e o rápido remodelamento do citoesqueleto. Os mioblastos C2C12 apresentaram rigidez moderada, com leve aumento da elasticidade em doses maiores. Já na amostra MG-63, observou-se aumento do módulo elástico e redução da fluidez, sugerindo um fortalecimento da estrutura citoesquelética. A análise proteômica identificou papéis-chave na regulação imune, produção de ATP e resposta ao estresse, associando essas vias à modulação viscoelástica, especialmente nos fibroblastos. O remodelamento da rede de F-actina, com contribuição de microtúbulos e filamentos intermediários, foi identificado como o principal mecanismo das alterações mecânicas. Nossos achados esclarecem como a absorção de luz vermelha influencia a viscoelasticidade celular via rearranjo do citoesqueleto, proporcionando subsídios para a otimização de terapias baseadas em FBM na regeneração tecidual.

Palavras-chave: microscopia de força atômica; proteômica; propriedades viscoelásticas; remodelamento do citoesqueleto; fotobiomodulação celular; biomecânica celular.

ABSTRACT

Photobiomodulation (PBM) is a non-invasive technique for tissue repair whose underlying cellular mechanisms still lack full understanding. Biomechanical responses of six cell lines were investigated under red light (633 nm) with different irradiance and time parameters (25 and 50 mW/cm² for 10 and 20 minutes). The cells were grouped as follows: (i) L929 fibroblasts, HaCaT keratinocytes, and OFCOL II osteoblasts; and (ii) C2C12 myoblasts, MG-63 osteosarcoma, and RAW 264.7 macrophages. Additionally, an integrated proteomic analysis of the first group was conducted to characterize the effects of irradiation from the epidermis to bone tissue. Using atomic force microscopy (AFM) and mass spectrometry, it was observed that red light induced cell-type-specific viscoelastic changes. L929 fibroblasts showed increased fluidity, decreased stiffness, and enhanced motility, while HaCaT keratinocytes exhibited irradiance-dependent responses. In contrast, OFCOL II osteoblasts were relatively insensitive to the treatment. RAW 264.7 macrophages demonstrated pronounced stiffening under higher doses and durations, reflecting their immune function and rapid cytoskeletal remodeling. C2C12 myoblasts showed moderate stiffness, with a slight increase in elasticity at higher doses. In the MG-63 sample, an increase in elastic modulus and a reduction in fluidity were observed, suggesting a reinforcement of the cytoskeletal structure. Proteomic analysis identified key roles in immune regulation, ATP production, and stress response, linking these pathways to viscoelastic modulation, especially in fibroblasts. Remodeling of the F-actin network, with contributions from microtubules and intermediate filaments, was identified as the primary mechanism for the mechanical changes. Our findings clarify how red light absorption influences cellular viscoelasticity via cytoskeletal rearrangement, providing insights for optimizing PBM-based therapies in tissue regeneration.

Keywords: atomic force microscopy; proteomics; viscoelastic properties; cytoskeletal remodeling; cellular photobiomodulation; cellular biomechanics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamentos de estimulação para fotobiomodulação.....	19
Figura 2 – Mecanismos de ação da fotobiomodulação.....	26
Figura 3 – Fotodissociação do NO ligado inibindo a citocromo c oxidase.....	27
Figura 4 – Modelo tridimensional da curva de Arndt-Schulz.	28
Figura 5 – Penetração tecidual das faixas de comprimentos de onda.	29
Figura 6 – Migração de células L929 submetidas às luzes vermelha, azul e verde.	30
Figura 7 – Técnicas experimentais para resposta mecânica de redes de biopolímeros.	34
Figura 8 – Microscopia óptica do <i>cantilever</i> de AFM em células saudáveis.	35
Figura 9 – Fluorescência de cinco linhagens celulares de próstata.	36
Figura 10 – Micrografias de <i>beads</i> de sílica em pontas de AFM.	37
Figura 11 – Organização estrutural da pele e suas interações celulares.	39
Figura 12 – Principais características de uma célula eucariótica sob diferentes técnicas.	40
Figura 13 – Arquitetura do citoesqueleto: filamentos intermediários, córtex de actina, microtúbulos.	42
Figura 14 – Diagrama do citoesqueleto durante a divisão celular de um fibroblasto.	43
Figura 15 – Principais componentes estruturais do citoesqueleto em uma célula eucariótica.	45
Figura 16 – Parâmetros da reologia de redes de biopolímeros: G' e G".	47
Figura 17 – Forças geradas no córtex de actina durante a migração celular.	49
Figura 18 – Deformação de um corpo sólido sob a aplicação de uma tensão τ	51
Figura 19 – Forças envolvidas no funcionamento do AFM.	54
Figura 20 – Indentação realizada pelo AFM e interpretação da curva de força.	55
Figura 21 – Perfis de curvas de força obtidos por microscopia de força atômica.	56
Figura 22 – Diagrama <i>stress versus strain</i> . A inclinação fornece o módulo de Young.	57
Figura 23 – Fibroblastos L929 no AFM.	61
Figura 24 – Osteoblastos OFCOL II no AFM.	62
Figura 25 – Queratinócitos HaCaT no AFM.	63
Figura 26 – Osteoblastos MG-63 no AFM.	64
Figura 27 – Mioblastos C2C12 no AFM.	65
Figura 28 – Macrófagos RAW 264.7 no AFM.	66
Figura 29 – Esquema da aplicação de luz na placa de cultura.....	69
Figura 30 – Imagem da captura dos arranhões (scratches). No detalhe, células L929.	71
Figura 31 – Espectrômetro de massas LC-MS fabricado pela Waters Corporation.....	73

Figura 32 – Perfil viscoelástico de HaCaT, L929 e OFCOL II medido por AFM.....	80
Figura 33 – Perfil viscoelástico de C2C12, RAW 264.7 e MG-63 medido por AFM.	82
Figura 34 – Perfil viscoelástico comparativo entre OFCOL II e MG-63 medido por AFM.....	84
Figura 35 – Perfil viscoelástico comparativo entre L929 e RAW 264.7 medido por AFM.....	86
Figura 36 – Viabilidade e distribuição média da intensidade de pixel das células HaCaT, L929 e OFCOL II.....	87
Figura 37 – Viabilidade celular de C2C12, MG-63 e RAW 264.7.....	89
Figura 38 – Fechamento de ferida in vitro em células C2C12, RAW 264.7 e MG-63.	90
Figura 39 – Intensidade de F-actina e remodelamento do citoesqueleto.....	91
Figura 40 – Microscopia confocal das células HaCaT, L929 e OFCOL II.....	93
Figura 41 – Análise proteômica das células HaCaT, OFCOL II e L929.....	95
Figura 42 – Correlações de Pearson para HaCaT, L929 e OFCOL II.....	100
Figura 43 – Análise de enriquecimento dos genes das células HaCaT.	126
Figura 44 – Análise de enriquecimento dos genes das células L929.	127
Figura 45 - Análise de enriquecimento dos genes das células OFCOL II.	127
Figura 46 – Imagens dos experimentos de cicatrização de feridas (<i>wound-healing</i>).....	128
Figura 47 – Elasticidade celular e o expoente de fluidez das células HaCaT, L929 e OFCOL II.....	132
Figura 48 – Módulos de elasticidade e expoentes de fluidez.....	133
Figura 49 – Ilustração do Cálculo de Correlação entre a Abundância Proteica e as Propriedades Mecânicas.....	134

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estimativas das amplitudes de relaxação da força em curvas de força com permanência (DFC) em função dos expoentes de fluidez	125
Quadro 2 – Composição proteica dos grupos analisados na correlação da Figura 42.....	135
Quadro 3 – Correlação entre dados viscoelásticos e proteínas individuais em células HaCaT.....	136
Quadro 4 – Correlação dos dados viscoelásticos com as proteínas individuais das células L929.....	138
Quadro 5 – Correlação dos dados viscoelásticos com as proteínas individuais das células OFCOL II.	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Álcool desidrogenase
AFM	Microscopia de Força Atômica
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCA	Ensaio de ácido bicinconínico
BSA	Albumina de Soro Bovino
C2C12	Linhagem de mioblastos murinos
CCO	Citocromo c oxidase
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTRL	Grupo Controle
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DFC	Curva de Força com Tempo de Permanência (<i>Dwell Force Curve</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
F-Actina	Actina filamentosa
FBM	Fotobiomodulação
FDR	Taxa de Descoberta Falsa (False Discovery Rate)
GO	Ontologia Gênica (Gene Ontology)
HaCaT	Linhagem de queratinócitos humanos
L929	Linhagem de fibroblastos murinos
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em série
LED	Diodo Emissor de Luz
LLLT	Terapia por Laser de Baixa Intensidade

MEC	Matriz Extracelular
MG-63	Linhagem de osteossarcoma humano
MMC	Mitomicina C
MS	Espectrometria de Massas
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
NIR	Infravermelho Próximo
NO	Óxido Nítrico
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
NUBEX	Núcleo de Biologia Experimental
OFCOL II	Linhagem de osteoblastos murinos
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos murinos
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ROUT	Método de regressão robusta e remoção de outliers
SD	Desvio Padrão
SEM	Erro Padrão da Média
SFB	Soro Fetal Bovino
SPL	Lei de Potência Única (Single Power-Law)
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
CRP	Proteína C-reativa (<i>C-Reactive Protein</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
μ_a	Coefficiente de absorção óptica
μ_e	Coefficiente de espalhamento óptico
E	Módulo elástico/Módulo de Young
ν	Coefficiente de Poisson
δ	Profundidade de indentação
k_c	Constante de mola (rigidez) do cantilever
σ	Tensão mecânica
τ	Tensão de cisalhamento
γ	Deformação
G^*	Módulo complexo
G'	Módulo de armazenamento (elástico)
G''	Módulo de perda (viscoso)
β	Expoente de fluidez
$\dot{\gamma}$	Taxa de deformação
η	Viscosidade
De	Número de Deborah
f_z	Frequência vertical nas medições AFM
F_{max}	Força máxima aplicada na indentação
t_l	Tempo de carregamento (<i>loading time</i>)
t_d	Tempo de permanência (<i>dwell time</i>)
t_{rel}	Tempo de relaxamento
t_{def}	Tempo de deformação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	A fotobiomodulação.....	23
2.2	Interação entre luz e tecido.....	30
2.3	Microrreologia de células	33
2.4	Digressão sobre biomecânica celular: princípios e modelos	38
2.4.1	<i>Citoesqueleto</i>	41
2.4.2	<i>Matriz extracelular</i>	43
2.4.3	<i>Junções celulares</i>	44
2.5	Biofísica e biomecânica do citoesqueleto	44
2.6	Migração celular.....	48
2.7	Breve introdução à reologia	50
2.8	Microscopia de força atômica	53
2.9	Linhagens celulares	60
3	MATERIAIS E MÉTODOS	67
3.1	Cultura de células.....	67
3.2	Irradiação.....	68
3.3	Viabilidade celular e migração celular (<i>wound-healing assay</i>)	69
3.4	Microscopia confocal (fluorescência)	71
3.5	Proteômica e bioinformática.....	72
3.6	Microscopia de força atômica	74
3.7	Análise estatística	75
4	RESULTADOS	77
4.1	Parte I – Resultados biomecânicos e de bancada.....	77
4.1.1	<i>Viscoelasticidade</i>	78

4.1.2	<i>Viabilidade e motilidade celular</i>	86
4.2	Parte II – Microscopia confocal e análise proteômica	91
4.2.1	<i>Análise da microscopia confocal</i>	91
4.2.2	<i>Análise proteômica</i>	94
4.3	Correlação entre viscoelasticidade e proteômica.....	97
4.4	Integração analítica e correlações dos perfis celulares	98
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	102
6	CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	106
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICE A – SENSIBILIDADE DAS DFCs	124
	APÊNDICE B - PROTEÔMICA: ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL .	126
	APÊNDICE C – ESFEROIDES: RESULTADOS PRELIMINARES	142
	APÊNDICE D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	145

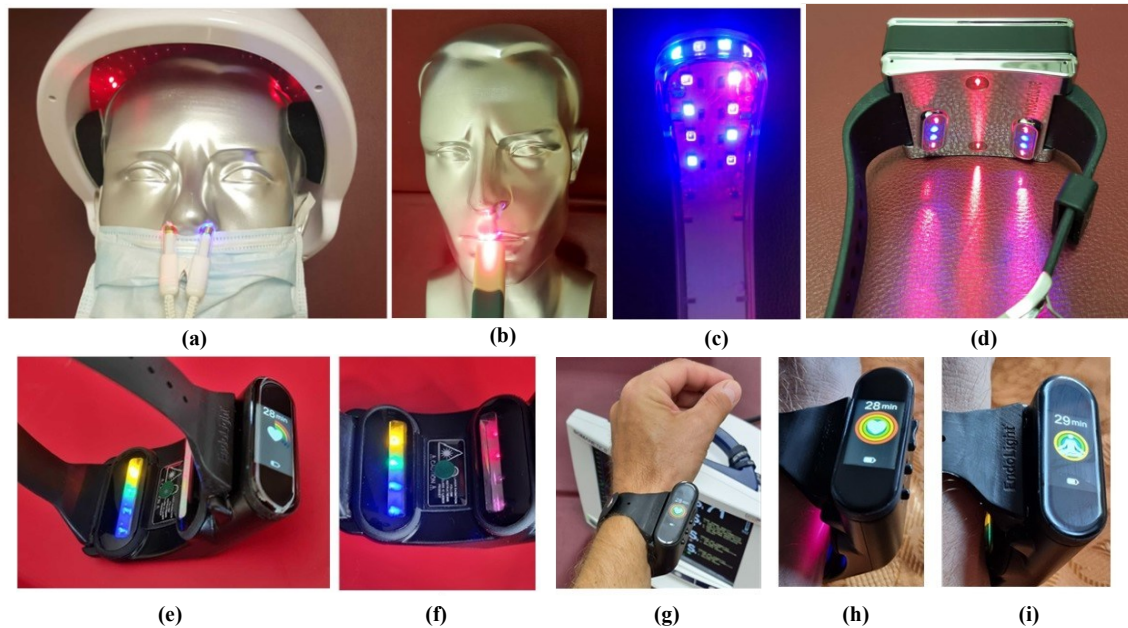
1 INTRODUÇÃO

A fotobiomodulação (FBM) é um efeito que utiliza fonte de luz não ionizante para estimular respostas biológicas em tecidos. Por fazer uso de luz de baixa intensidade, não ocorrem danos térmicos à região tratada, não há efeitos colaterais importantes, tendo como objetivo a promoção da regeneração celular, alívio da dor e da inflamação (Khan *et al.*, 2021).

A FBM, também conhecida como terapia de luz de baixa intensidade (LLLT, do inglês “Low-Level Laser Therapy”), tornou-se altamente popular tanto no ambiente clínico quanto para uso doméstico, através de dispositivos portáteis que usam diodos emissores de luz (LEDs) como substituto do *laser* (Glass, Graeme E, 2021). Alguns pesquisadores defendem a primeira terminologia (FBM) por dois motivos: na fotobiomodulação a utilização da luz ocorre para além do *laser*, sem diminuição dos efeitos terapêuticos; além disso, esses efeitos podem decorrer, em algumas circunstâncias, de resultados de inibição e de estimulação (Anders; Lanzafame; Arany, 2015).

Com exceção dos vasodilatadores de microcirculação, não existem remédios que complementem o processo de cicatrização de lesões. Por isso, diversas empresas utilizam equipamentos que têm como princípio a FBM (Figura 1) para diferentes aplicações, dentre elas para fins de analgesia.

Figura 1 – Equipamentos de estimulação para fotobiomodulação.



(a) Estimulação transcraniana por LED; (a-b) estímulos luminosos por meio de um adaptador nasal – com irradiação de luz vermelha, infravermelha, azul ou ultravioleta – e de um adaptador sublingual; (c) aplicação local utilizando um adaptador para a garganta; (d) tratamento sistêmico por irradiação sanguínea na região das artérias radial e ulnar, utilizando o chamado "relógio a laser"; (e-f) protótipo de um relógio a laser recentemente desenvolvido (2021), com diferentes comprimentos de onda, além de fornecer uma dose controlada de laser; (g-i) relógio a laser em uso, que irradia no pulso luz infravermelha e luz vermelha. Fonte: extraído de (a-d) (Litscher; Ailioaie, 2021); (e-i) (Litscher, 2021).

Esses aparelhos se diferenciam principalmente pela fonte de luz, quantidade de LEDs (alguns utilizam laser), geometria do console e flexibilidade da ponteira aplicadora (capacidade de adaptação ao corpo). Os equipamentos de empresas que exploram a área de fotobiomodulação, em geral, trabalham principalmente com a recuperação de tecidos lesionados sob diversas condições: queimadura, corte por objeto perfurante, cirurgia etc.

Fazer uma digressão sobre a FBM é um desafio instigante, pois é preciso atravessar duas linhas do tempo: a história da terapia de luz e o desenvolvimento do laser sendo parte transversal importante. Por ser mais antiga, vamos brevemente discorrer sobre a fotomedicina e, em seguida, sobre a FBM.

O uso terapêutico da luz (fototerapia) remonta à antiguidade, em cerca de 1400 a.C., quando a luz solar (helioterapia) era utilizada para tratar Hindus com vitiligo (Fitzpatrick; Pathak, 1959), mas a eficácia sempre foi relatada de forma imprecisa.

Em 1903, “em reconhecimento à sua contribuição para o tratamento de doenças, especialmente lúpus vulgar [uma doença desfigurante comum na época], com radiação de luz [ultravioleta] concentrada, por meio da qual ele abriu um novo caminho para a ciência médica”

(Nobel Prize, 2024, tradução nossa)¹, Niels Ryberg Finsen foi laureado com o Prêmio Nobel de Medicina. Por seus trabalhos pioneiros, Niels Finsen muitas vezes é citado como o precursor da FBM (Jarrett; Scragg, 2017; Encyclopedia Britannica, 2024).

Hess e Weinstock mostraram em 1925 que alimentos irradiados sob luz ultravioleta (UV) preveniam o raquitismo em ratos (Hess; Weinstock, 1924). A irradiação UV foi aplicada em determinados alimentos com o objetivo de verificar propriedades antirraquíticas. Em seguida, ratos com raquitismo foram alimentados, verificando-se posteriormente que ratos jovens não tiveram, em regra, problema com raquitismo e tiveram o crescimento notadamente melhorado. Tal estudo foi tão importante, que permitiu a descoberta da vitamina D, que teve apenas em 2006 o seu mecanismo biológico descoberto, em associação à exposição de luz UV, para tratar a tuberculose. Sabe-se que a ativação de macrófagos humanos através de receptores regula positivamente o gene do receptor de vitamina D, o que induz o peptídeo antimicrobiano catelicidina.

Pelos resultados promissores em diferentes aplicações da terapia de luz, em 1932 a Associação Médica Americana publicou uma revisão a respeito da utilização da terapia UV em dermatologia, considerando 34 doenças de pele para as quais a radiação UV poderia ser útil (Mackee, 1932).

Os efeitos positivos em organismos vivos da exposição à luz passaram a ter maior observância quando Endre Mester utilizou laser de rubi (694 nm) sob demanda para combater tumores malignos implantados na pele de ratos. Seus experimentos com laser iniciaram em 1965 com o objetivo de reproduzir os trabalhos de McGuff (Mgguff Paul E.; Deterling Ralph A.; Gottlieb Leonard S., 1965). Os resultados não foram os esperados. As células tumorais não foram destruídas, contudo as lesões causadas pela implantação das células de câncer cicatrizaram mais rapidamente (Mester *et al.*, 1968a) e o crescimento de pelugem na região ferida foi mais acelerado em relação ao grupo controle, que não foi exposto à luz (Mester; Szende; Gärtner, 1968).

Posteriormente, ainda sobre os resultados, Mester descobriu que o laser de rubi não fora foto-ablativo contra as células tumorais alvo, o que o motivou a utilizar luz vermelha. Com isso, ele mostrou que essa luz efetivamente estimulava a aceleração de cicatrização de feridas da pele (Mester *et al.*, 1971). Em 1968 publicou importante estudo sobre a resposta bifásica à dose (também conhecida como efeito Arndt-Schulz) (Mester *et al.*, 1968b), mantendo-se ativo

¹ "in recognition of his contribution to the treatment of diseases, especially lupus vulgaris, with concentrated light radiation, whereby he has opened a new avenue for medical science".

até 1985, com importantes trabalhos sobre cicatrização de feridas (Kovács; Mester; Görög, 1974; Mester *et al.*, 1971, 1975, 1976, 1978). Dr. Endre Mester foi médico cirurgião e diretor do segundo Departamento de Cirurgia da Universidade Semmelweis em Budapeste e Presidente da Sociedade de Cirurgiões Húngaros. Por seus importantes trabalhos na área e mais de 100 artigos publicados (Mester; Mester, 2017), Endre Mester é considerado o “pai da fotobiomodulação” (Gáspár, 2009).

Apesar dos resultados significativos, até a década de 1960 a fotomedicina tinha dois grandes entraves: a falta de equipamentos de exposição controlada e a inconsistência dos mecanismos de ação propostos. Com o desenvolvimento do laser, efeitos de bioestimulação foram estudados por um período de 20 anos (Mester; Mester; Mester, 1985), abrindo um novo marco sobre os efeitos da luz laser de baixa intensidade.

Tratamentos de saúde, em geral, possuem alto custo, além da crescente demanda global com elevadas provisões financeiras das redes públicas e privadas (Chang *et al.*, 2019). Dentre as causas, podemos citar o envelhecimento natural da população, a utilização de tecnologias cada vez mais sofisticadas, a aquisição e manutenção de equipamentos e gasto com pessoal altamente especializado (Reis, 2021). Relatório mais recente da Organização das Nações Unidas (ONU) projeta que em 2100 o total de idosos no Brasil será próximo de 75 milhões (ONU, 2020).

A Variação dos Custos Médico-Hospitalares (VCMH)² no Brasil é 2,8 vezes a inflação geral (IPCA), sendo uma tendência de ordem global, como mostram copiosos estudos (Aon, 2018; Mercer Marsh Benefits, 2019; Willis Towers Watson, 2020). Assim, torna-se importante buscar alternativas em termos de tratamentos médicos. Intervenções terapêuticas são menos invasivas e podem oferecer custos financeiros e logísticos menores no âmbito público e privado.

Nesse contexto, a FBM apresenta-se como uma opção razoável em termos financeiros, além de segura, indolor e com importante eficiência (Hamblin; Pires de Sousa; Agrawal, 2016). Os materiais usados na aplicação, como a fonte de luz, possuem alta durabilidade e uma gama de aplicações.

Além disso, diferentes comprimentos de onda penetram em regiões-alvo distintas do corpo, desde a superfície cutânea até tecidos da cabeça (Salehpour *et al.*, 2019). A ampla variedade de aplicações, aliada ao caráter não invasivo do método, faz da terapia de

² Índice também conhecido como inflação médica, e utilizado como parâmetro para reajustes dos planos de saúde. É medido pelo Instituto de Estudos de Saúde Suplementar (IESS).

fotobiomodulação uma alternativa para diversas enfermidades, desde a cicatrização de lesões (Wu *et al.*, 2015) e o tratamento da dor crônica (Chow *et al.*, 2009), passando por intervenções neurológicas por meio de FBM transcraniana (Caldieraro; Cassano, 2019; Tedford *et al.*, 2015), até aplicações em oncologia (Baxter *et al.*, 2017; De Faria *et al.*, 2021; Toruner; Kayhan; Ezgu, 2021; Xia *et al.*, 2021).

A multiplicidade de pesquisas destaca o potencial dos efeitos bioestimulativos de determinados comprimentos de onda sobre as células. Mas os mecanismos bioquímicos ainda carecem de estudos mais específicos (Hamblin, 2018), sendo necessário considerar efeitos mecanicistas no comportamento celular como resposta à luz em diferentes aplicações (Wittmann; Dema; Van Haren, 2020).

Os processos biológicos responsivos são o resultado da dinâmica celular, que, por sua vez, está associada à reorganização morfológica contínua da estrutura interna. Essa reorganização se dá a partir das estruturas filamentosas do citoesqueleto. Logo, forças de tração e compressão do citoesqueleto dão causa a esses movimentos, resultando em funções celulares únicas, produzindo efeitos diretos no funcionamento de organismos vivos e em patologias (Bodor *et al.*, 2020; Elting; Suresh; Dumont, 2018). De forma específica, as atividades proteicas intracelulares estão relacionadas à perturbação bioquímica de um dado estado estacionário celular, sendo uma área de pesquisa importante da biologia celular (Wittmann; Dema; Van Haren, 2020).

Sobre a organização da tese: no primeiro capítulo apresentamos o contexto, a justificativa e os objetivos da pesquisa; no segundo desenvolvemos o referencial teórico que fundamenta os experimentos; no terceiro descrevemos os materiais e métodos empregados; no quarto apresentamos os resultados obtidos, divididos em análises biomecânicas, de bancada e proteômicas; no quinto é feita uma discussão integrada dos resultados. Por fim, o sexto capítulo reúne as conclusões gerais e perspectivas do trabalho. Cabe registrar que parte dos experimentos e resultados documentados nos Capítulos 3 e 4 deu origem a uma publicação científica de nossa autoria na revista *Small* (DOI: 10.1002/sml.202410062). Por outro lado, os resultados referentes às linhagens C2C12, MG-63 e RAW 264.7, bem como as análises comparativas entre todas as seis linhagens, constituem contribuição inédita, não contemplada naquela publicação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A fotobiomodulação

A FBM vem sendo aplicada em diferentes contextos clínicos, sobretudo para dor crônica (Chow *et al.*, 2009; De Sousa *et al.*, 2018) e dano ao tecido da pele (Kuffler, 2016). Além disso, a FBM teve sua aplicação estendida para otimização no desempenho de atletas (Litscher; Ailioaie, 2021). Várias doenças, como a depressão (Askalsky; Iosifescu, 2019; Freitas; Hamblin, 2016), a doença de Alzheimer (Valverde; Mitrofanis, 2022) e a reabilitação de Acidente Vascular Cerebral (AVC) (Hamblin, 2018) são alvos de pesquisa quanto aos benefícios do uso da luz como tratamento complementar. Estudos recentes também mostraram efeitos positivos da FBM como tratamento auxiliar à COVID-19, sugerindo diminuição significativa de edema pulmonar, influxo de neutrófilos e a geração de citocinas pró-inflamatórias, interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), molécula de adesão intracelular (ICAM), espécies reativas de oxigênio (ROS), isoforma de óxido-nítrico sintase (iNOS) e proteína inflamatória dos macrófagos 2 (MIP-2) (Nejatifard *et al.*, 2021). Outros autores consideram a FBM promissora pelo potencial de equilíbrio à resposta imune através da tempestade de citocinas, mecanismo característico decorrente da COVID-19 (Soheilifar; Fathi; Naghdi, 2021). Outro trabalho que combinou FBM com aplicação de campo magnético estático em trinta pacientes graves (intubados) não foi conclusivo quanto ao tempo de permanência na unidade de terapia intensiva (UTI) (De Marchi *et al.*, 2021). No entanto, os pesquisadores verificaram redução da atrofia do diafragma, melhora dos parâmetros ventilatórios e da contagem de linfócitos, além da diminuição dos níveis de proteína C-reativa (CRP; do inglês *C-reactive protein*) e de hemoglobina. Evidências recentes também sugerem influência favorável da FBM no microbioma humano (Liebert *et al.*, 2019).

A faixa de comprimentos de onda entre 600 e 1100 nm forma a janela óptica útil para a fotobiomodulação e favorece a penetração tecidual (Chung *et al.*, 2012). Comprimentos na faixa vermelha (630-670 nm) atuam em alvos mais superficiais, enquanto o infravermelho próximo (780-900/1000 nm) alcança tecidos mais profundos (Chung *et al.*, 2012). A escolha do comprimento de onda, aliada à dosimetria apropriada, determina a distribuição de energia no tecido e, conseqüentemente, a magnitude das respostas celulares locais e sistêmicas. (Hamblin; Demidova, 2006). A base fisiológica para as observações da FBM pode ser explicada em termos da respiração mitocondrial, da expressão gênica, da sinalização celular, da síntese

de fatores de crescimento e modulação inflamatória (Karu, 1989, 1999; Karu; Pyatibrat; Afanasyeva, 2005).

A mitocôndria é uma organela que funciona como uma usina de geração de energia através da síntese do trifosfato de adenosina (ATP), que resulta em um processo eficiente de fosforilação oxidativa de nutrientes através da respiração aeróbica. Seja humano ou bactéria, o ATP atende às demandas energéticas da célula, através de 36 moléculas, em oposição a duas moléculas de respiração anaeróbica. O corpo humano adulto de 70 kg possui da ordem de 10^{14} de células e para cada uma delas há 10^9 moléculas de ATP em renovação (*turnover*) (Alberts *et al.*, 2017; Sender; Fuchs; Milo, 2016).

Os nutrientes que ingerimos contêm energia química armazenada nas suas ligações. No entanto, esta energia nem sempre se encontra numa forma utilizável diretamente pelas reações celulares. A oxidação controlada desses nutrientes resulta na liberação de energia, que é convertida e armazenada em transportadores (NADH, FADH₂) e em ATP – moléculas com alto potencial de transferência de energia (alta energia livre de Gibbs). O ATP atua como intermediário energético, fornecendo a energia livre necessária para impulsionar reações endergônicas celulares e, assim, "preencher" o diferencial energético entre o que os substratos oferecem e o que as reações exigem.

A fosforilação oxidativa é o principal mecanismo responsável por esse tipo de acúmulo de energia. A produção de energia ocorre por meio de reações de oxidação (perda de elétrons) e redução (ganho de elétrons), que são impulsionadas pela ação de coenzimas e transportadores. Este processo metabólico resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxidos e superóxidos, desempenhando papel importante na sinalização e homeostase. Em caso de excesso desses radicais livres, a consequência é o estresse oxidativo, afetando a respiração celular quando a enzima citocromo c oxidase absorve óxido nítrico em substituição ao oxigênio. A falta do oxigênio reduz a produção de energia, podendo levar a morte da célula (Alberts *et al.*, 2017). O citocromo c oxidase, que está na membrana interna das mitocôndrias, é a última enzima da cadeia respiratória (complexo IV). Ela permite a mudança de elétrons do citocromo c reduzido para o oxigênio, o que resulta na formação de água. Essa etapa é fundamental para manter o gradiente de prótons que ajuda a criar ATP pela ATP sintase (Alberts *et al.*, 2017). A enzima possui uma estrutura multifuncional, composta por várias subunidades e centros redox, como grupos heme e íons de cobre, que são elementos fundamentais para a sua atividade enzimática.

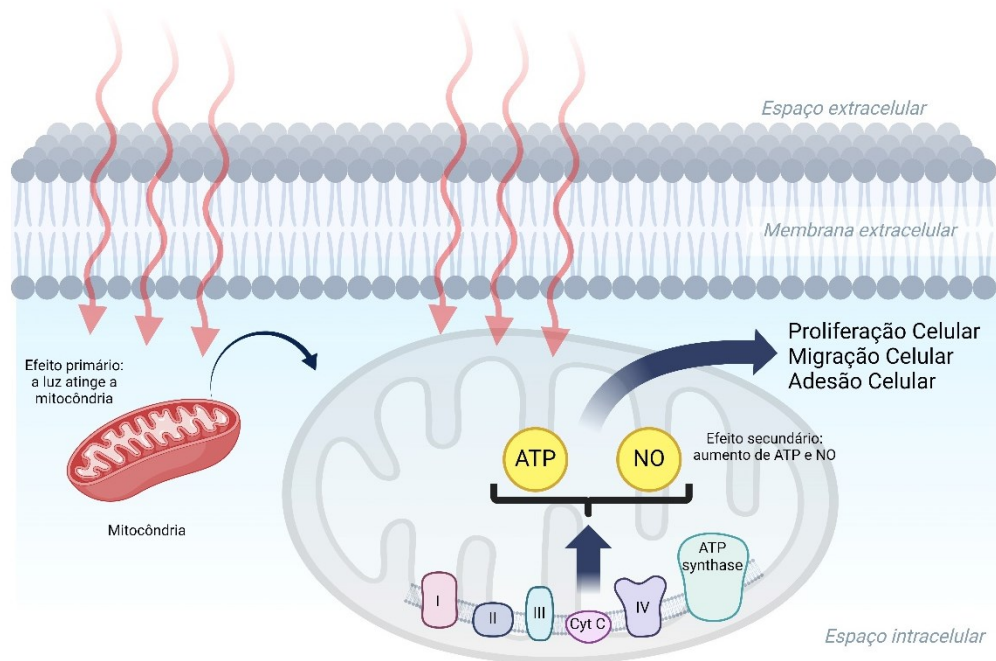
Determinados tipos de interferência na produção de ATP podem ser fatais para o organismo na ordem de minutos. Um exemplo é o caso do cianeto se ligando à CCO, o que provoca bloqueio na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e consequentemente interrupção na produção de ATP. Para se ter ideia da importância de otimização desse processo metabólico celular, o corpo humano possui cerca de 50 g de ATP. Portanto, a otimização desses processos deve ser realizada por meio da redução do estresse oxidativo.

Certas proteínas mitocondriais contêm cromóforos sensíveis à luz (Hellingwerf; Hendriks; Gensch, 2003; Lukacs; Tonge; Meech, 2022; Palczewski, 2006; Sancar, 2003). As proteínas encontradas na cadeia respiratória mitocondrial apresentam sensibilidade a comprimentos de onda mais longos, como o vermelho e o infravermelho próximo. A combinação de localização estratégica dessas proteínas e na sua sensibilidade a determinados comprimentos de onda e frequência, produzem efeitos biológicos.

A base biológica dos efeitos da FBM ocorre através da absorção de luz vermelha e infravermelho próximo (do inglês, “NIR”) por cromóforos mitocondriais, em particular pelo citocromo c-oxidase (ver Figura 2), que está contido na cadeia respiratória mitocondrial (Greco *et al.*, 1989; Karu; Kolyakov, 2005; Karu; Pyatibrat; Kalendo, 2004). Essas interações levam a reações fotoquímicas e fotofísicas, tais como a fotodissociação de NO e as mudanças conformacionais em centros heme/Cu. Estas, por sua vez, modulam a atividade enzimática e as vias redox. Como resultado, ocorre uma cascata de eventos nas mitocôndrias, conduzindo a vários processos bioestimulativos (Oron, 2011).

A fotodissociação do NO ligado é um exemplo de reação fotoquímica – um processo no qual a energia do fóton provoca ruptura de uma ligação e liberação de NO, modificando a atividade da citocromo c-oxidase (Lane, 2006) e podendo levar ao aumento da atividade enzimática (Wong-Riley *et al.*, 2005), do transporte de elétrons (Pastore *et al.*, 1994), da respiração mitocondrial e da produção de ATP (Harris, 1991; Karu; Pyatibrat; Kalendo, 1995; Karu, 1999). Ao mudar o estado redox celular, a FBM pode induzir a ativação de inúmeras vias de sinalização intracelular, alterando a afinidade de fatores de transcrição relacionados à proliferação, sobrevivência, reparo tecidual e regeneração celular (Greco *et al.*, 1989; Gupta *et al.*, 2013; Karu; Kolyakov, 2005; Liu *et al.*, 2005; Peplow *et al.*, 2011).

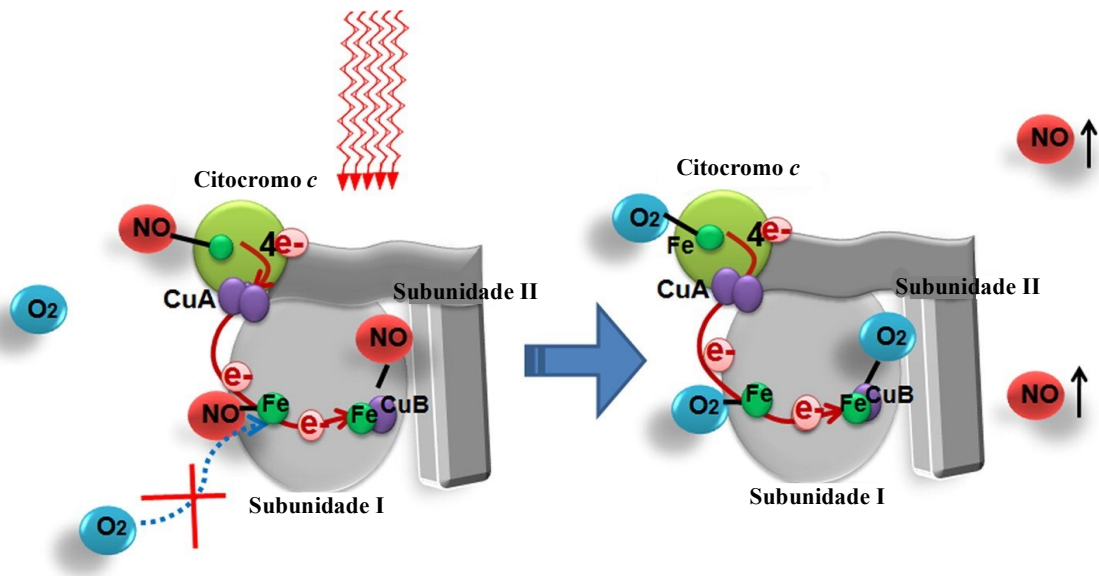
Figura 2 – Mecanismos de ação da fotobiomodulação.



A ilustração mostra a absorção dos fótons de luz pela mitocôndria; mais especificamente, ocorre pelo citocromo c oxidase ou por fotorreceptores da membrana plasmática das células. Por consequência, a energia luminosa transforma-se em energia metabólica, como aumento do ATP e óxido nítrico NO estimulando a proliferação, migração e adesão celular. Fonte: Elaborada pelo autor no BioRender.

Há pesquisas que relatam a produção e/ou liberação de óxido nítrico (NO) nas células após o processo de FBM em experimentos *in vitro*. Para valores baixos de irradiância de luz vermelha/NIR, é possível que haja baixa produção da quantidade de NO das mitocôndrias por dissociação de estoques intracelulares (Shiva; Gladwin, 2009) ou por dissociação de NO da enzima mitocondrial citocromo c oxidase (Lane, 2006), conforme mostra a Figura 3. A segunda possibilidade para a produção de NO ocorre pelo aumento em função da luz na atividade das nitrito redutases do citocromo c oxidase (Lane, 2006). No terceiro mecanismo a luz pode causar aumento da atividade de uma isoforma de óxido nítrico sintase (Poyton; Ball, 2011), talvez pelo aumento dos níveis de cálcio intracelular (Huang *et al.*, 2011). Esta baixa concentração de NO produzida pela iluminação é considerada benéfica através de vias de sinalização celular (Ball; Castello; Poyton, 2011). A explicação molecular dada por meio de uma digressão da literatura, permite inferir que há muito o que investigar em níveis moleculares.

Figura 3 – Fotodissociação do NO ligado inibindo a citocromo *c* oxidase.



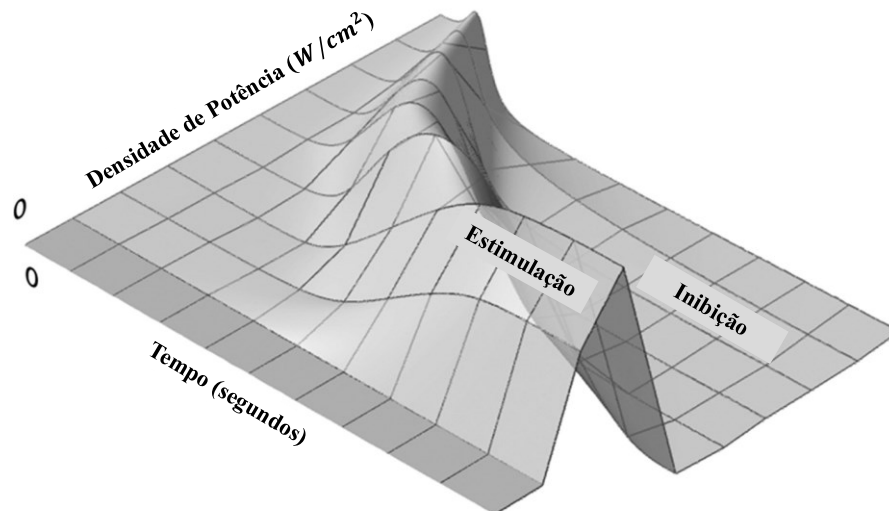
A fotodissociação do NO é uma teoria sugerida pela literatura científica. Esta reação fotoquímica envolve a liberação de NO, que se encontrava ligado e inibindo a CCO, promovida pela energia luminosa. A reoxigenação do sítio ativo da enzima provoca a restauração da sua atividade, podendo aumentar a respiração mitocondrial e alterar os níveis locais de óxido nítrico. Fonte: Adaptado de (Huang *et al.*, 2011).

Para que a FBM tenha efeito bioestimulativo, a literatura científica considera o conceito de janela-terapêutica, o qual está relacionado à Lei de Arndt-Schutz, que estabelece relação do efeito biológico com a quantidade de estímulo aplicado (Huang *et al.*, 2009). A Lei Arndt-Schutz afirma que há apenas uma estreita janela de oportunidade onde é possível ativar uma resposta celular usando conjuntos precisos de parâmetros, ou seja, o tempo de irradiância e a dose. A Figura 4 é uma representação tridimensional do modelo Arndt-Schutz e ilustra o "ponto ideal" de dose no tecido alvo. Portanto, uma densidade de potência insuficiente ou um tempo muito curto não terão efeito sobre a patologia. No entanto, uma densidade de potência e/ou tempo excessivos podem ter efeitos inibitórios, o que pode significar a existência de um equilíbrio ideal entre densidade de potência e tempo, de modo que o efeito benéfico seja maximizado.

Para o tratamento de tecidos superficiais, a faixa de 390 nm a 600 nm é mais utilizada, enquanto bandas maiores, entre 600 e 1.100 nm, são usadas para tecidos mais profundos (Avci *et al.*, 2013), conforme mostra a Figura 5. A faixa de 700 nm a 750 nm tem atividade bioquímica limitada e por isso não é usada com frequência (Chung *et al.*, 2012). Várias fontes de luz usadas na FBM incluem, além do LED, lasers de gás inerte e de laser semiconductor, como hélio neon (HeNe; 633 nm), rubi (694 nm), argônio (488 e 514 nm),

criptônio (521, 530, 568, 647 nm), arseneto de gálio (GaAs; > 760 nm, comum em 904 nm) e arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs; 612-870 nm) (Posten *et al.*, 2005).

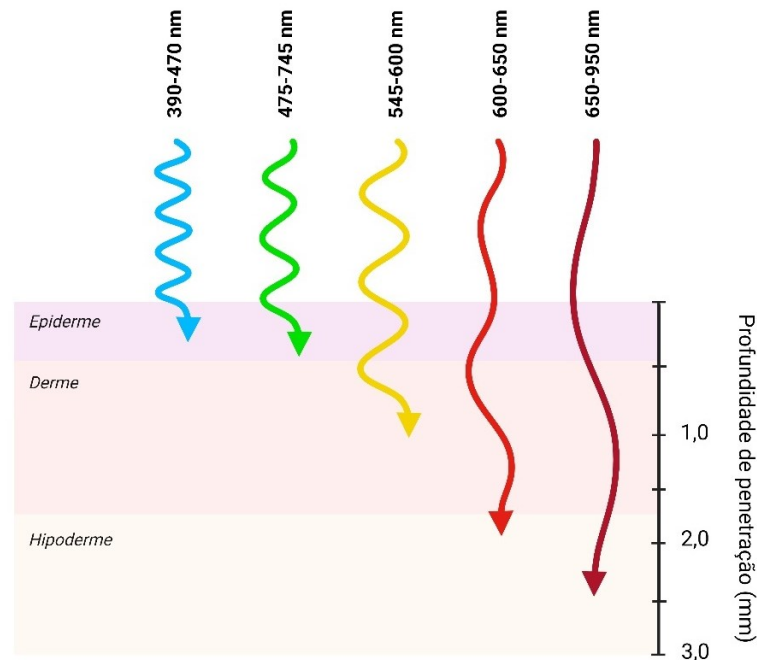
Figura 4 – Modelo tridimensional da curva de Arndt-Schulz.



O modelo tridimensional da curva de Arndt-Schulz ilustra como a irradiância ou o tempo de iluminação (fluência) podem ter efeitos bifásicos de resposta à dose em FBM. Fonte: Adaptado de (Huang *et al.*, 2011).

É possível que os valores absolutos de irradiação sejam diferentes em diferentes comprimentos de onda, tipos de tecido, estados redox e por diferentes parâmetros de pulso (Huang *et al.*, 2011). Na prática, o efeito da FBM depende dos parâmetros aplicados. Este é, inclusive, um ponto que precisa de estudos mais aprofundados (Glass, Graeme E., 2021).

Figura 5 – Penetração tecidual das faixas de comprimentos de onda.



A penetração tecidual deve ser interpretada em conjunto com o espectro de ação dos cromóforos alvo para prever eficácia biológica. Fonte: Elaborada pelo autor.

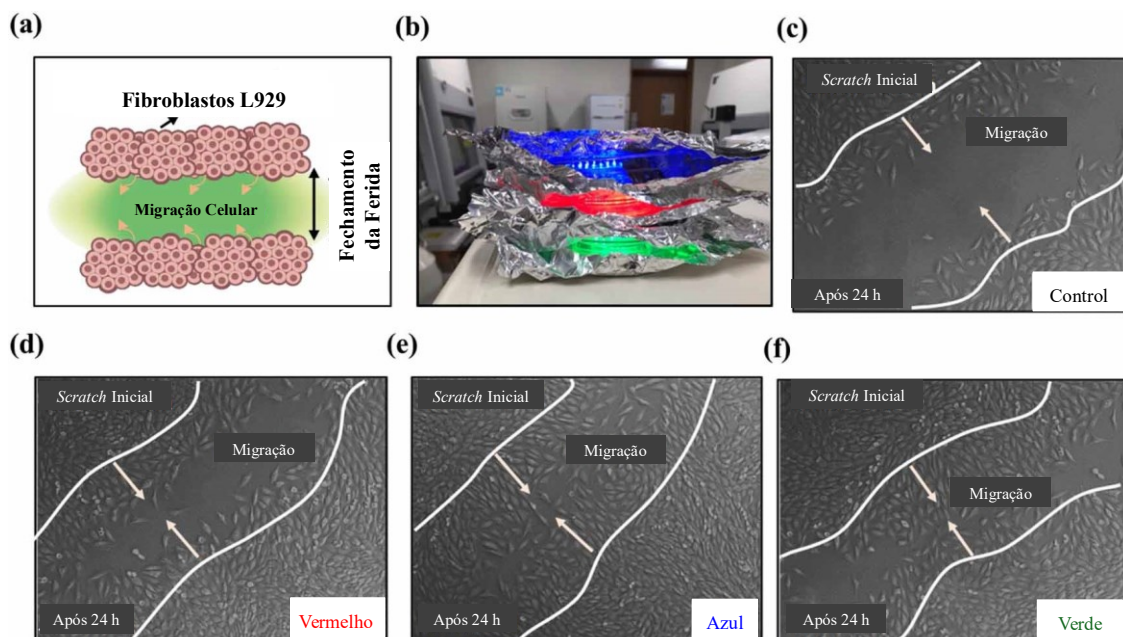
Existe uma limitação experimental com luz nos animais de laboratório, pois são geneticamente similares. Os parâmetros de aplicação da luz – como irradiância e tempo de exposição – necessários variam para uma população de pacientes naturalmente heterogênea em relação a uma população de animais experimentais altamente uniforme (Huang *et al.*, 2011). Em condições usuais, é comum aplicações de faixas de parâmetros como densidade de energia (0,04 – 50 J/cm²) e densidades de potência (< 100 mW/cm²) (Alghamdi; Kumar; Moussa, 2012).

Brassolatti *et al.*, 2018 apontaram que para a recuperação de lesão por queimaduras, o comprimento de onda do vermelho com parâmetros que correspondem a uma janela-terapêutica de 1 a 25 J, dependendo das características da lesão, é a mais indicada. Outros pesquisadores sugerem que comprimentos de ondas maiores e alta densidade de energia sejam mais efetivas (Gacto-Sanchez, 2017; Sánchez-Muñoz *et al.*, 2015).

Os fibroblastos, que representam o tipo de células mais comuns do tecido conjuntivo, são responsáveis pela síntese e secreção de fibras e componentes essenciais, como colágeno, proteoglicanos e elastina. Esses elementos são fundamentais para a restauração da matriz dérmica durante o processo de cicatrização de feridas. Embora diversos fatores influenciem esse processo, a proliferação e a migração celular são determinantes essenciais para

a regeneração tecidual (Phan *et al.*, 2021). A Figura 6 mostra o efeito de diferentes comprimentos de onda sobre células da linhagem L929, tendo como evidência principal os efeitos claros dos comprimentos de onda do vermelho, do azul e do verde em relação ao grupo controle. É importante relembrar a presença abundante pelo corpo de células como os fibroblastos e osteoblastos, que possuem função transversal em várias patologias.

Figura 6 – Migração de células L929 submetidas às luzes vermelha, azul e verde.



Representação esquemática do efeito na cicatrização de feridas em função do comprimento de onda e da energia. (b) Fotografia original da configuração experimental. Estudo microscópico da migração de células L929 submetidas ao tratamento luminoso é apresentado nas figuras (c) controle, (d) luz vermelha, (e) luz azul e (f) luz verde. Fonte: Adaptado de (Phan *et al.*, 2021).

2.2 Interação entre luz e tecido

Na interação da luz com os tecidos, podemos considerar que quase todos os tipos de tecidos biológicos possuem aspecto turvo, ocorrendo absorção e espalhamento, o que resulta em atenuação da luz (Grossweiner *et al.*, 2005).

No tecido biológico, é necessário que ocorra a absorção controlada para que haja estímulo (Smith, 1999), sendo os cromóforos as moléculas responsáveis pela absorção da luz (Grossweiner *et al.*, 2005). Parâmetros como comprimento de onda, potência, densidade de potência, densidade de energia e tempo de irradiação são importantes para efeitos biológicos (Musstaf; Jenkins; Jha, 2019; Niemz, 2007). Para caracterizar a eficácia da interação entre a

luz e o cromóforo, é importante distinguir o espectro de absorção (a dependência do coeficiente de absorção μ_a com o comprimento de onda λ) do espectro de ação (a resposta biológica relativa em função de λ). O espectro de absorção dos cromóforos mitocondriais (por exemplo, a citocromo c oxidase) determina os comprimentos de onda efetivamente absorvidos e, por consequência, os comprimentos que podem produzir reações fotoquímicas no tecido.

Uma vez que a FBM parte da interação entre luz e molécula ou célula, a absorção é o fenômeno principal a ser verificado. A intensidade da absorção óptica é descrita em termos do coeficiente de absorção μ_a , com uma profundidade de penetração dada por cm^{-1} (Chung *et al.*, 2012; Jacques, 2013).

Assim como na absorção, o espalhamento da luz pode ser caracterizado por um coeficiente de espalhamento μ_e (Niemz, 2007; Quinto-Su; Venugopalan, 2007), e uma profundidade de penetração cm^{-1} . A anisotropia do meio reduz o coeficiente de espalhamento da seguinte forma:

$$\mu'_e = \mu_e(1 - g) \quad (2.1)$$

onde g representa o cosseno médio do ângulo de dispersão, que pode assumir os seguintes valores: $g = -1$ (dispersão total para trás) a $g = +1$ (dispersão total para frente), onde um valor de $g = 0$ indica, em média, dispersão isotrópica. A dispersão para a frente prevalece no tecido biológico, onde g pode variar entre 0,8 e 0,99.

O feixe de luz perde energia à medida que passa pelo tecido, de modo que podemos definir o coeficiente de atenuação total como a soma do coeficiente de absorção e do coeficiente de espalhamento. O coeficiente de atenuação do tecido caracteriza a facilidade com que ele pode ser penetrado por um feixe de luz. Assim, a fração de um feixe incidente de fótons que é absorvido ou espalhado por unidade de espessura do absorvedor alvo (tecido), μ_t (cm^{-1}), é dada por:

$$\mu_t = \mu_e + \mu_a \quad (2.2)$$

A intensidade do feixe transmitido em meios turvos é dada por:

$$I = I_0 e^{-\mu_t x} \quad (2.3)$$

onde I_0 é a intensidade do feixe incidente e x a espessura do meio. A equação apenas é válida para fótons que não sofreram interação.

Para materiais mais espessos, onde há diversos elementos que provocam múltiplos espalhamentos (como o caso do trajeto da luz entre a superfície da pele e camada mais interna),

podemos usar a lei de Beer-Lambert (Swinehart, 1962):

$$I = I_0 e^{-\mu_a x} \quad (2.4)$$

que é válida para $\mu_a \gg \mu_e$. Neste caso, a atenuação da intensidade da luz ocorre principalmente em função da absorção, sendo o espalhamento desprezível.

A descrição da distribuição da transferência de energia luminosa no tecido é baseada, em geral, na teoria do transporte (Chandrasekhar, 1960) e no fenômeno de transferência de energia na forma de radiação eletromagnética. A propagação da radiação através de um meio é afetada por processos de absorção, espalhamento e emissão (Chandrasekhar, 1960; Lenoble, 1985). A radiância $L(r, s)$ da luz na posição r viajando na direção do vetor unitário \hat{s} é reduzido pela absorção e espalhamento, mas é aumentado pela luz que é espalhada da direção s' para a direção s . A radiância é uma medida da quantidade de luz que passa ou é emitida de uma determinada área e dentro de um determinado ângulo sólido em uma dada direção. Então, a equação de transporte, que descreve a interação da luz é:

$$s \cdot \nabla L(r, s) = -(\mu_e + \mu_a)L(r, s) + \mu_e \int_{4\pi} p(s, s')L(r, s')d\omega' \quad (2.5)$$

$$\int_{4\pi} p(s, s')L(r, s')d\omega' = 1 \quad (2.6)$$

onde $d\omega'$ é o ângulo sólido diferencial na direção s' , e $p(s, s')$ é a função de fase (Cheong; Prah; Welch, 1990; Chung *et al.*, 2012). Essa equação é de difícil resolução, exigindo aproximações tanto da radiância quanto da função de fase. As soluções aproximadas consideram o tipo de irradiação (difusa ou colimada) e as condições de contorno óptico (Cheong; Prah; Welch, 1990). A descrição da propagação da luz em tecidos biológicos por meio da equação de transporte de radiação é complexa, mas permite estimar a distribuição de energia luminosa em diferentes profundidades a partir dos coeficientes ópticos (μ_a , μ_e e μ_t). Este entendimento é crucial para a dosimetria em FBM, na medida em que fundamenta a seleção dos parâmetros (como comprimento de onda, densidade de energia e tempo de exposição) necessários para atingir células-alvo em aplicações terapêuticas. Após apresentar os princípios da propagação da luz em tecidos, na seção seguinte abordaremos como as propriedades mecânicas dessas células podem ser quantificadas por meio de técnicas de microrreologia.

2.3 Microrreologia de células

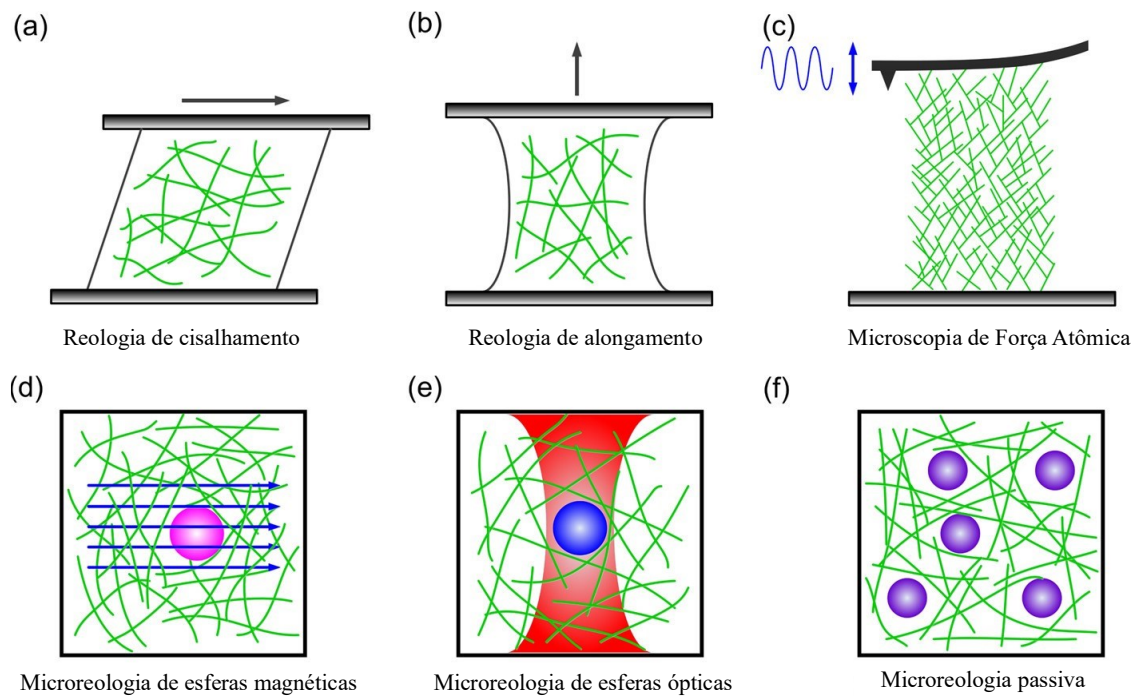
As investigações das propriedades mecânicas de materiais em escalas microscópicas, particularmente em níveis celulares e subcelulares, impulsionaram o desenvolvimento da microrreologia celular.

Essa área de pesquisa aplica princípios da Física em materiais biológicos, como células, tecidos e fluidos, em escalas microscópicas, tanto do ponto de vista experimental quanto teórico.

Em regra, materiais biológicos possuem comportamento viscoelástico, o que permite a adaptação de diferentes arranjos e técnicas experimentais, aliadas a modelos matemáticos, tendo como resultados informações de parâmetros das propriedades mecânicas de pequenas estruturas biológicas. Como resultado, é possível combinar diferentes formas de caracterização, a fim de obter parâmetros viscoelásticos e morfológicos (Cross *et al.*, 2007).

A aspiração por micropipeta (Hochmuth, 2000), a citometria de torção magnética (Laurent *et al.*, 2002), pinças ópticas (Bustamante *et al.*, 2021), o *Particle-tracking Microrheology* (Wu *et al.*, 2020) e a indentação via Microscopia de Força Atômica (De Sousa *et al.*, 2020) são exemplos de técnicas experimentais aplicadas na microrreologia de materiais biológicos. A Figura 7 apresenta algumas aplicações, acompanhadas de uma breve explicação na legenda.

Figura 7 – Técnicas experimentais para resposta mecânica de redes de biopolímeros.

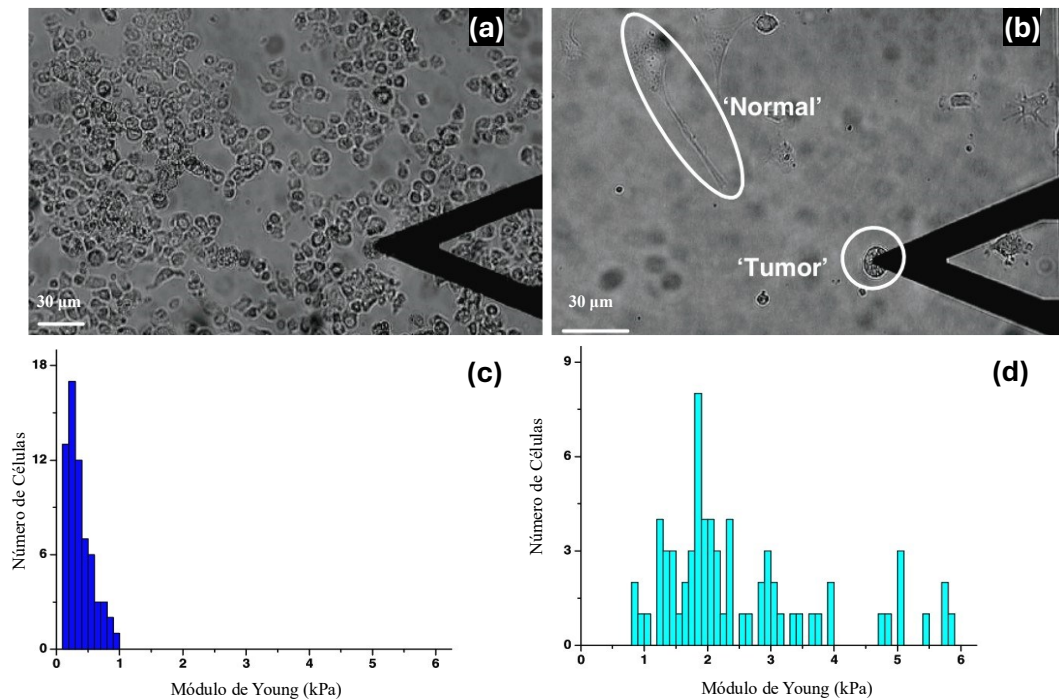


Técnicas experimentais para caracterizar a resposta mecânica de redes de biopolímeros. (a) Reologia de cisalhamento: uma carga ou deformação de cisalhamento/extensão é aplicada à rede, permitindo a obtenção de propriedades mecânicas a partir da resposta estrutural da rede. (b) Reologia de alongamento - Similar à reologia de cisalhamento, mas focada na resposta à deformação por alongamento. (c) Microscopia de força atômica (AFM) - uma oscilação de baixa amplitude é aplicada à rede de biopolímeros, e a resposta mecânica é determinada pela medição do deslocamento da rede e da força de reação por meio da deflexão do cantilever. (d) Pinças magnéticas: uma força externa é aplicada a partículas-sonda embutidas na rede, e suas propriedades são obtidas a partir da relação força-deslocamento das partículas usando a equação generalizada de Stokes. (e) Pinças ópticas: funcionam de maneira semelhante às pinças magnéticas, mas utilizam forças ópticas para manipular as partículas-sonda e analisar a resposta mecânica da rede. (f) Microreologia passiva: a rigidez local da rede é inferida a partir dos deslocamentos de partículas traçadoras submetidas a flutuações térmicas. Fonte: Adaptado de (Gong *et al.*, 2019).

Consideremos agora a técnica de microscopia de força atômica como exemplo ilustrativo, uma vez que ela é a metodologia empregada neste estudo e apresenta a versatilidade de ser combinada com diversas outras abordagens experimentais (Neuman; Nagy, 2008; Shao; Hochmuth, 1996).

A Figura 8 mostra resultados de nanoindentação por AFM, em que células tumorais são significativamente menos rígidas. Cross *et al.*, 2008 associam aspectos morfológicos e biomecânicos à motilidade celular no corpo, concluindo que células tumorais são 80% mais macias e a adesão à superfície do substrato é cerca de 33% menos adesiva em comparação com a das células benignas.

Figura 8 – Microscopia óptica do *cantilever* de AFM em células saudáveis.



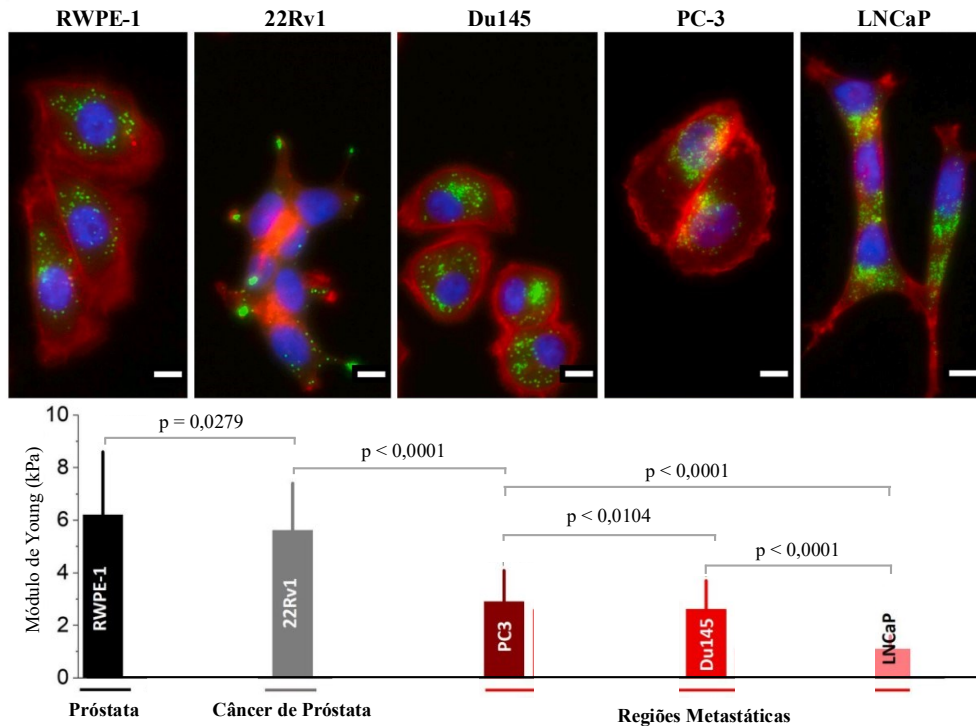
(a), (b) Imagens de microscopia óptica do *cantilever* de AFM em meio a células saudáveis – morfologicamente normais – e tumorais diferenciadas por imunomarcagem. (c) Módulo de Young das células tumorais (d) módulo de Young das células saudáveis. Fonte: Adaptado de (Cross *et al.*, 2008).

Os resultados ilustrados pela Figura 8 podem explicar algumas funcionalidades das células: aderência, motilidade, transformação e invasão. Por exemplo, células de câncer metastáticas são 70% mais macias, em termos do módulo de Young, em que a análise mecânica via AFM consegue distinguir células de câncer das normais, mesmo quando elas apresentam morfologias semelhantes (Cross *et al.*, 2007). Resultados similares foram obtidos comparando células renais e de câncer (Rebelo *et al.*, 2013).

Apesar de diversos estudos citarem aspectos morfológicos na identificação de células tumorais (Bhadriraju; Hansen, 2002; Radmacher, 1997), não é possível considerar esse parâmetro determinante. A capacidade do AFM em mostrar resultados para análise nanomecânica o habilita como importante ferramenta de caracterização, correlacionando com os testes de imuno-histoquímicas, normalmente usados para detectar células de câncer.

Estudo recente investigou as propriedades mecânicas locais de células prostáticas humanas normais (RWPE-1), células malignas (22Rv1) e células metastáticas da próstata (LNCaP, Du145 e PC3) (Pogoda *et al.*, 2021). Ratificando os estudos já mencionados, as células prostáticas não malignas apresentaram maior rigidez em comparação com células de câncer, em que as células metastáticas demonstraram ser significativamente mais macias do que aquelas provenientes do tumor primário (Figura 9).

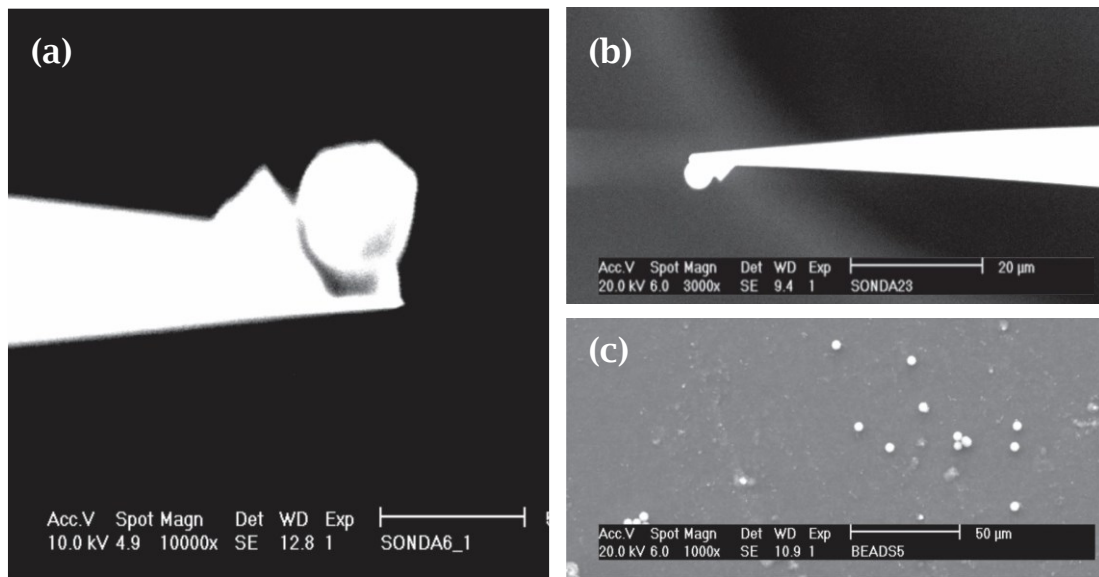
Figura 9 – Fluorescência de cinco linhagens celulares de próstata.



Imagens de fluorescência de cinco linhagens celulares de próstata: RWPE-1 (células não transformadas da glândula prostática), 22Rv1 (câncer de próstata), Du145 (metástase cerebral de um adenocarcinoma de próstata), PC3 (metástase de câncer de próstata para os ossos) e LNCaP (metástase de câncer de próstata para o linfonodo). O núcleo celular foi marcado com DAPI, resultando em fluorescência azul; o citoesqueleto de actina foi visualizado utilizando faloidina conjugada, que emite fluorescência vermelha; e as gotículas lipídicas, compostas por lipídios neutros, foram identificadas com o corante Bodipy, emitindo fluorescência verde. A escala nas imagens: 10 μm . Abaixo: valor médio do módulo de Young medido em aproximadamente 40 células por linhagem celular. O teste t de Student não pareado foi utilizado para verificar diferenças estatísticas entre os conjuntos de dados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Fonte: Adaptado de (Pogoda *et al.*, 2021).

Materiais biológicos, em particular células vivas, devido à natureza complexa e heterogênea, a escolha da geometria de contato entre o cantilever do AFM e a amostra é determinante para a interpretação das propriedades mecânicas (Lima *et al.*, 2024). Diferentes geometrias de contato influenciam diretamente a distribuição de tensões e a resposta da amostra à força aplicada, o que afeta os modelos matemáticos usados para interpretar os dados (Radmacher, 2002). A dispersão de resultados observada é frequentemente associada a inhomogeneidades na composição do material biológico, variações na espessura da amostra, diferenças nos protocolos de preparação e condições distintas de sondagem, como forças máximas aplicadas, velocidades de indentação e a geometria do indentador utilizado (Efremov *et al.*, 2017).

Figura 10 – Micrografias de *beads* de sílica em pontas de AFM.



(a) Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura de beads de sílica obtida com ampliação de 10.000 vezes, mostrando uma geometria que não é perfeitamente esférica. Os diâmetros médios nas direções X e Y são, respectivamente, $4,94 \pm 0,49 \mu\text{m}$ e $4,65 \pm 0,33 \mu\text{m}$. (b) A imagem mostra uma bead posicionada abaixo da ponta da sonda, indicando o primeiro contato com a superfície da amostra. (c) Beads de sílica distribuídas em uma lamínula de vidro, com ampliação de 1.000 vezes. Fonte: extraído de (Santiago, 2012).

As pontas do *cantilever* padrão possuem uma ponta piramidal, cujo ápice possui raio da ordem de 20 nm. Dada a alta resolução espacial das pontas, é possível detectar a resposta mecânica de filamentos de actina isolados, cuja rigidez é superior à magnitude elástica média da célula em sua totalidade. Além disso, o raio de contato da ponta com a célula é muito pequeno, fornecendo apenas uma medida local das propriedades mecânicas. Obter uma medida global da mecânica celular exige medidas de mapeamento integral da superfície celular. A estratégia para obter uma medida global da elasticidade celular utilizando poucas curvas de força envolve adaptar uma microesfera de diâmetro da ordem de 10 μm na ponta do *cantilever*. Com uma área de contato tão grande, a medida retorna um valor maior próximo da rigidez mecânica global da célula. Contudo, grandes indentadores esféricos são mais suscetíveis aos efeitos de espessura finita das amostras (Costa *et al.*, 2022). A Figura 10 mostra imagens de micrografia dessa adaptação. Na seção 2.8 são apresentados os princípios físicos do AFM.

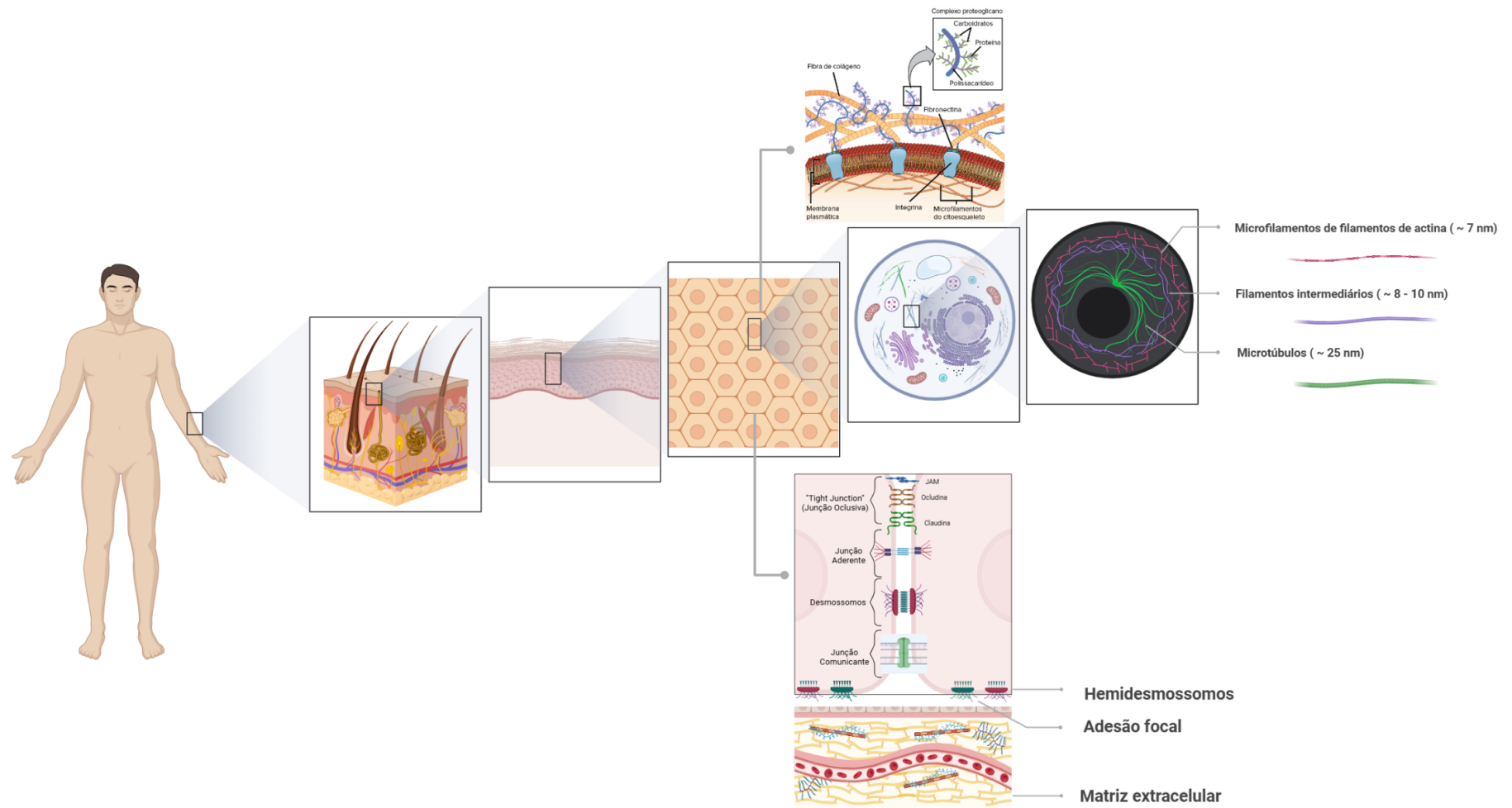
2.4 Digressão sobre biomecânica celular: princípios e modelos

A Figura 11 apresenta esquema detalhado da organização estrutural dos tecidos do corpo humano, com foco na pele, suas camadas, componentes celulares e diferentes tipos de junções celulares. A ilustração fornece uma visão hierárquica, começando pela posição da pele no corpo humano e avançando até o nível subcelular.

O nível subcelular mostra o citoesqueleto da célula epitelial, que é composto por três tipos principais de filamentos: os filamentos de actina (com cerca de 7 nm de diâmetro), responsáveis pela manutenção da forma celular e pela movimentação; os filamentos intermediários (com cerca de 8-10 nm de diâmetro), que conferem resistência mecânica à célula. Os filamentos intermediários possuem função adjuvante na resistência mecânica, sendo a actina a estrutura mais importante (Sanghvi-Shah; Weber, 2017). Por fim, os microtúbulos (com cerca de 25 nm de diâmetro), que formam redes que permitem o transporte intracelular de vesículas e organelas. Avançando para as junções celulares, o diagrama destaca as estruturas que mantêm as células epiteliais unidas e organizadas em tecidos coesos (Clark; Douglas; Choi, 2018).

As células dos tecidos epiteliais e de outros tipos são conectadas por diferentes tipos de junções celulares, classificadas em três categorias principais: (i) junções oclusivas (tight junctions), que promovem a vedação entre células adjacentes, impedindo a passagem de substâncias; (ii) desmossomos, que garantem a adesão mecânica entre células, ancorando filamentos intermediários ao citoesqueleto; (iii) junções comunicantes, que formam canais que permitem a comunicação direta entre células vizinhas, facilitando o transporte de íons e moléculas. Por fim, a interface entre as células epiteliais e a matriz extracelular (no detalhe da matriz extracelular acima ampliada) e a lâmina basal e sua conexão às células por meio dos hemidesmossomos. Esses hemidesmossomos ancoram os filamentos de queratina intracelulares à lâmina basal, garantindo a fixação celular. A matriz extracelular é uma estrutura rica em proteínas estruturais, como o colágeno, e proteoglicanos, que sustentam e organizam os tecidos subjacentes.

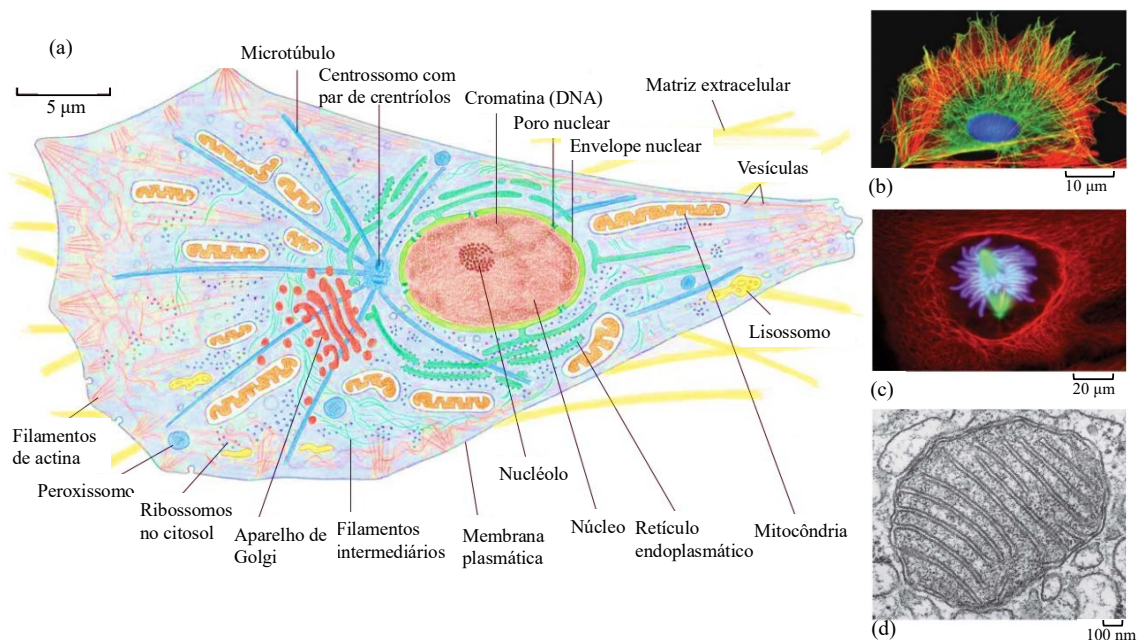
Figura 11 – Organização estrutural da pele e suas interações celulares.



A figura apresenta, de forma sistemática, os diferentes níveis de organização dos tecidos, desde o corpo humano como um todo até às interações subcelulares responsáveis por garantir a funcionalidade e a coesão do tecido epitelial. Nas imagens ampliadas abaixo, é possível observar o esquema ilustrativo das diferentes junções celulares. Fonte: Elaborada pelo autor no Biorender, exceto a imagem da matriz extracelular na parte superior, que foi adaptada de (Clark; Douglas; Choi, 2018).

As diferentes técnicas de microscopia possibilitaram o acesso a estruturas fundamentais do citoesqueleto (Figura 12), como filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, além da mitocôndria, que é responsável por fornecer a energia necessária para a dinâmica dessas estruturas. A mitocôndria, por sua vez, fornece ATP, que é essencial para os rearranjos do citoesqueleto e para atividades biomecânicas, como contração, migração e divisão celular. Essas estruturas permitem que as células desempenhem funções mecânicas vitais, como adaptação a forças externas, locomoção em resposta a estímulos e manutenção da integridade estrutural, sendo indispensáveis para processos biológicos como a cicatrização de feridas e respostas imunes (Alberts *et al.*, 2017).

Figura 12 – Principais características de uma célula eucariótica sob diferentes técnicas.



(a) Ilustração das principais características de uma célula eucariótica. (b) célula em cultura fixada e marcada para destacar os arranjos citoplasmáticos de microtúbulos (verde) e filamentos de actina (vermelho); (c) célula em divisão marcada para evidenciar os microtúbulos do fuso mitótico (verde) e a rede de filamentos intermediários (vermelho), com o DNA marcado em azul em ambas as células. (d) Imagem de microscopia eletrônica mostrando um corte transversal de uma mitocôndria. Fonte: Adaptado de (Alberts *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a biomecânica celular é uma área que tem avançado significativamente, promovendo uma compreensão mais aprofundada da mecânica dos sistemas vivos e de suas aplicações biofísicas, fisiológicas e médicas. A análise de respostas biomecânicas, corroborada por análise de expressão proteica, permite estabelecer correlações significativas entre aspectos viscoelásticos e bioquímicos da célula. Quando uma tensão mecânica é aplicada à superfície celular, o citoesqueleto, a matriz extracelular e as junções celulares respondem mecanicamente (Clark; Douglas; Choi, 2018). Esses componentes

participam dos processos dinâmicos da célula, sendo importantes para a organização, o funcionamento e a comunicação nos tecidos, formando a base da estrutura e do funcionamento dos organismos multicelulares (Clark; Douglas; Choi, 2018).

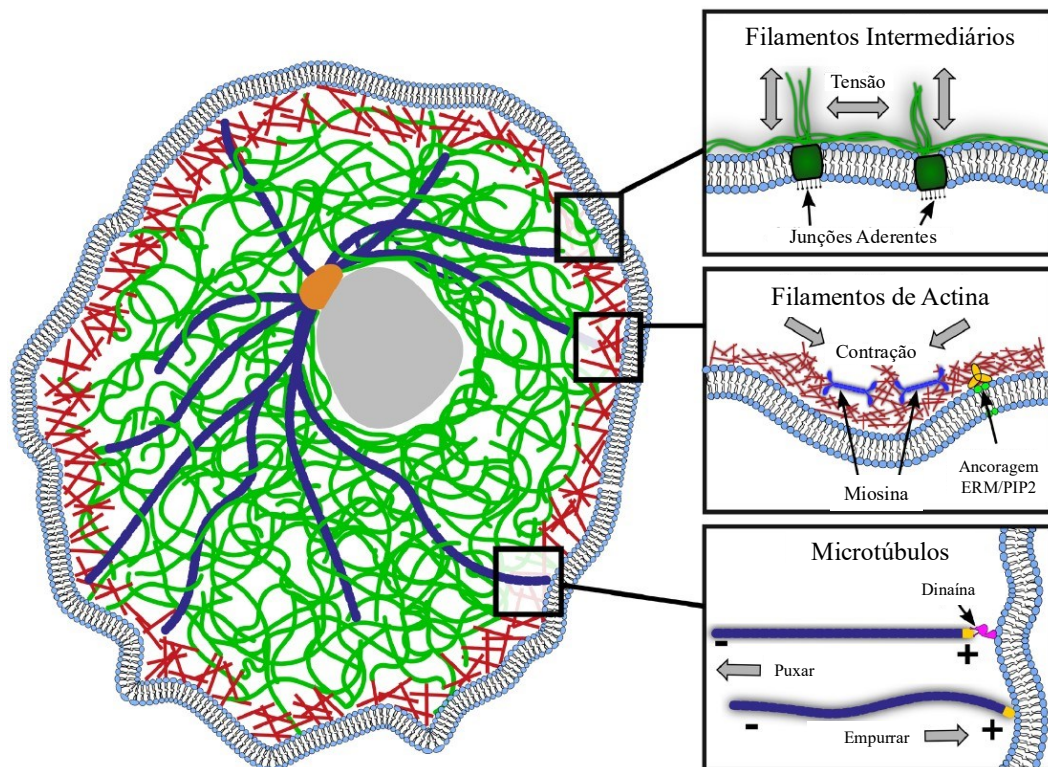
Os três polímeros do citoesqueleto – microtúbulos (com comprimento de persistência $\approx 5 \text{ mm}$), filamentos de actina ($\approx 13,5 \text{ }\mu\text{m}$) e filamentos intermediários ($\approx 0,5 \text{ }\mu\text{m}$) – apresentam rigidez mecânica distinta (Fletcher; Mullins, 2010). Essa característica é fundamental para a transmissão e distribuição das forças dentro da célula, impactando processos como migração, divisão e diferenciação celular (Stricker; Falzone; Gardel, 2010). As propriedades mecânicas variam dependendo da arquitetura específica de cada rede filamentosa, e podem ser moduladas por modificações pós-translacionais, pela organização espacial dos filamentos e pelas interações com o ambiente extracelular (Fletcher; Mullins, 2010). Com isso, o citoesqueleto consegue responder a estresses internos e externos, podendo funcionar como um mecanismo de "memória" mecânica, afetando comportamentos futuros, como a diferenciação celular, a manutenção da integridade estrutural e no funcionamento adaptativo da célula (Alberts *et al.*, 2017).

2.4.1 Citoesqueleto

Os filamentos de actina (Fig. 13) geralmente estão localizados no córtex celular, próximo às bordas externas da membrana. Sua estrutura é formada por monômeros de actina, formando filamentos de dupla hélice resultante, chamados F-actina. Entre as diversas funções mecânicas desempenhadas, destacam-se: a manutenção do formato e movimento celular, interações com receptores de membrana e a formação do anel contrátil durante a divisão celular (ver Fig. 14), que são essenciais para os processos dinâmicos, como endocitose, exocitose, adesão celular e extensão de protrusões celulares.

Os filamentos intermediários são compostos por tipos distintos de proteínas fibrosas, como queratinas, desmina e vimentina (Fletcher; Mullins, 2010). Essa associação de proteínas possibilita a formação de estruturas de alta resistência mecânica a forças de tração. Os filamentos intermediários garantem maior estabilidade ao citoesqueleto, contribuindo para a ancoragem de organelas celulares (Fletcher; Mullins, 2010).

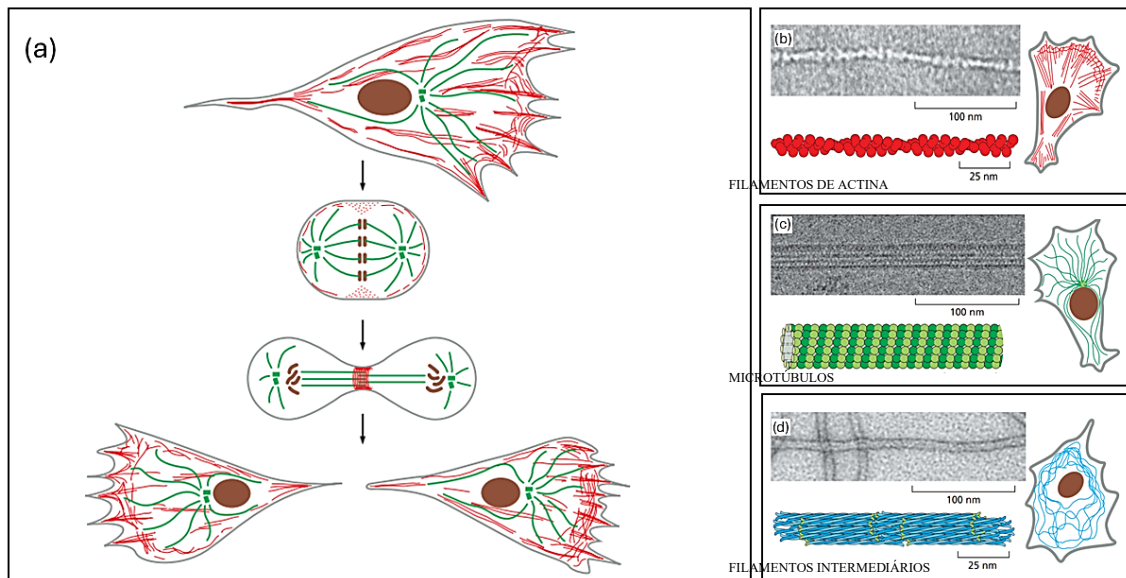
Figura 13 – Arquitetura do citoesqueleto: filamentos intermediários, córtex de actina, microtúbulos.



A ilustração representa a arquitetura do citoesqueleto em uma célula aderida a um substrato. Os filamentos intermediários, representados pela cor verde, formam uma rede densa, que é essencial para conferir resistência mecânica a grandes deformações e estabelecer conexões entre o núcleo celular e a periferia da célula. O córtex de actina (vermelho) está ancorado à membrana plasmática por meio de diversas interações, incluindo aquelas mediadas por proteínas da família ERM (ezrina, radixina e moesina), que se ligam aos lipídios da membrana. A contração celular é impulsionada pelo deslizamento dos filamentos de actina, um processo dependente da ação de motores de miosina. Esse mecanismo regula a rigidez da superfície celular e gera uma pressão hidrostática interna elevada. Os microtúbulos (azul), por sua vez, exercem forças de empurrão e tração sobre a membrana celular, desempenhando um papel fundamental na segregação cromossômica durante a divisão celular. O processo é impulsionado tanto pela polimerização e despolimerização dos microtúbulos quanto pela ação de proteínas motoras, como a dineína, que promovem forças de deslizamento e atuam como pontos de ancoragem na membrana. Fonte: Adaptado de (Mulla; Aufderhorst-Roberts; Koenderink, 2018).

Os microtúbulos, que possuem geometria cilíndrica e oca, são formados por dímeros de tubulina e desempenham funções essenciais, como a determinação do formato celular, a organização do citoplasma e o transporte de vesículas e organelas (Mulla; Aufderhorst-Roberts; Koenderink, 2018). O rearranjo, a integração e a regulação do citoesqueleto permitem que uma célula execute importantes processos dinâmicos, como exemplo da divisão celular, conforme a Figura 14.

Figura 14 – Diagrama do citoesqueleto durante a divisão celular de um fibroblasto.



(a) Diagrama das alterações no citoesqueleto durante a divisão celular de um fibroblasto, mostrando o citoesqueleto de actina polarizada (vermelho) com lamelipódios e filopódios para locomoção, e os microtúbulos (verde) emanando do centro organizador para formar o fuso mitótico bipolar. Este alinha e segrega cromossomos duplicados (marrom), e o anel contrátil de actina divide a célula, seguido pela reorganização dos citoesqueletos nas células-filhas para locomoção em direções opostas. (b-d) Fotomicrografias e representações esquemáticas individuais de filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, respectivamente. Fonte: Adaptado de (Alberts *et al.*, 2017).

2.4.2 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) consiste em uma rede tridimensional de macromoléculas que preenchem os espaços intercelulares, sendo composta principalmente por proteínas e carboidratos (Alberts *et al.*, 2017). Esse complexo de macromoléculas tende a se associar de maneira a formar diferentes estruturas, permitindo a subdivisão da MEC em três categorias: componentes fibrilares, componentes não fibrilares e microfibrilas (Bhadriraju; Hansen, 2002).

Os componentes fibrilares são compostos por colágenos fibrilares e fibras elásticas. Esses componentes contribuem para o funcionamento adequado dos tecidos em resposta a tensões e deformações mecânicas (Bhadriraju; Hansen, 2002).

Já os componentes não fibrilares incluem os proteoglicanos, que são moléculas proteicas contendo carboidratos e o grupo das glicoproteínas estruturais não-colágenas (Alberts *et al.*, 2017). Essas cadeias conferem aos proteoglicanos (e à MEC) propriedades viscosas, desempenhando um papel importante na resistência à compressão, na manutenção da hidratação

e na regulação do ambiente celular (Alberts *et al.*, 2017).

Por fim, as microfibrilas, estruturas compostas por colágeno tipo VI e proteínas de elastina. Esse tipo de colágeno forma redes complexas que conferem resistência e suporte aos tecidos, enquanto a elastina oferece flexibilidade e elasticidade, facilitando o estiramento e a recuperação dos tecidos após a deformação (Alberts *et al.*, 2017).

2.4.3 Junções celulares

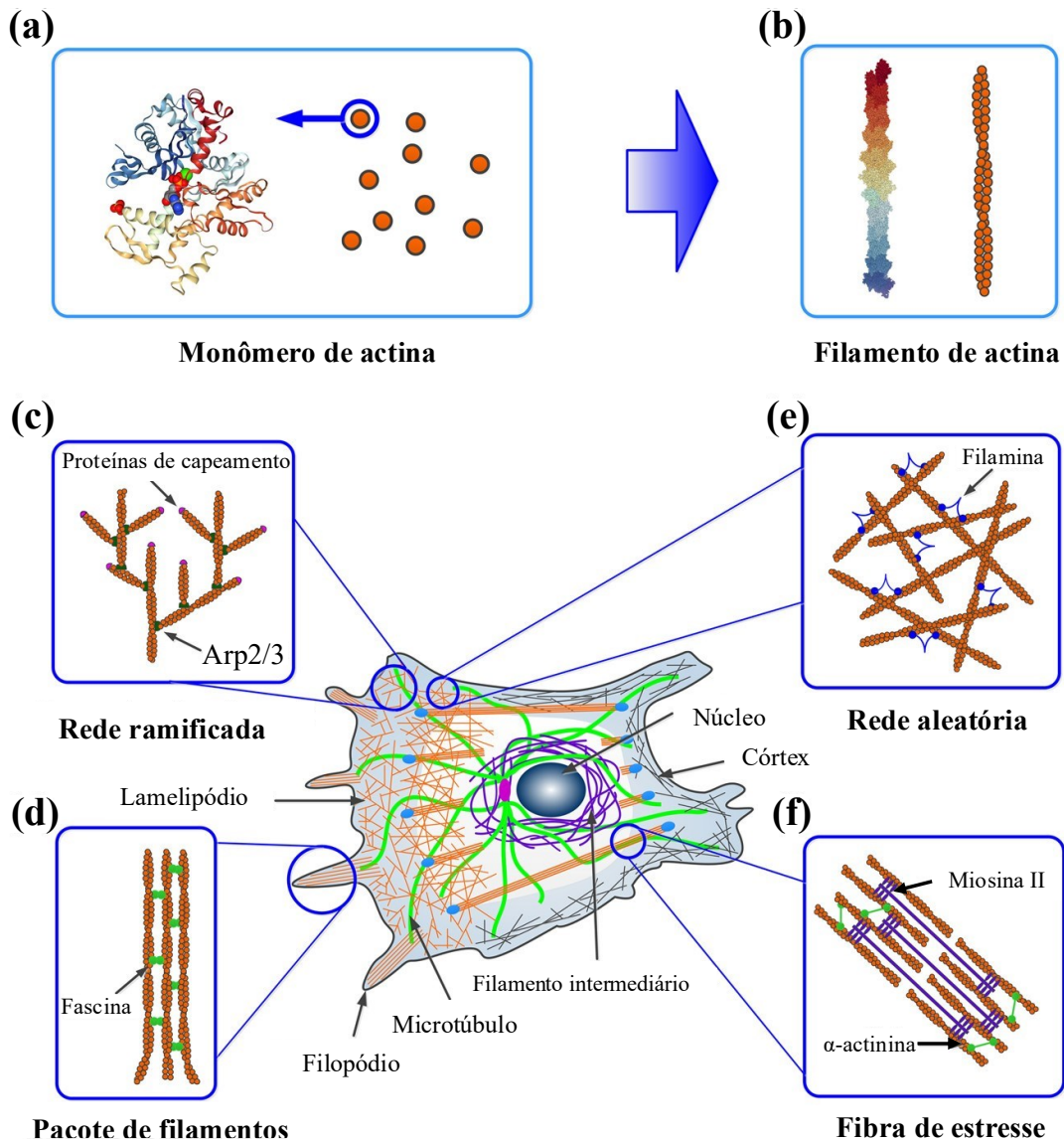
As junções celulares são um termo comum sobre todas conexões e estruturas especializadas distribuídas ao longo da membrana plasmática (Bhadriraju; Hansen, 2002). Desempenham diversas funções, incluindo a facilitação da adesão e da troca de nutrientes entre células, estabelecidas por junções intercelulares; e entre células e a matriz extracelular, realizadas pelas junções célula-matriz (Gong *et al.*, 2019).

As junções célula-matriz conferem resistência a tensões mecânicas através das hemidesmossomos; as junções de adesão focal ligam a célula a substratos rígidos, associando-se aos microfilamentos do citoesqueleto, tendo como função a mediação entre a força de adesão e o crescimento celular dependente de ancoragem (Gong *et al.*, 2019). Neste ponto, é importante destacar que células tumorais frequentemente perdem essa dependência de ancoragem, ou seja, conseguem se proliferar mesmo sem estar aderidas à MEC (Alberts *et al.*, 2017). Tal comportamento é observado no processo de cultivo celular, em que células aderentes normais param de crescer quando estão em suspensão, enquanto células tumorais continuam a se proliferar mesmo não aderidas (Alberts *et al.*, 2017).

2.5 Biofísica e biomecânica do citoesqueleto

Conforme discutido na Seção 2.4, o citoesqueleto consiste em uma rede dinâmica de biopolímeros (F-actina, microtúbulos e filamentos intermediários), cuja organização confere propriedades viscoelásticas não lineares sustentadas por processos dependentes de ATP (Alberts *et al.*, 2017). Nesta subseção apresentamos os princípios físicos que regulam a transmissão de forças e a dinâmica intrínseca do citoesqueleto, descrevendo tanto modelos teóricos como evidências experimentais (por exemplo, obtidas por AFM e reologia) que conectam a arquitetura molecular às propriedades mecânicas celulares.

Figura 15 – Principais componentes estruturais do citoesqueleto em uma célula eucariótica.



O diagrama esquemático dos principais componentes estruturais do citoesqueleto em uma célula eucariótica típica, destacando diferentes arquiteturas de actina: (a) estrutura cristalina da actina globular (PDB: 3HTB); (b) Estrutura atômica completa (PDB: 5MVA) e diagrama esquemático de um único filamento de actina; (c) Redes de actina ramificadas formadas com o fator promotor de nucleação ramificada (complexo Arp2/3) e a proteína de capeamento, que interrompe o crescimento dos filamentos. (d) Feixes de actina filamentosa, compostos por filamentos organizados em paralelo e proteínas de ligação cruzada (fascina). (e) Redes aleatórias de actina interligadas por conectores flexíveis e extensíveis (filamina). (f) Fibras de tensão formadas por conectores ortogonais longos (α -actinina) e feixes paralelos de miosina II. Fonte: Adaptado de (Gong *et al.*, 2019).

Apesar das diferentes técnicas para identificar as proteínas das redes citoesqueléticas e sua estrutura, ainda não se tem uma compreensão das propriedades biofísicas de conjuntos dinâmicos de multiproteínas. Juntamente com a capacidade da célula em manter sua fisiologia quando submetida a diferentes condições externas, esse contexto representa um

desafio e está longe de uma compreensão definitiva (Jung *et al.*, 2020). Por exemplo, na migração e na divisão celular, forças geradas no interior da célula são responsáveis por conduzir a remodelação da matriz extracelular e da morfogênese do tecido (Gardel *et al.*, 2008).

A organização da actina³ no citoesqueleto depende da interação com proteínas de ligação cruzada. Os monômeros de actina (G-actina) podem se polimerizar em filamentos helicoidais duplos (F-actina), conforme ilustrado na Figura 15. Esses filamentos apresentam comportamento semiflexível e desempenham papéis essenciais na mobilidade e divisão celular. Com auxílio de proteínas de ligação à actina (ABPs), os filamentos de F-actina formam diferentes redes citoesqueléticas, como o córtex de actina, fibras de tensão, lamelipódios e filopódios. Essas estruturas influenciam propriedades mecânicas e funções celulares. Redes altamente ramificadas de F-actina ocorrem na borda das células em locomoção, promovendo sua extensão (Figura 15c). Feixes de filamentos paralelos formam filopódios, sensores do microambiente celular (Figura 15d). Além disso, redes aleatórias de F-actina sustentam o córtex celular, regulando processos como resposta imunológica e cicatrização (Figura 15e). As fibras de tensão, compostas por F-actina e miosina, geram forças contráteis e transmitem tensões para a matriz extracelular via adesões focais (Figura 15f).

Os filamentos de proteína apresentam semelhanças com os polímeros lineares em materiais elásticos sintéticos, como a poliacrilamida. O comprimento e a rigidez dos polímeros citoesqueléticos, que em muitos casos abrangem quase todo o corpo celular, resultam em características de redes tridimensionais. Portanto, são necessárias frações de volume muito menores do que as necessárias para formar géis de polímeros mais flexíveis (Broedersz; MacKintosh, 2014; Kollmannsberger; Fabry, 2011). Dessa forma, essas estruturas alongadas permitem a formação de redes tridimensionais com concentrações significativamente menores de polímeros quando comparadas com materiais sintéticos flexíveis. Para alcançar a mesma rigidez ou módulo elástico de um gel de poliacrilamida a 5%, basta uma concentração de filamentos de actina cerca de 100 vezes menor, demonstrando uma eficiência estrutural que reduz o gasto de recursos celulares, o que representa uma vantagem evolutiva (Lodish, 2008, cap. 18; Bhadriraju; Hansen, 2002).

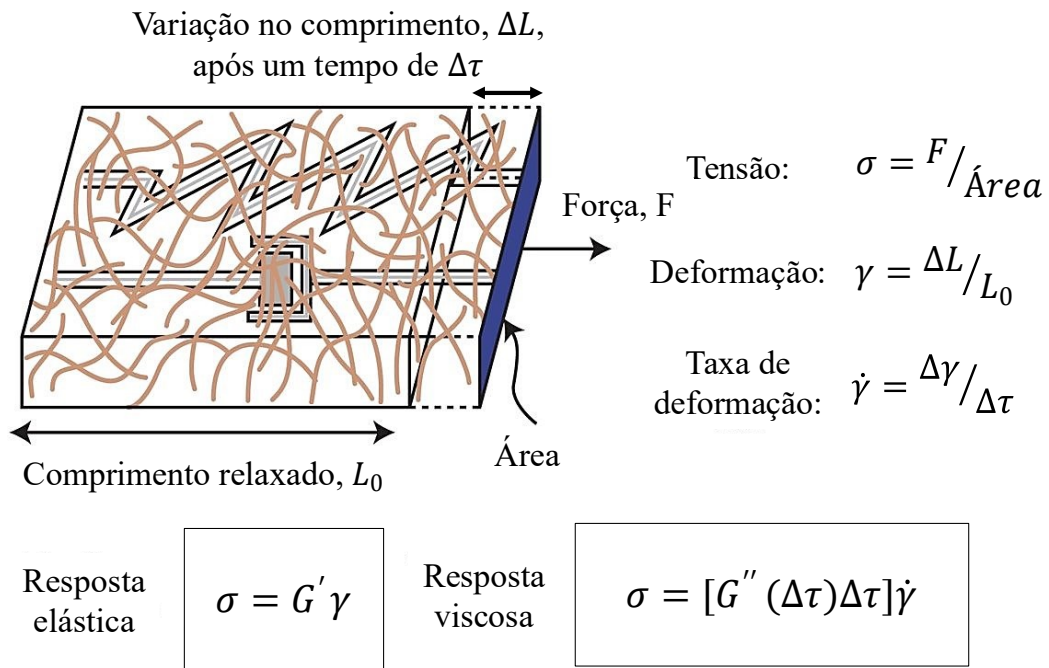
O relaxamento viscoelástico nos domínios de tempo e frequência de fibroblastos sobre géis rígidos de poliacrilamida foi estudado por microscopia de força atômica (Moura *et al.*, 2023). O estudo demonstrou que os fibroblastos L929, cultivados em géis rígidos de

³ A actina é a proteína mais abundante encontrada em células eucarióticas, representa 10% da massa total de proteína em células musculares e até 5% em células não musculares (Lodish, 2008).

poliacrilamida, apresentam maior rigidez em comparação com o cultivo em vidro. Tal diferença pode ser atribuída à remodelação da rede de F-actina, na qual a rigidez celular é modulada pela pré-tensão dependente do substrato.

A distinção entre o citoesqueleto e as redes de polímeros simples reside na inclusão de proteínas motoras, que se deslocam ao longo dos filamentos de actina e microtúbulos. Isso faz do citoesqueleto um material ativo, que opera fora do equilíbrio termodinâmico (Guo *et al.*, 2014; Mizuno *et al.*, 2007). Apesar da complexidade da mecânica das células vivas, é possível razoavelmente modelar e aproximar a representação do citoesqueleto à de redes poliméricas (Pegoraro; Janmey; Weitz, 2017). Para o conceito de cisalhamento em redes de biopolímeros, podemos medir a tensão mecânica (σ) e extrairmos, a partir de curvas de resposta imediata e retardada, o módulo elástico (G') e o viscoso (G'') (Figura 16).

Figura 16 – Parâmetros da reologia de redes de biopolímeros: G' e G'' .



Os parâmetros utilizados e as grandezas avaliadas no estudo da reologia de redes de biopolímeros incluem o módulo de elasticidade (G'), que representa a resposta elástica, e o módulo de viscosidade (G''), que corresponde à resposta viscosa. O comportamento viscoelástico dos biopolímeros torna os dois parâmetros relevantes. Fonte: Adaptado de (Pegoraro; Janmey; Weitz, 2017).

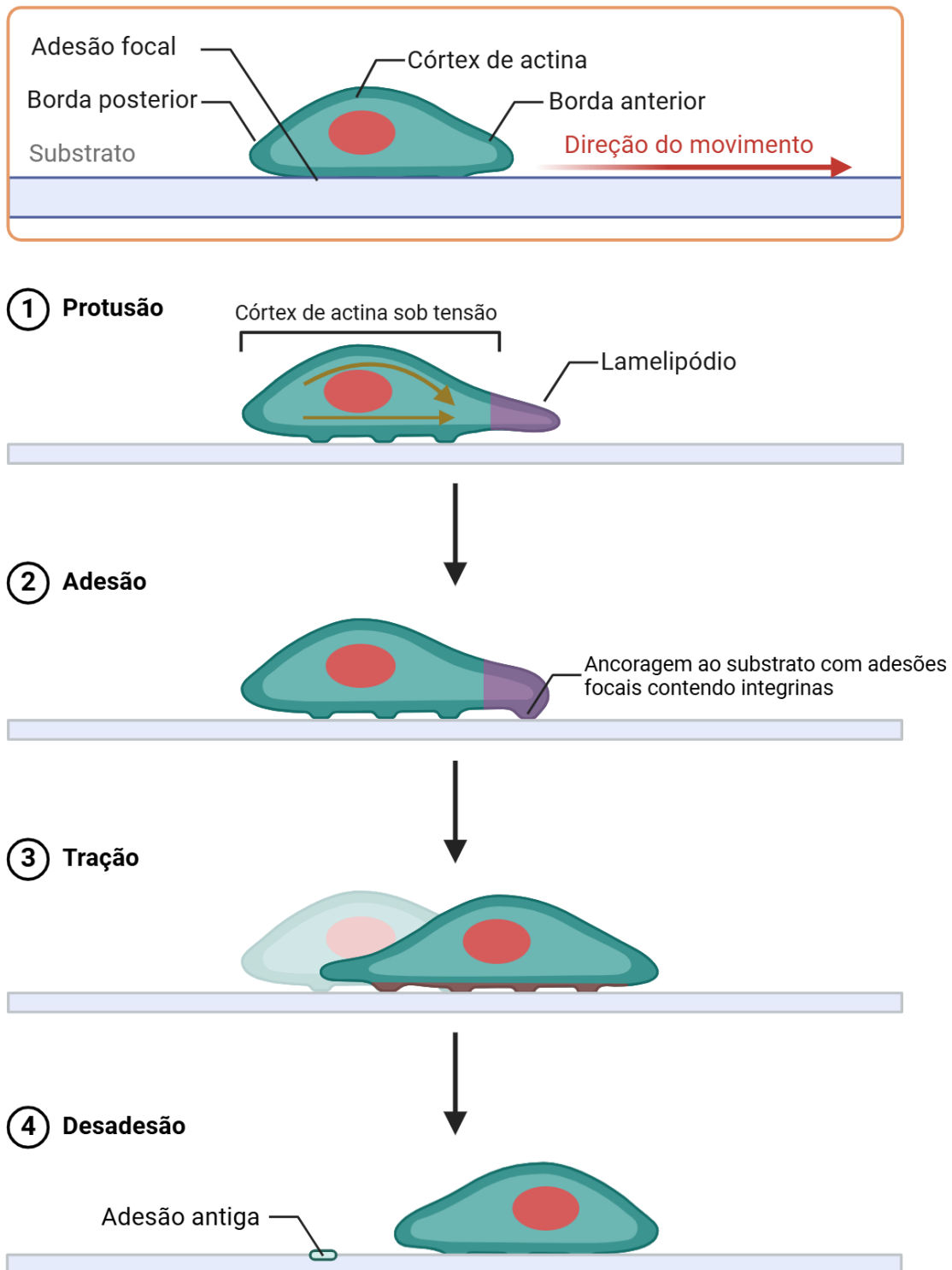
2.6 Migração celular

A migração celular, típica de células como fibroblastos, neutrófilos e queratinócitos, ocorre por meio de translação sobre um substrato, utilizando protrusões, como lamelipódios e filopódios, a partir do rearranjo dos filamentos de actina do citoesqueleto (Alberts *et al.*, 2017). A movimentação dos espermatozoides é uma exceção, pois é impulsionada pelo batimento do flagelo, que utiliza microtúbulos e o movimento gerado por proteínas motoras, como a dineína, para a impulsão necessária ao deslocamento em meios líquidos. Essa diferença mostra a funcionalidade estratégica do citoesqueleto para a locomoção celular, ajustada às necessidades específicas de cada tipo celular. A migração celular tem função central em diferentes processos biofísicos, como a cicatrização de feridas, resposta imune e metástase do câncer.

A migração celular decorre da polimerização/despolimerização ordenada dos filamentos proteicos do citoesqueleto, resultando em deformações da membrana celular (Figura 17). O deslocamento celular pode ser dividido em três etapas principais: a protrusão, na qual parte da membrana plasmática é estendida na direção do movimento; a adesão, em que a região projetada da membrana adere ao substrato por interações moleculares específicas; e, por fim, a tração, em que a célula se move em direção ao ponto de ancoragem estabelecido no substrato.

A migração celular é um processo complexo que depende do córtex de actina localizado abaixo da membrana plasmática. O emaranhado de conexões filamentosas modifica pontualmente as características biomecânicas ao longo da membrana plasmática, na medida em que esta se molda às organelas que ela protege e sofre forças em decorrência do processo de migração.

Figura 17 – Forças geradas no córtex de actina durante a migração celular.



Demonstração de como as forças geradas no córtex de actina impulsionam o avanço celular. A rede de actina impulsiona a extensão da membrana plasmática na direção do movimento, enquanto a célula se fixa ao substrato por meio de estruturas de adesão. Simultaneamente, a região posterior da célula sofre contração, promovendo o deslocamento geral. Fonte: Elaborada pelo autor no Biorender.

2.7 Breve introdução à reologia

A reologia é uma área da ciência que estuda as propriedades mecânicas dos materiais sob deformação devido a forças externas (Shen; Michaelson; Huang, 2013). Podemos classificar um material conforme este responde (deforma) à medida que uma tensão é aplicada. Em regra, para uma pequena deformação, se considerarmos uma força proporcionalmente pequena, o sólido tende a voltar à sua geometria inicial quando a tensão é cessada. Dizemos, neste caso, que houve uma deformação elástica e que o fenômeno ocorreu dentro do regime elástico, isto é, de acordo com a lei de Hooke. Quando consideramos um fluido viscoso, se a taxa de deformação for diretamente proporcional à tensão aplicada, dizemos que esse fluido é do tipo newtoniano. Em caso contrário – quando a tensão de cisalhamento não é diretamente proporcional à taxa de deformação – o fluido é não newtoniano.

A caracterização do comportamento de materiais em geral exige a análise de suas respostas em relação às escalas de tempos características de aplicação da força e da deformação. Define-se um parâmetro de tempo de relaxamento, representado por t_{rel} , e um parâmetro relacionado ao tempo de deformação, designado por t_{def} . A razão entre esses parâmetros define o chamado Número de Deborah (Reiner, 1964), que descreve o comportamento reológico do material e a dependência temporal do comportamento viscoelástico:

$$De = \frac{t_{rel}}{t_{def}} \quad (2.7)$$

O número de Deborah pode ser aplicado para descrever o comportamento de materiais viscoelásticos em diferentes contextos. Por exemplo, ao pressionar ou esticar um gel, ele retorna lentamente à forma original depois que a força é removida. Neste caso, o tempo de relaxação do material t_{rel} é comparável ou maior que o tempo de observação t_{def} , resultando em um número de Deborah elevado, o que indica um comportamento predominantemente elástico. Já uma massa de modelar apresenta comportamento diferente. Quando pressionada lentamente (tempo de deformação t_{def} muito maior que t_{rel}), o número de Deborah é pequeno, e o material flui como um líquido. No entanto, se a mesma força for aplicada rapidamente (tempo de deformação pequeno), o número de Deborah aumenta e o material pode reagir como se fosse sólido por um curto período, ou seja, com comportamento elástico transitório.

Tecidos biológicos, como cartilagem ou o citoesqueleto celular, apresentam comportamento viscoelástico (De Sousa *et al.*, 2020). Quando deformados rapidamente,

reagem como sólidos elásticos; quando comprimidos lentamente, fluem como líquidos. O De pode ser ajustado dependendo do tempo característico do processo de deformação em relação ao tempo de relaxação do tecido.

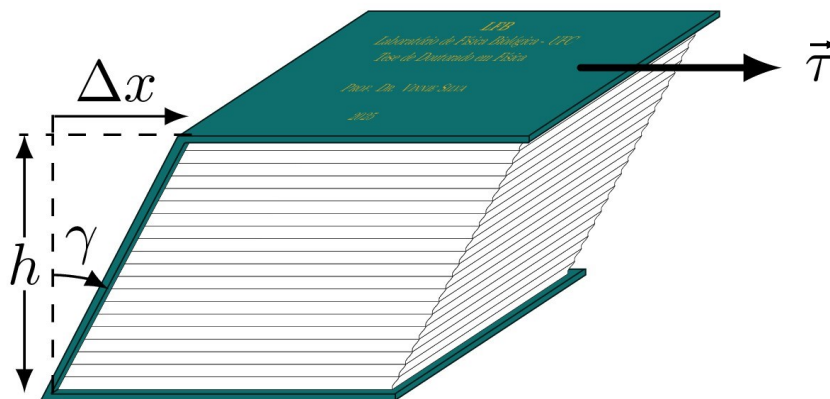
No contexto dos modelos clássicos de sólido e fluido, os conceitos de tensão, deformação e fluxo apresentam consequências importantes na biologia celular. Em FBM, por exemplo, a absorção de luz vermelha pode alterar o metabolismo, além das propriedades mecânicas do citoesqueleto (Silva *et al.*, 2025). Assim como Newton formalizou o cisalhamento em fluidos, os avanços em microscopia de força atômica – aliado ao modelo viscoelástico adequado – permitem quantificar como células vivas suportam e transmitem tensões internas em resposta a estímulos físicos e luminosos (Silva *et al.*, 2025). Conceitos de mecânica clássica e de biomecânica celular fornecem teoria para a análise proteômica e viscoelástica, servindo como ferramenta para a discussão subsequente.

Sólidos ideais, quando submetidos a tensões de cisalhamento, respondem com uma deformação característica ilustrada na Figura 18.

$$\tau = E \cdot \frac{dx}{dh} = E \cdot \tan \gamma \approx E \cdot \gamma \quad (2.8)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento aplicada, E é o módulo elástico do material, dx/dh representa a razão entre deslocamento e altura, e γ é o ângulo de cisalhamento (deformação). Para pequenos ângulos, vale a aproximação $E \cdot \tan \gamma \approx E \cdot \gamma$.

Figura 18 – Deformação de um corpo sólido sob a aplicação de uma tensão τ .



Fonte: Elaborada pelo autor.

Isaac Newton foi pioneiro na descrição do comportamento de fluxo de um líquido ideal. Esse comportamento é bem exemplificado pelo escoamento de Couette, em que um fluido newtoniano é confinado entre duas placas paralelas – uma fixa e outra em movimento – e submetido a uma tensão de cisalhamento. Em regime laminar o escoamento de Couette apresenta um perfil de velocidade aproximadamente linear: a velocidade é máxima junto à placa móvel e decresce linearmente até atingir zero na placa em contato com a placa fixa. O gradiente de velocidade resultante, dv/dh , define a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$); para fluidos newtonianos a tensão de cisalhamento τ é proporcional a essa taxa, isto é,

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dh} \quad (2.9)$$

Dessa forma, tem-se que:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{dl/dh}{dt} = \frac{dl/dt}{dh} = \frac{dv}{dh} \quad (2.10)$$

Logo, a tensão de cisalhamento pode ser escrita como:

$$\tau = \eta \frac{dv}{dh} = \eta \dot{\gamma} \quad (2.11)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento, η é a viscosidade e $\dot{\gamma}$ taxa de cisalhamento.

Sobre os termos utilizados, a deformação (γ) refere-se à mudança geométrica relativa sofrida por um corpo ou elemento material sob a ação de uma carga – trata-se de uma grandeza adimensional que quantifica um estado de distorção. Por outro lado, taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) é a derivada temporal da deformação, com unidades de s^{-1} , e descreve a velocidade com que esse estado de deformação varia no tempo; no escoamento de Couette tem-se $\dot{\gamma} = \frac{dv}{dh}$, relacionando o gradiente de velocidade ao processo de deformação. Para fluidos newtonianos, a tensão de cisalhamento τ é linearmente proporcional à taxa de deformação, $\tau = \eta \dot{\gamma}$, sendo η a viscosidade dinâmica. Em contraste, sólidos elásticos exibem relação entre tensão e deformação (estado), enquanto materiais viscoelásticos combinam dependências de deformação e de sua taxa.

Essa distinção é fundamental para interpretar medições experimentais: técnicas como a microscopia de força atômica são sensíveis tanto a propriedades instantâneas (por exemplo, rigidez/módulo elástico) quanto a respostas temporais (relaxação, viscosidade aparente), dependendo do protocolo adotado. Assim, as equações newtonianas fornecem um referencial físico simples, mensurável e adequado como ponto de partida para quantificar e

comparar desvios viscoelásticos e não lineares observados em materiais biológicos e células.

2.8 Microscopia de força atômica

Os fundamentos da reologia ajudam na compreensão das propriedades mecânicas de substâncias complexas, como fluidos biológicos, géis e tecidos vivos. Mas tal complexidade contribuiu para o desenvolvimento da microrreologia, uma extensão da reologia tradicional, com enfoque em escalas microscópicas, permitindo avaliar as respostas viscoelásticas de materiais macios submetidos a pequenas forças ($\sim 10^{-9}$ N).

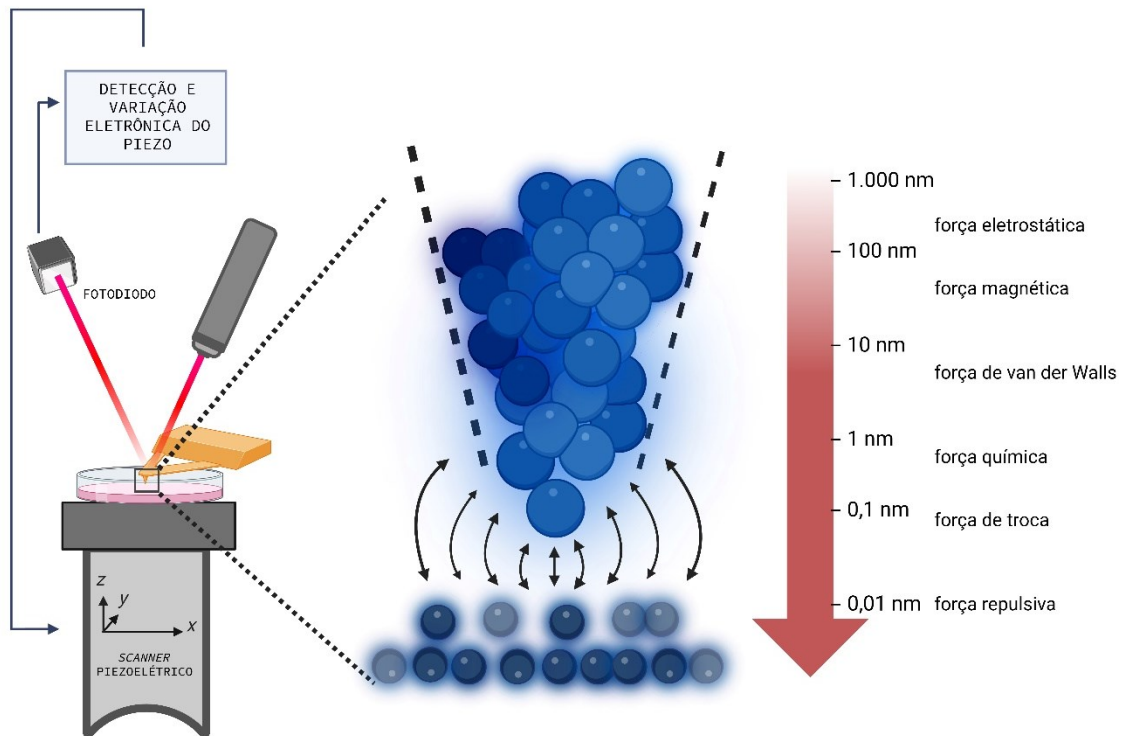
Nesse contexto, o microscópio de força atômica (AFM) destaca-se como uma importante ferramenta para a obtenção de parâmetros como viscosidade, elasticidade e comportamento de relaxamento, essenciais para estudar estruturas e dinâmicas moleculares em sistemas biológicos. É possível mapeamento com alta precisão das propriedades mecânicas locais de uma amostra, aplicando forças controladas, gerando curvas força-deslocamento, que revelam informações detalhadas sobre a rigidez, a elasticidade e a dinâmica do material.

A técnica de microscopia de força atômica baseia-se na interação entre uma sonda (*cantilever*) e a superfície de uma amostra (Binnig; Quate; Gerber, 1986). O AFM utiliza um braço de alavanca flexível (*cantilever*) preso a um substrato em uma extremidade e, na outra, possui uma ponta normalmente piramidal para varrer a superfície da amostra. Durante essa interação, forças intermoleculares, como as de van der Waals, adesivas e mecânicas, causam deflexões no *cantilever*. Essas deflexões são detectadas com alta precisão por um feixe de laser que, ao ser refletido na superfície do *cantilever*, incide sobre um fotodetector (fotodiodo). As variações no sinal do fotodiodo permitem que o sistema converta essas informações em mapas topográficos ou mecânicos.

Para garantir a precisão da interação, uma cerâmica piezoelétrica ajusta a posição da sonda conforme as variações da superfície por meio de tensões elétricas. Esse sistema permite que o movimento do piezo seja calibrado para compensar as oscilações do *cantilever* e garantir um mapeamento eficiente da topografia da amostra.

A Figura 19 ilustra o funcionamento básico do AFM. Ao se aproximar da superfície, forças de interação entre ponta e superfície passam a atuar, influenciando o comportamento do *cantilever*. As oscilações resultantes são detectadas pelo sistema óptico e interpretadas pelo sistema de controle, que as traduz em informações sobre a rugosidade e outras propriedades da superfície.

Figura 19 – Forças envolvidas no funcionamento do AFM.

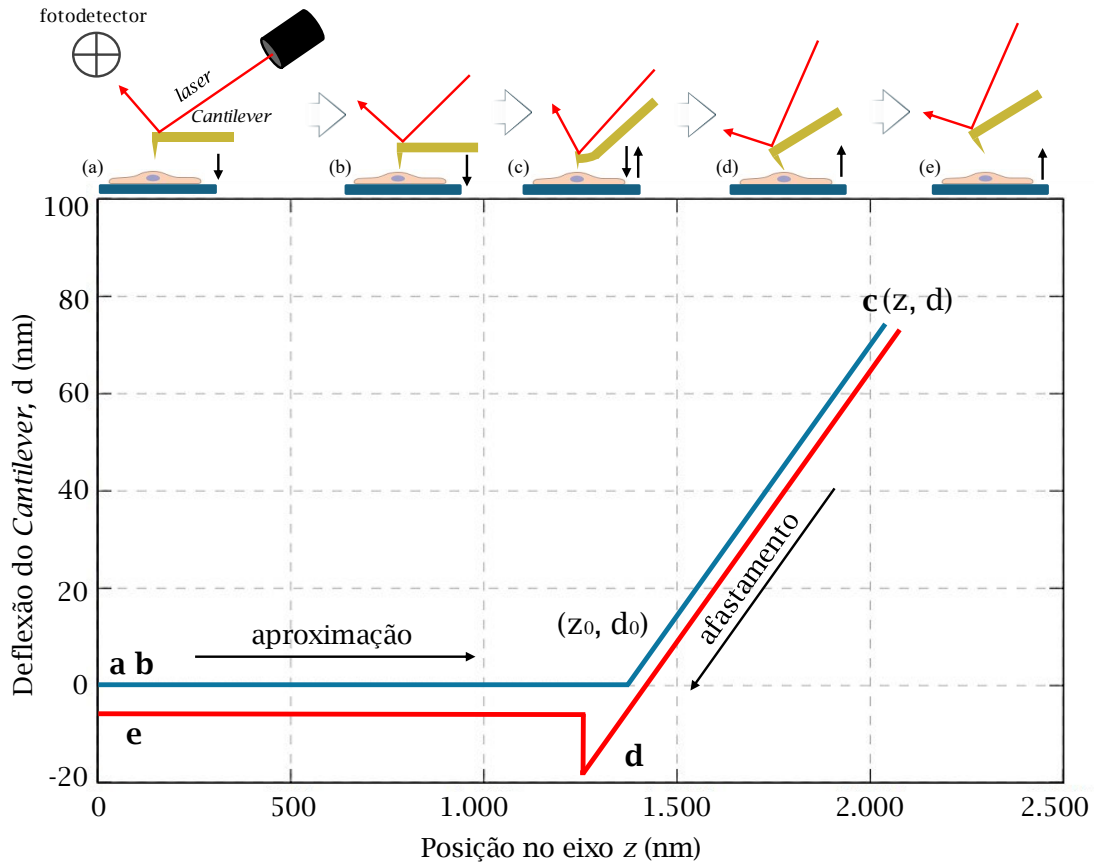


A ponta acoplada a um *cantilever* mapeia as propriedades físicas da superfície em escala nanométrica. Um scanner piezoelétrico controla o movimento preciso em três dimensões (X, Y e Z), enquanto um feixe de laser refletido do *cantilever* é detectado por um fotodiodo, que detecta as deflexões causadas pelas forças interatômicas. Estas informações são convertidas em imagens topográficas. As forças de interação variam com a distância entre a ponta e a superfície. Este sistema permite análises precisas da morfologia e das propriedades das superfícies, sendo essencial em estudos que envolvem caracterização em escala nanométrica. Fonte: Elaborada pelo autor no BioRender.

Para a correta interpretação das curvas força-deformação obtidas no AFM, é necessário entender como o material responde a tensões normais e de cisalhamento. A Figura 20 mostra o processo de aproximação, aplicação da força pela ponta do AFM e retração do *cantilever*.

As curvas resultantes da aproximação e retração são ilustrativas e as regiões “b” e “d” indicadas na figura tendem a ser suaves. No contato da ponta do cantilever com a superfície da amostra, a microscopia de força atômica permite obter uma curva de força, que fornece informações detalhadas sobre as características estruturais do material analisado. As regiões “b” e “d” da Figura 20 são consideradas críticas, pois representam os pontos de contato e desprendimento com a superfície da amostra. Essas informações são importantes para os dados de entrada sobre o perfil da curva de força.

Figura 20 – Indentação realizada pelo AFM e interpretação da curva de força.

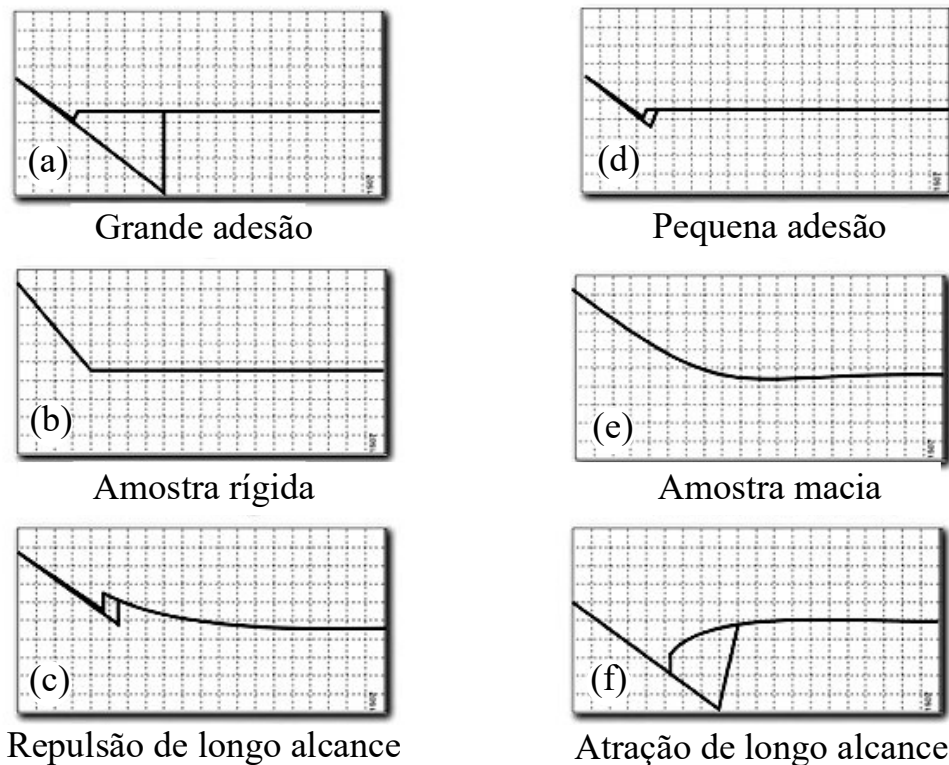


O painel superior ilustra o movimento do *cantilever* do AFM, controlado pelo *scanner* piezoelétrico. O processo inicia no ponto **a**, com o *cantilever* posicionado acima da amostra. À medida que o *cantilever* se aproxima da superfície, a indentação da amostra permanece nula até o ponto **b** (z_0, d_0), que marca o início do contato entre a ponta do *cantilever* e a célula. Este ponto é crítico – a curva é ilustrativa e ideal – para a análise de dados, pois, em regra, é uma região suavizada e o ponto de contato escolhido é crucial. No intervalo entre **b** e **c**, o *cantilever* está indentando a célula, sendo a deflexão proporcional à força aplicada. A deflexão máxima é atingida em **c**, quando a força de indentação predeterminada (definida pela constante de mola do *cantilever*) é alcançada. Após isso, o *cantilever* é retraído da amostra, passando pelo ponto **d**, onde ocorre frequentemente uma deflexão negativa devido à adesão entre a ponta e a célula, até que o *cantilever* se desprenda completamente da amostra e retorne à posição inicial no ponto **e**. Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível obter diferentes perfis de curvas de força em experimentos de AFM. A interação entre a ponta da sonda e a superfície da amostra varia de acordo com a distância, exibindo características viscoelásticas específicas da amostra ou dessa interação. A Figura 21 ilustra diferentes curvas de força, desde interações com grande adesão (Fig. 21(a)) até indentações em amostras qualitativamente macias (Fig. 21(e)). Essas curvas típicas são amplamente utilizadas para caracterizar diferentes propriedades físicas e químicas de materiais, incluindo a presença de interações de longo alcance (Fig. 21(c,f)).

No específico de assinaturas mecânicas nas curvas de força, uma amostra rígida apresenta um comportamento linear com ponto de contorno bem definido (Fig. 21b), o que indica alta resistência mecânica e pouca deformação. Já na amostra macia (Fig. 21(e)), a curva exibe crescimento gradual (suave), evidenciando uma maior deformação da superfície devido à sua maciez. Essa característica é comum em materiais viscoelásticos e/ou biológicos.

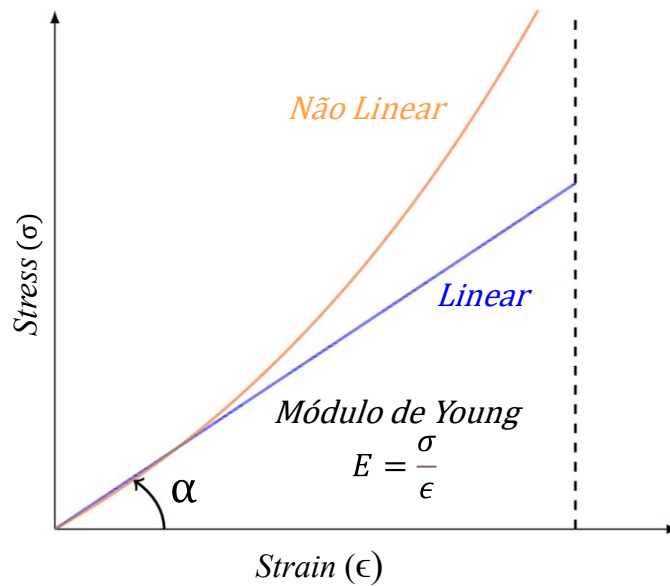
Figura 21 – Perfis de curvas de força obtidos por microscopia de força atômica.



As interações entre a ponta do *cantilever* e a superfície da amostra incluem adesão grande e pequena, resposta de amostras rígidas e macias, além de forças de longo alcance, tanto atrativas quanto repulsivas. Esses perfis possibilitam a análise quantitativa ou qualitativa detalhadas das propriedades mecânicas e químicas dos materiais estudados. Fonte: Adaptado de (Digital Instruments VMG, 1999).

A versatilidade do AFM, especialmente em adaptações da geometria de contato com a superfície e o desenvolvimento de modelos matemáticos, permite estudar estruturas pequenas e complexas de células e suas subestruturas. No processo de indentação, a deflexão do *cantilever* ocorre de acordo com a tensão aplicada na região atingida. Há regiões mais rígidas e outras mais macias. A relação entre o *stress* aplicado e o *strain* fornece uma importante propriedade mecânica chamada módulo de Young (ver Figura 22).

Figura 22 – Diagrama *stress* versus *strain*. A inclinação fornece o módulo de Young.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados obtidos podem ser interpretados utilizando modelos teóricos apropriados – por exemplo, modelos viscoelásticos (como Kelvin-Voigt) ou modelos de mecânica de contato (como Hertz). O modelo de Hertz (1881) é usualmente empregado por sua simplicidade matemática para estimar propriedades mecânicas, como o módulo de elasticidade, sobretudo em medições por AFM em nanoescala (Thomas *et al.*, 2013). De forma mais precisa, aplica-se a família de soluções Hertz-Sneddon, isto é, a solução de Hertz para indentadores esféricos ($F \propto \delta^{3/2}$) e as soluções de Sneddon (1965) para indentadores assimétricos (por exemplo, cônico, disco – $F \propto \delta^2$ para cone), devendo a escolha da expressão depender da geometria real da ponta do AFM. Contudo, a aplicação desses modelos exige a explicitação das hipóteses subjacentes: comportamento elástico linear local, pequenas deformações, ausência de adesão ou atrito no contato e geometria do indentador bem definida (esférica, cônica ou plana). Além disso, a profundidade de indentação deve ser pequena em relação às dimensões características do sistema (evitando influência do substrato) e é habitual assumir um valor para o coeficiente de Poisson ao extrair E . Modelos como o de Kelvin-Voigt são mais adequados para descrever respostas dependentes do tempo (viscoelasticidade) e podem ser preferidos quando os protocolos experimentais (indentação dinâmica, ensaios de relaxação/creep) evidenciam efeitos temporais relevantes (Rico *et al.*, 2005).

A deformação entre dois corpos depende da força aplicada entre eles, da velocidade de carga, da modulação de força dinâmica (Sousa *et al.*, 2017) e do tempo de contato (Lima *et*

al., 2024), além da geometria do indentador. Quando se considera uma ponta cônica no AFM, as equações a seguir, baseadas no modelo de Sneddon, podem ser aplicadas (Santos *et al.*, 2012):

$$F_{el} = K_c(d - d_0) \quad (2.12)$$

$$F_{Hertz} = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan(\alpha) \delta^2 \quad (2.13)$$

$$\delta = (z_0 - z) - (d - d_0) \quad (2.14)$$

$$slope = \frac{dF}{d\delta^2} = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \tan(\alpha) \quad (2.15)$$

$$E = \frac{\pi}{2} \frac{1-\nu^2}{\tan(\alpha)} slope \quad (2.16)$$

onde F_{el} representa a força de indentação aplicada pelo indentador; K_c é a rigidez do cantilever (haste) do AFM, ou seja, a constante de mola da ponteira; d é o deslocamento vertical do cantilever, enquanto d_0 indica a posição de contato inicial entre a ponta e a superfície; δ é a profundidade de indentação, que quantifica a deformação elástica efetiva da amostra; E corresponde ao módulo de Young da amostra e ν ao coeficiente de Poisson, que descreve a deformação lateral relativa à deformação axial (adimensional); α é o semi-ângulo da ponta cônica do indentador, enquanto z_0 identifica a posição do pico de força (o ponto em que o indentador atinge a máxima aproximação ou “para”) e z a posição do indentador em relação à amostra. Por fim, o termo *slope* refere-se à inclinação da porção de descarga (retração) da curva força \times deslocamento.

A função de relaxamento viscoelástico temporal das células desta Tese foi descrita por uma lei de potência única (*single power-law*, SPL) (De Sousa *et al.*, 2020; Garcia; Guerrero; Garcia, 2020; Hecht *et al.*, 2015). A opção por esse formalismo decorre de razões práticas e conceituais. A SPL representa eficientemente uma ampla distribuição de tempos de relaxação, típicos de materiais biológicos ativos, evitando a necessidade de somas extensas de exponenciais, reduzindo o número de parâmetros de ajustes. Além disso, produz parâmetros compactos e comparáveis entre diferentes condições experimentais, facilitando, por exemplo, a correlação entre mudanças nas propriedades mecânicas e sinais proteômicos (De Sousa *et al.*, 2020; Garcia; Guerrero; Garcia, 2020). Portanto, as interpretações devem ser confrontadas com

dados complementares, como ensaios temporais adicionais, imagens e análises proteômicas, para que hipóteses acerca dos processos microestruturais subjacentes possam ser formuladas (Balland *et al.*, 2006; De Sousa *et al.*, 2021). Logo, a função de relaxamento viscoelástico no domínio do tempo das células foi modelada por:

$$E(t) = E(t') \left(\frac{t}{t'} \right)^{-\beta}, \quad (2.17)$$

em que $E(t')$ representa o módulo de elasticidade em um tempo arbitrário $t = t'$, e β é o expoente de fluidez, que varia dentro do intervalo $0 \leq \beta \leq 1$.

Quando $\beta = 0$, o material exibe um comportamento perfeitamente elástico, ou seja, ele não se deforma permanentemente quando submetido a uma força. Em contrapartida, $\beta = 1$ caracteriza um comportamento completamente fluido, com uma deformação instantânea e irreversível sob a aplicação de uma força. Valores intermediários de β indicam um material que possui características tanto sólidas quanto fluídas, podendo ser descrito como um material viscoelástico, em que há uma combinação de resistência à deformação (elasticidade) e capacidade de fluir (fluidez).

O módulo de cisalhamento complexo dinâmico no domínio da frequência, representado por $G^* = G' + iG''$, onde G' é o módulo de armazenamento (que descreve a parte elástica) e G'' é o módulo de perda (que descreve a parte viscosa), é dado pela equação $G^*(f) = G^*(f_0) \left(\frac{f}{f_0} \right)^\beta$, com f_0 sendo uma frequência de escala arbitrária. Para $G^*(f_0)$, temos a expressão $G^*(f_0) = \Gamma(1 - \beta)E(t')t'^\beta(2\pi f_0 i)^\beta$, onde Γ é a função gama. No modelo SPL, o ângulo de fase entre G' e G'' permanece constante, e é dado por $\theta = \tan^{-1} \left(\frac{G''}{G'} \right) = \beta\pi/2$. Em particular, quando $\beta = 0,5$, o material apresenta uma combinação equilibrada de comportamento sólido e fluido, o que é frequentemente encontrado em materiais viscoelásticos com propriedades intermediárias.

Esse modelo é importante para descrever e entender o comportamento de uma ampla gama de materiais biológicos e sintéticos, incluindo células e tecidos, nos quais tanto a elasticidade quanto a fluidez podem influenciar as respostas mecânicas ao estresse ou à deformação. A curva de força de permanência (DFC) para materiais que seguem um modelo de lei de potência única permite uma caracterização precisa da resposta mecânica do material ao longo do tempo, o que é fundamental em diversos estudos, como na análise de propriedades de células sob estresse ou em testes de mecânica de materiais (De Sousa *et al.*, 2021). Assim,

$$F(t) = \begin{cases} F_\beta(t) & 0 \leq t \leq t_l, \\ F_\beta(t)I\left(\frac{t_l}{t}, 2, 1 - \beta\right) & t > t_l, \end{cases} \quad (2.18)$$

onde

$$F_\beta(t) = \frac{4}{\pi} = \frac{\tan \theta}{(1-\nu^2)} \delta_0^2 B(2, 1 - \beta) E(t_l) \left(\frac{t}{t_l}\right)^{2-\beta}. \quad (2.19)$$

O tempo t é medido a partir do ponto de contato, enquanto t_l representa o tempo de carregamento, que é o intervalo durante o qual a força é aplicada ao material. A profundidade máxima de indentação é dada por δ_0 , enquanto o ângulo de meia abertura do indentador cônico, denominado θ , influencia diretamente a distribuição de forças na célula ou material. Para amostras incompressíveis, assume-se que o coeficiente de Poisson é igual a 0,5, o que simplifica os cálculos de deformação.

A função de relaxamento, $E(t_l)$, é calculada no tempo $t = t_l$, refletindo a resposta viscoelástica do material à carga aplicada. A função beta incompleta, representada por $B(x; n, m)$, descreve uma distribuição que depende dos parâmetros n e m e está relacionada à função beta completa por $B(n, m) = B(1; n, m)$. A função beta regularizada incompleta, chamada de $I(x; n, m)$, é dada por $I(x; n, m) = \frac{B(x; n, m)}{B(n, m)}$, e permite a normalização dos resultados dentro de um intervalo específico.

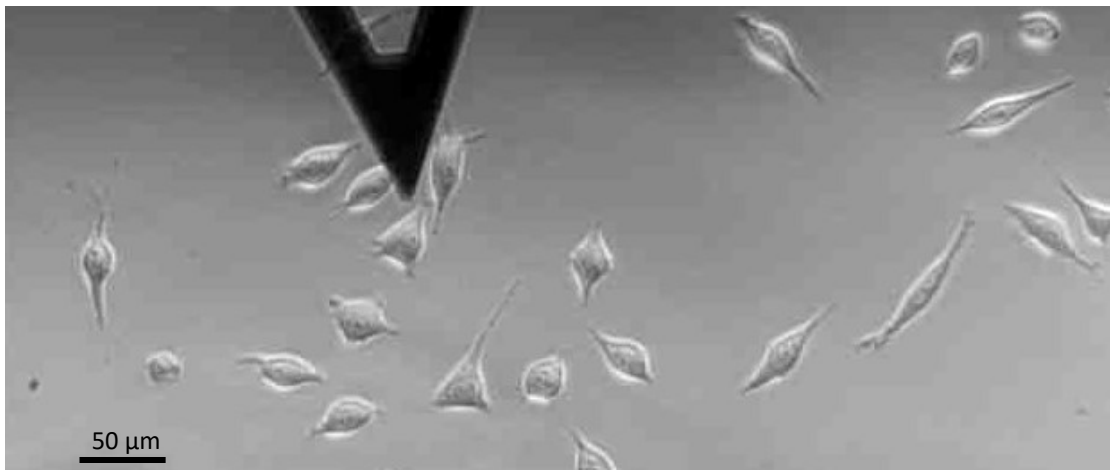
Os parâmetros t_l e δ_0 são extraídos diretamente das curvas de força obtidas por meio da microscopia de força atômica (AFM), que fornece uma maneira precisa de medir as propriedades mecânicas dos materiais em uma escala micrométrica. Esses dados são fundamentais para a caracterização das respostas mecânicas e viscoelásticas, como o comportamento de células biológicas sob estresse mecânico ou a análise de materiais sintéticos em diferentes condições experimentais.

2.9 Linhagens celulares

Nosso estudo utilizou seis linhagens celulares distintas: (i) fibroblastos murinos L929, empregados como modelo de remodelamento da matriz extracelular; (ii) osteoblastos murinos OFCOL II, precursores ósseos responsáveis pela síntese de colágeno e mineralização; (iii) queratinócitos humanos HaCaT, epiteliais imortalizados, atuam na barreira dérmica e processos de cicatrização; (iv) osteossarcoma humano MG-63, de alta proliferação, podendo

ser usada para efeito comparativo à linhagem OFCOL II; (v) mioblastos murinos C2C12, capazes de se diferenciar em miotubos, normalmente são usados para explorar mecanismos de sinalização na regeneração muscular; (vi) macrófagos murinos RAW 264.7, células fagocíticas, viabilizam o estudo de respostas inflamatórias e potenciais efeitos anti-inflamatórios da terapia luminosa.

Figura 23 – Fibroblastos L929 no AFM.



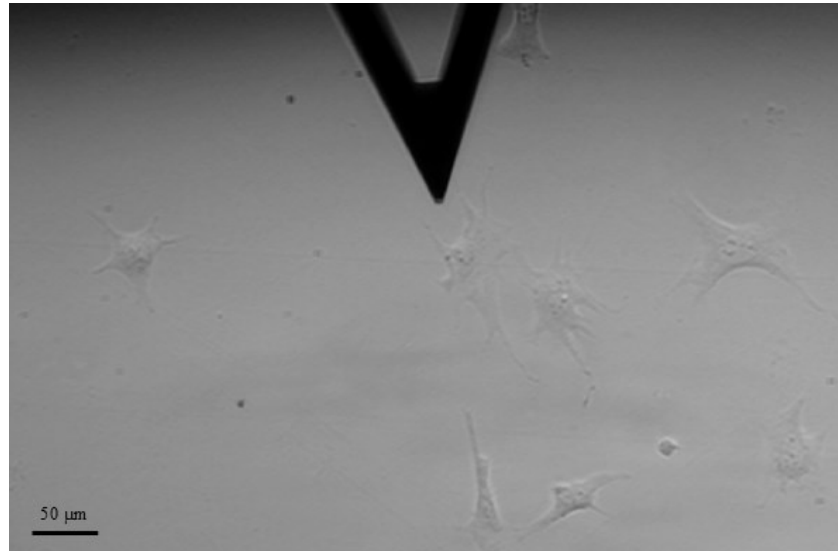
A imagem mostra o *cantilever* do AFM e a morfologia típica de células mesenquimais, caracterizada por um formato fusiforme ou alongado, com projeções citoplasmáticas que se estendem em várias direções. Fonte: Elaborada pelo autor.

Com síntese e função heterogêneas, os fibroblastos participam da codificação de informações posicionais para células vizinhas, através de propriedades microarquitetônicas, biomecânicas e bioquímicas na matriz extracelular; também regulam a secreção de mediadores solúveis, como citosinas, fatores de crescimento e metabólicos (Plikus *et al.*, 2021) e são encontrados em diversos órgãos, como pele, pulmão, músculos e coração. A Figura 23 mostra imagens das células de linhagem murina L929. Pela abrangente presença em diversos órgãos, os fibroblastos são parte importante na sustentação e consistência dos tecidos.

Os osteoblastos são células mononucleares do tecido conjuntivo, especificamente do tecido ósseo, e que são resultantes das células mesenquimatosas, a partir da diferenciação e proliferação de células-tronco mesenquimais (Tani *et al.*, 2018). Formam, com os osteócitos e os osteoclastos, as principais células do tecido ósseo, tendo como característica a intensa atividade metabólica, sendo responsáveis pela produção de compostos orgânicos da matriz óssea, como o colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanos (Kierszenbaum; Tres, 2012).

Neste trabalho utilizamos osteoblastos da linhagem OFCOL II (ver Figura 24), derivada de camundongo.

Figura 24 – Osteoblastos OFCOL II no AFM.



A morfologia é típica de células ósseas imaturas, com formato cuboidal ou poligonal quando em atividade, com citoplasma abundante e basofílico devido à síntese ativa de matriz extracelular. Fonte: Elaborada pelo autor.

As células osteoblásticas são originadas mais ativamente durante a fase de crescimento dos ossos e reparações de lesões ósseas, a partir do metabolismo mais acentuado das células osteoprogenitoras (Junqueira; Carneiro, 2013). Concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz (Montanari, 2016). São encontradas no endósteo e na superfície do osso periósteo, membrana que reveste o osso, participando da regeneração óssea após fraturas (Beck Jr., 2003). Com a redução da atividade sintética, os osteoblastos são envolvidos pela matriz óssea e tornam-se osteócitos, células maduras e pouco ativas, que estão em lacunas da matriz calcificada (Setiawati; Rahardjo, 2019; Schaffler *et al.*, 2014). Já os osteoclastos, células polinucleadas derivadas da medula óssea, atuam de forma oposta: enquanto os osteoblastos formam o osso, os osteoclastos o reabsorvem, sendo ambos essenciais para a remodelação óssea (Teti, 2012; Silvent *et al.*, 2013).

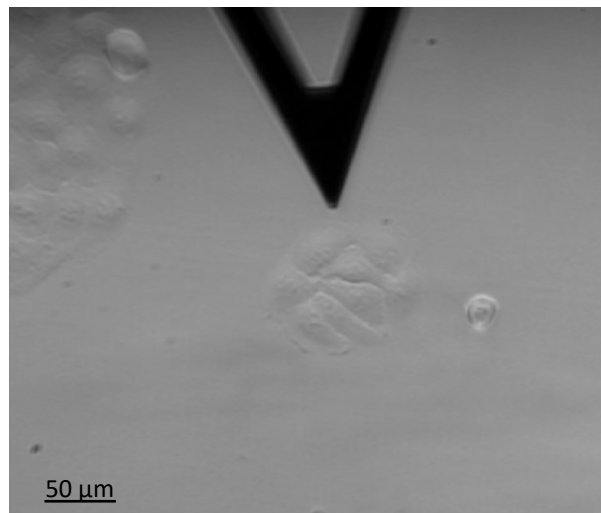
Os queratinócitos são fundamentais como barreira protetora, tendo papel na resposta imune inata, isto é, atuam na primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos invasores, oferecendo uma resposta imediata e de regulação da inflamação da pele (Cruvinel *et al.*, 2010) (Figura 25).

As células HaCaT são bastante estudadas para reparo tecidual e cicatrização de

feridas (Carretero *et al.*, 2008; De Fátima Goebel de Souza *et al.*, 2020), modelos para estudos de câncer de pele (Alvarez *et al.*, 2009; Berning *et al.*, 2015; Smits *et al.*, 2017), além de pesquisas sobre a resposta inflamatória da pele e estresse oxidativo (Jang *et al.*, 2015; Pastore *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011).

Comprimentos de onda na faixa de 400–1100 nm vêm demonstrando eficácia na aplicação às células epidérmicas como a HaCaT (Cios *et al.*, 2021; De Abreu *et al.*, 2019), com resultados importantes de cicatrização do tecido, redução de inflamação e efeitos de analgesia (Serrage *et al.*, 2019). Portanto, pelos mecanismos moleculares primários e secundários da FBM e na avaliação dos potenciais parâmetros eficazes para aplicação *in vitro* e *in vivo* em queratinócitos já relatados na literatura científica (De Abreu *et al.*, 2019), consideramos a linhagem HaCaT importante para compor o conjunto de ensaios realizados nesta Tese.

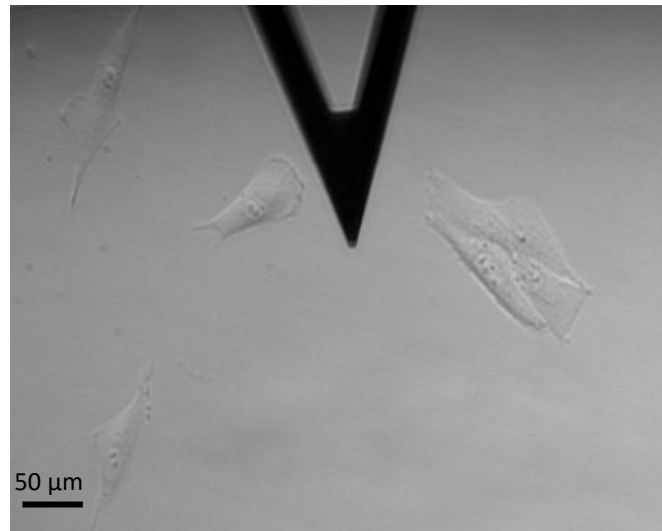
Figura 25 – Queratinócitos HaCaT no AFM.



Apresentam morfologia epitelial típica, caracterizada por um formato poligonal e citoplasma relativamente abundante. Essas células aderem firmemente ao substrato e, em cultura, crescem em camadas coesas, formando uma monocamada organizada. Fonte: Elaborada pelo autor.

A linhagem celular MG-63 (Figura 26), correspondente a um osteossarcoma humano (Billiau *et al.*, 1977), é amplamente utilizada principalmente em pesquisas relacionadas à biologia óssea, diferenciação de osteoblastos (Andrukhov *et al.*, 2016), mecanismos de sinalização celular (De Azevedo *et al.*, 2020) e biomateriais (Chang *et al.*, 2014; Rabel *et al.*, 2020). Devido à sua origem, essas células possuem rápida proliferação e comportamento tumoral, sendo indicadas para estudos de mecanismos de tratamentos oncológicos (Pautke *et al.*, 2004).

Figura 26 – Osteoblastos MG-63 no AFM.

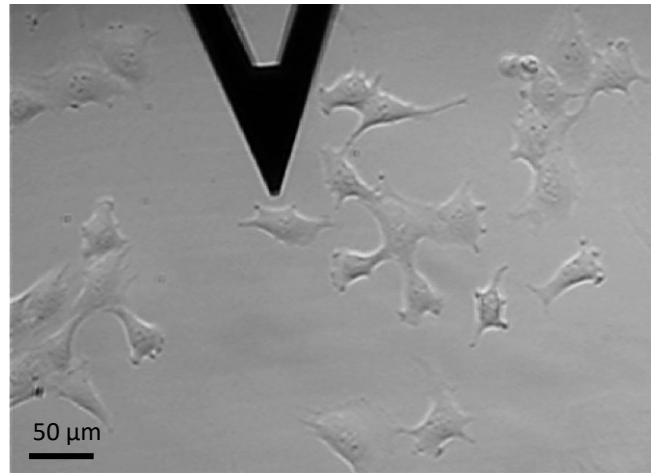


A morfologia é heterogênea, variando de fusiforme a poligonal, com citoplasma normalmente irregular. O núcleo é grande, oval ou arredondado, com cromatina dispersa e nucléolos evidentes, o que evidencia sua natureza tumoral. Fonte: Elaborada pelo autor.

A alta taxa de proliferação e o menor efeito de diferenciação em comparação com os osteoblastos normais tornam a MG-63 um bom modelo para estudos sobre proliferação celular e mecanismos de câncer ósseo (Hu *et al.*, 2022). A regeneração óssea, sinalização de citocinas, e o impacto de diferentes tratamentos no crescimento e diferenciação celular tornam as MG-63 uma importante linhagem no estudo do efeito de terapias fotodinâmicas e tratamentos com luz, especialmente em função de sua resposta diferencial a estímulos luminosos, o que pode ser relevante para o tratamento de tumores ósseos (Berni *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2024).

Os mioblastos são células precursoras e fazem parte do processo de formação do tecido muscular, a miogênese. A linhagem C2C12 (Figura 27) foi originalmente isolada de músculo esquelético de camundongos da linhagem C3H, após uma lesão induzida (Yaffe; Saxel, 1977). A C2C12 é bastante utilizada em pesquisas de biologia celular e molecular para estudar processos de diferenciação muscular, regeneração e metabolismo (Li *et al.*, 2023). Essas células têm a capacidade de se diferenciar em miotubos, simulando um ambiente similar ao tecido muscular esquelético (Burattini *et al.*, 2004). Devido à sua versatilidade, são usadas em pesquisas sobre sinalização celular, expressão gênica, e mecanismos de regeneração e desenvolvimento muscular (Bakhshandeh *et al.*, 2023; Miyazono, 2000).

Figura 27 – Mioblastos C2C12 no AFM.



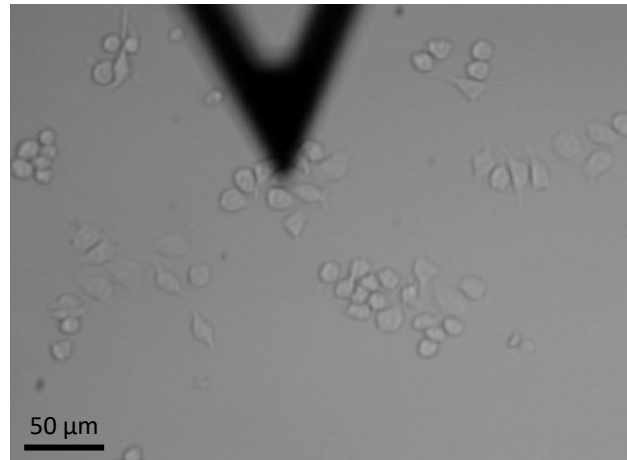
Quando em estado indiferenciado, apresentam morfologia alongada e fusiforme, caracterizando-se por citoplasma moderado e núcleo oval, central e com cromatina dispersa. Em cultura, essas células aderem bem ao substrato e crescem formando camadas homogêneas. Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido à ampla aplicabilidade dos mioblastos na área da cicatrização e processos de recuperação celular, a C2C12 é comumente objeto de estudo na fotobiomodulação, em função da redução da apoptose e necrose e da produção de citocinas, resultando em efeitos de citoproteção celular (Gouveia *et al.*, 2020). Gouveia *et al.* (2020) mostraram a efetividade da luz na diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Miotubos C2C12 respondem de forma similar à fotobiomodulação como ocorre em células fibroblásticas, ambas envolvidas na recuperação de tecidos, através do aumento do potencial da membrana mitocondrial e da síntese de ATP (Ferraresi *et al.*, 2015). Além disso, na C2C12 a aplicação da luz pode ter efeitos de modulação do metabolismo redox (De Marchi *et al.*, 2022).

Os macrófagos são células do sistema imune e que, portanto, atuam no combate a invasores, como bactérias e vírus. As principais funções envolvem a fagocitose, a secreção de substâncias, apresentação de antígenos e remoção de detritos (Alberts *et al.*, 2017). Utilizamos a linhagem RAW 264.7 (Figura 28), que são macrófagos murinos de um tumor induzido pelo vírus de Abelson em camundongos da linhagem BALB/c (Ralph; Nakoinz, 1975).

Figura 28 – Macrófagos RAW 264.7 no AFM.



A morfologia desses macrófagos varia de acordo com seu estado funcional. Em estado de repouso, eles são arredondados, mas, quando ativados, assumem formas mais alongadas e irregulares. Fonte: Elaborada pelo autor.

Por ser uma linhagem celular fácil de cultivar e manter em laboratório, são bastante estudadas, sendo bem caracterizadas, possuindo características fenotípicas e funcionais estáveis (Taciak *et al.*, 2018). Além disso, a RAW 264.7 pode se diferenciar em osteoclastos, sendo capaz de realizar remodelação óssea e desempenhando um papel crucial no estudo da osteoclastogênese (Alexander N. Orekhov *et al.*, 2019).

Já é bem estabelecida a utilização de macrófagos como a RAW 264.7 para explorar os efeitos inflamatórios e anti-inflamatórios e as vias de sinalização induzidas pela fotobiomodulação, sendo uma referência importante para pesquisas nessa área (Rahmannia *et al.*, 2022; Ahn *et al.*, 2014; Gavish *et al.*, 2008). Essa linhagem é comumente usada em diferentes estudos para avaliar os mecanismos de citotoxicidade e viabilidade de agentes externos (Kang *et al.*, 2022), do potencial anti-inflamatório por inflamação induzida (Tsoupras *et al.*, 2024) e efeito anti-inflamatório por reticulação de proteína (Wang *et al.*, 2020).

3 MATERIAIS E MÉTODOS⁴

Foi escolhido o intervalo de 12 horas após a irradiação para a realização dos experimentos subsequentes. Essa escolha fundamenta-se na dinâmica do ciclo celular em condições de cultura, cujo tempo médio é de aproximadamente 24 horas (Alberts *et al.*, 2017). Assim, o ponto intermediário de 12 horas permite avaliar alterações celulares em um momento em que ainda não predominam efeitos proliferativos decorrentes da fotobiomodulação, mas já é possível observar respostas funcionais precoces, como mudanças no metabolismo e na capacidade migratória (Rojas; Gonzalez-Lima, 2011).

A literatura aponta que a luz vermelha promove alterações mitocondriais imediatas, como o aumento na produção de ATP e a modulação de espécies reativas de oxigênio, que podem impactar diretamente processos associados à mobilidade celular nas primeiras horas após a irradiação (Karu, 2010, 2008). Além disso, estudos demonstram que a migração celular tende a aumentar significativamente entre 6 e 12 horas após a aplicação da luz, enquanto os efeitos proliferativos só se tornam evidentes em períodos mais longos, geralmente a partir de 24 horas (Eells *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2017). Dessa forma, a análise no interstício de 12 horas possibilita isolar de forma mais clara os efeitos iniciais relacionados à migração celular, o que minimiza a interferência dos processos proliferativos.

3.1 Cultura de células

As linhagens celulares (HaCaT – queratinócitos humanos; L929 – fibroblastos murinos; OFCOL II – osteoblastos murinos; MG-63 – osteossarcoma humano; C2C12 – mioblastos murinos; RAW 264.7 – macrófagos murinos), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco[®] – Thermo Fisher Scientific[®]) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI·mL⁻¹ e estreptomicina 100 µg·mL⁻¹; Sigma[®]). As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C, com umidade relativa de 95% e concentração de dióxido de carbono de 5%, sendo o crescimento monitorado em microscópio invertido de contraste de fase. A manutenção (subcultura) foi realizada duas vezes por semana em câmara de fluxo laminar vertical com nível de

⁴ Os protocolos experimentais descritos neste capítulo foram publicados, em língua inglesa, no seguinte artigo de autoria do próprio candidato: SILVA, A. V. S. *et al.* Biomechanical Insights into the Proteomic Profiling of Cells in Response to Red Light Absorption. *Small*, 2025. DOI: 10.1002/sml.202410062.

biossegurança II.

Para a semeadura, foi preparada uma suspensão celular com densidade ajustada para 1×10^5 células·mL⁻¹ em DMEM suplementado e o volume apropriado foi distribuído nas placas, ajustando-se o meio conforme o volume dos poços, de modo a obter uma camada celular uniforme com confluência superior a 80%.

O subcultivo foi efetuado quando as culturas atingiam 60-70% de confluência. As células RAW 264.7 foram desprendidas mecanicamente, enquanto as demais linhagens aderentes (HaCaT, L929, OFCOL II, C2C12, MG-63) foram dissociadas com 0,05% de tripsina-EDTA. Em frascos de 75 cm² (Kasvi), o protocolo padrão foi o seguinte: primeiro, o meio de cultura foi descartado e os frascos foram lavados duas vezes com PBS sem cálcio e magnésio para remover resíduos de soro. Em seguida, 2-3 mL de 0,05% de tripsina-EDTA foram adicionados e os frascos foram incubados a 37 °C por 3-5 minutos até o desprendimento das células. Depois, o volume adequado de DMEM contendo 10% de SFB foi utilizado para neutralizar a tripsina. Em seguida, a suspensão celular foi coletada, os frascos foram centrifugados a 1.200 rpm por 5 minutos, o *pellet* foi ressuspensão em DMEM suplementado, a contagem celular foi realizada e o volume foi ajustado para a densidade de semeadura desejada.

Todos os procedimentos de manipulação celular foram realizados em conformidade com as normas de biossegurança e em um ambiente apropriado para tais procedimentos.

3.2 Irradiação

Após a semeadura das linhagens, todas as placas foram incubadas *overnight* (37 °C, 5% CO₂) por 12 horas, quando as células já haviam aderido. Após esse período de incubação, as placas foram expostas à luz vermelha contínua ($\lambda = 633$ nm) com diferentes intensidades de irradiância (25 mW/cm² e 50 mW/cm²) e tempos de exposição (10 e 20 minutos). Após 12 horas do término da irradiação, os experimentos subsequentes foram conduzidos.

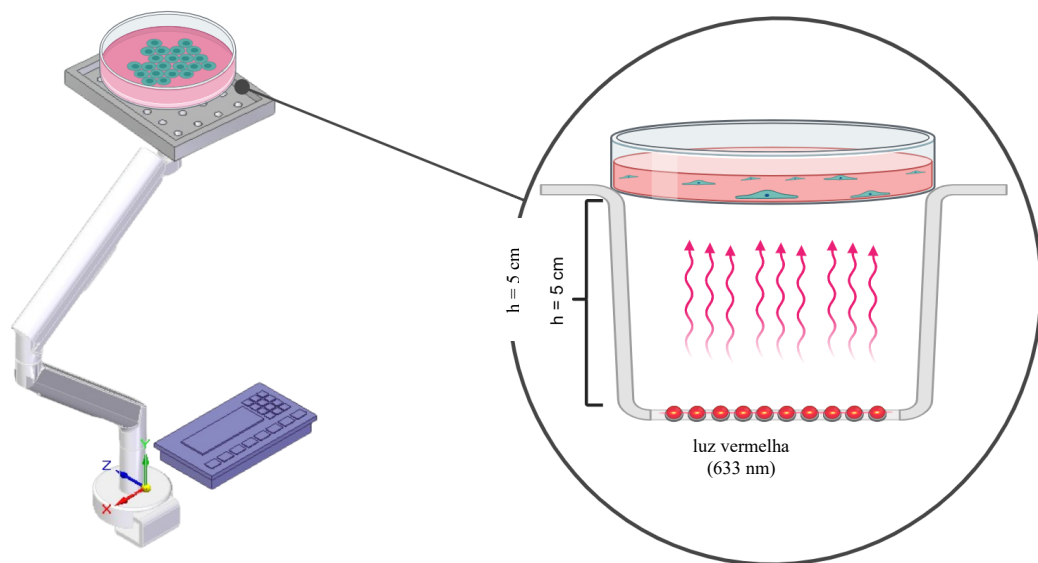
No total, foram avaliados cinco grupos experimentais: controle (CTRL, sem exposição à luz), IR25T10 (25 mW/cm² por 10 minutos), IR25T20 (25 mW/cm² por 20 minutos), IR50T10 (50 mW/cm² por 10 minutos) e IR50T20 (50 mW/cm² por 20 minutos). O grupo de controle foi submetido às mesmas manipulações dos grupos irradiados, exceto pela exposição à luz. A duração da irradiação em FBM geralmente varia entre alguns minutos até cerca de 20 minutos, dependendo do objetivo do tratamento e da intensidade da luz utilizada (Karu, 2008). Outros estudos citam tempos similares para avaliar os efeitos biológicos da luz vermelha, reforçando

que esses intervalos fazem parte de protocolos bem estabelecidos na área (Dompe *et al.*, 2020). Estudos sobre FBM consideram uma dose eficaz e livre de dano celular, sendo considerada eficiente para ativar processos bioquímicos e biofísicos mediadores como a citocromo c oxidase (Hamblin, 2017).

O dispositivo de irradiação consistiu em uma matriz quadrada contendo 100 LEDs, com espaçamento de 5 mm entre os emissores, garantindo uma iluminação homogênea em uma área de 25 cm² a uma distância de 5 cm dos LEDs. As potências de saída foram de 625 mW e 1250 mW para intensidades de 25 mW/cm² e 50 mW/cm², respectivamente. A Figura 29 mostra o esquema de aplicação da irradiação.

Quanto à densidade de energia aplicada, os grupos irradiados receberam 15 J/cm² (IR25T10), 30 J/cm² (IR25T20 e IR50T10) e 60 J/cm² (IR50T20), de acordo com o tempo e a intensidade da exposição.

Figura 29 – Esquema da aplicação de luz na placa de cultura.



Fonte: Elaborada pelo autor no BioRender.

3.3 Viabilidade celular e migração celular (*wound-healing assay*)

Os ensaios de viabilidade/proliferação foram realizados em placas de 96 poços, utilizando o kit AlamarBlue. Os tempos iniciais de exposição foram de 1, 5, 10, 15 e 20 minutos, além de intensidades de irradiação de 25 e 50 mW/cm². Esses intervalos menores foram testados

inicialmente para determinar se havia um limiar mínimo de intensidade e tempo de aplicação da luz capaz de provocar um efeito nas células. Com base nos resultados preliminares, optou-se por prosseguir com tempos de exposição de 10 e 20 minutos, além de um grupo controle. Os experimentos foram executados em replicatas e a pipetagem abrangeu todos os poços (todas as linhas e colunas), assegurando, de modo geral, um tamanho amostral adequado para as análises estatísticas.

O ensaio de cicatrização de feridas (também conhecido como *wound-healing assay* ou *scratch assay*) é um método simples e de baixo custo que simula a migração celular observada durante a cicatrização *in vivo*. É feita uma "ferida" (arranhão) em uma monocamada celular, capturam-se fotos da área inicial e, em seguida, são feitas imagens em intervalos regulares até o fechamento da ferida, o que permite quantificar a taxa de migração. Dessa forma, é possível estudar as interações célula-matriz e célula-célula, bem como variações que permitem rastrear a migração de células individuais na borda da ferida (Rodriguez; Wu; Guan, 2005). As células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ até atingirem confluência. Para evitar que a proliferação celular interferisse na análise da migração, foi adicionado mitomicina C (MMC, 5 µg/mL) em cada poço, seguida de uma incubação de 2 horas nas mesmas condições (Vang Mouritzen; Jenssen, 2018).

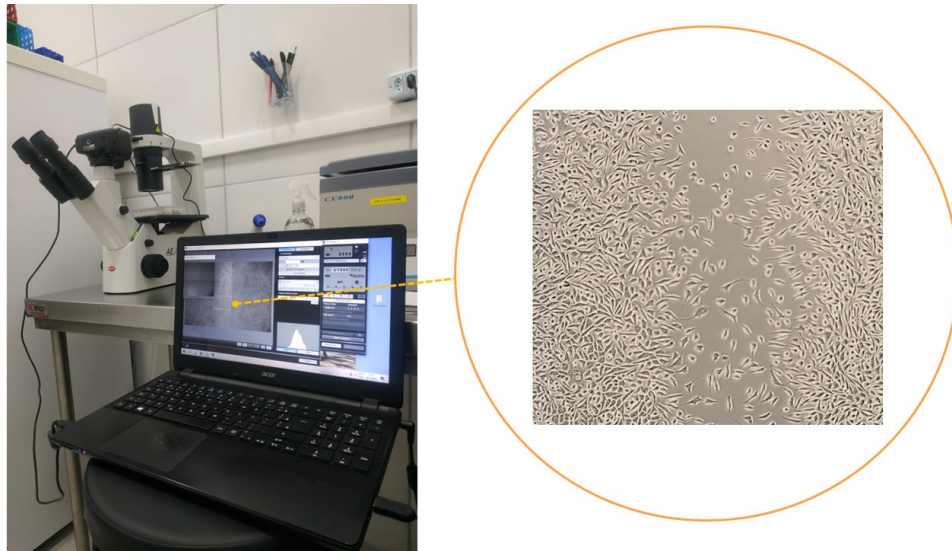
Após o período de tratamento, foi realizado um arranhão linear no *monolayer* celular utilizando uma ponteira estéril de 200 µL. As células deslocadas foram removidas por meio de lavagens sucessivas em PBS. Em seguida, foi adicionado 1 mL de DMEM a cada poço. Linhas horizontais de referência foram marcadas na base externa das placas com uma caneta de ponta fina para facilitar o alinhamento do campo de visão durante a captura das imagens.

As placas foram então levadas para análise em um microscópio invertido. Imagens das áreas de interesse foram adquiridas aos 0, 6, 12 e 24 horas após o arranhão (ver Figura 30). A área do arranhão foi determinada utilizando um plugin específico no software ImageJ (Suarez-Arnedo *et al.*, 2020). O percentual de fechamento do arranhão foi calculado conforme a equação 3.1.

$$\% \text{ Wound Closure} = \left(\frac{A_{t=0} - A_{t=\Delta t}}{A_{t=0}} \right) \times 100\% \quad (3.1)$$

onde $A_{t=0}$ representa a área inicial do corte e $A_{t=\Delta t}$ representa a área do corte após n horas do corte inicial, ambos em µm².

Figura 30 – Imagem da captura dos arranhões (*scratches*). No detalhe, células L929.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A taxa de migração celular foi determinada utilizando os parâmetros descritos na equação 3.2:

$$R_M = \frac{W_i - W_t}{t}; \quad (3.2)$$

na qual, W_i é a largura inicial do corte, W_t é a largura do corte no tempo t , ambos em μm^2 .

3.4 Microscopia confocal (fluorescência)

As células foram fixadas com paraformaldeído, permeabilizadas com Triton X-100 e bloqueadas com albumina bovina sérica (BSA) para minimizar ligações inespecíficas. Os filamentos de F-actina foram marcados com faloidina, enquanto os núcleos celulares foram corados com DAPI. As imagens foram adquiridas à temperatura ambiente utilizando um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 710. As excitações ocorreram nos comprimentos de onda de 405 nm e 488 nm, com picos de emissão em 457 nm para os núcleos e 518 nm para a F-actina, respectivamente. Para cada grupo experimental de irradiação, analisou-se um total de $n = 20$ imagens.

3.5 Proteômica e bioinformática

Das seis linhagens incluídas neste estudo (HaCaT, L929, OFCOL II, C2C12, MG-63 e RAW 264.7), optou-se por realizar uma análise proteômica de alta profundidade (LC-MS/MS) e imunomarcção confocal apenas nas três primeiras (HaCaT, L929 e OFCOL II). Esta opção foi fundamentada em critérios experimentais e de hipótese, uma vez que as linhagens selecionadas representam um eixo biológico de interesse translacional, nomeadamente a epiderme, o tecido conjuntivo e o tecido ósseo. Esta abordagem possibilita o estudo dos mecanismos moleculares potenciais responsivos, desde a superfície cutânea até ao compartimento ósseo. Deste modo, priorizou-se a profundidade analítica e a replicação técnica/biológica nas amostras ômicas e de imagem, tendo sido ainda consideradas restrições práticas de tempo, custo e disponibilidade de reagentes. Além disso, todas as seis linhagens foram submetidas às mesmas análises biomecânicas e de bancada (AFM, ensaios de viabilidade e migração/scratch), garantindo a comparabilidade fenotípica entre os grupos experimentais.

O protocolo de extração proteica foi adaptado de (Riss *et al.*, 2013). As células foram lavadas duas vezes com PBS frio e lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP-40; 1% Na-deoxycholate; 0,1% SDS) suplementado com cOmplete™, um coquetel de inibidores de proteases da Roche®. O homogenato celular foi centrifugado a 4 °C, 10.000xg, por 30 min, para recuperação do sobrenadante, dialisado contra uma solução de 50 mM de (NH₄)₂CO₃ e concentrado utilizando dispositivos de diafiltração do tipo Vivaspin com cut-off 3 kDa (Cytiva®). Após a quantificação com Pierce BCA Protein Assays kit, 50 µg de proteína foram digeridos com tripsina e analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC- MS/MS) em um sistema ACQUITY UPLC M-Class conectado ao espectrômetro de massas, modelo Synapt XS (Waters, Reino Unido).

Figura 31 – Espectrômetro de massas LC-MS fabricado pela Waters Corporation.



O espectrômetro de massas acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (LC-MS, do inglês Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) combina as capacidades de separação da cromatografia líquida com a detecção sensível e específica da espectrometria de massas, permitindo a identificação e a quantificação de compostos químicos em misturas complexas. À esquerda, estão módulos típicos de um sistema de cromatografia líquida, como bombas para controle do fluxo de solventes, uma unidade de injeção de amostras e um detector. Já na parte direita, observa-se o espectrômetro de massas, que inclui uma fonte de ionização, um analisador de massas e o sistema de detecção. Esse equipamento é amplamente utilizado em laboratórios analíticos para aplicações em química, bioquímica, farmacologia e áreas relacionadas. O equipamento da foto pertence ao Nubex - Unifor e foi utilizado neste trabalho para obtenção de dados de proteômica. Fonte: Elaborada pelo autor.

Peptídeos trípticos (4 μg) foram injetados em no mínimo duas réplicas técnicas e separados por nanoUPLC, utilizando matriz HSS T3 C18 (130 Å, 1,8 μm , 300 mm \times 150 μm) sob gradiente de 0 a 40% de água/acetonitrila, contendo 0,1% de ácido fórmico, por 65 minutos. A coluna foi equilibrada com 2% de solvente B, à taxa de 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ e à temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$. Álcool desidrogenase de levedura (ADH, P00330), com concentração de 100 fmol/ μL , foi adicionado como padrão interno para quantificação absoluta.

A espectrometria de massa foi conduzida em modo de polaridade positiva e "V", com energia de cone de 30 V e temperatura da fonte de 100 $^{\circ}\text{C}$. Os dados foram adquiridos em HDMSE (180 mL/min de He, 90 mL/min de N_2) por meio do programa MassLynx4.1. Glu-Fib foi utilizado para calibração contínua e final do instrumento. Os espectros foram processados com o programa Progenesis QI V2.0 (Waters), usando o banco de dados UniProt específico para cada espécie.

Foram considerados critérios de análise: ≥ 2 fragmentos/peptídeo, ≥ 5 fragmentos/proteína e ≥ 1 peptídeo/proteína. Foram consideradas as seguintes modificações: carbamidometilação (fixa, Cys) e oxidação (variável, Met). As tolerâncias de massa para peptídeos e fragmentos foram de ± 20 ppm e $\pm 0,4$ Da, respectivamente, com FDR $\leq 1\%$. Os dados foram filtrados para alterações significativas ($p < 0,05$, ANOVA) e mudanças de abundância de $\geq 1,5$ vezes.

Análises de enriquecimento funcional (GO, Reactome e Panther) identificaram funções biológicas e vias associadas às proteínas. Apenas vias com $p < 0,05$ e com pelo menos 3 genes por via foram incluídas para visualização em *heatmaps*.

3.6 Microscopia de força atômica

Neste trabalho, os experimentos foram realizados utilizando um microscópio de força atômica MFP-3D integrado a um microscópio invertido, fabricado pela Asylum Research (Digital Instruments, Santa Barbara, CA).

As curvas de força de permanência (Figura 32) foram adquiridas utilizando um microscópio de força atômica (AFM) Asylum MFP3D-BIO acoplado a um microscópio óptico invertido Nikon IX51. Foram utilizados *cantilêveres* AFM com constante de mola de $0,06$ N/m e ponta piramidal (PNP-TR-Au, NanoWorld, com altura nominal de $3,5$ μm). A força máxima aplicada às células (F_{max}) foi de 3 nN, resultando em profundidades de indentação entre $1,2$ μm e $1,6$ μm , dependendo da linhagem celular. Utilizou-se uma extensão piezoelétrica (Z_{ramp}) de 3 μm e uma frequência vertical de $f_z = 1$ Hz, o que corresponde a uma velocidade de extensão/retração do cantiléver de 6 $\mu\text{m/s}$. As medições foram conduzidas à temperatura ambiente (25°C) em condições experimentais uniformes.

O protocolo experimental adotado neste trabalho foi concebido com base no modelo analítico viscoelástico para materiais de lei de potência, cuja equivalência com o modelo de Hertz-Sneddon foi testada em Lima *et al.* (2024). O autor desta tese também é coautor desse trabalho, tendo atuado na metodologia experimental e na curadoria dos dados. No artigo, foi demonstrado que, dentro da faixa de parâmetros testada (f_z entre $0,25$ e $2,0$ Hz; F_{max} entre 1 e 8 nN), a diferença entre o módulo de Young obtido pelo modelo de Hertz-Sneddon e o módulo efetivo $E(t_1)$ do modelo viscoelástico de lei de potência é de até 5% , limite válido mesmo em regimes não lineares de deformação.

Para estabilizar o pH fora da incubadora, um terço do meio foi substituído por solução de PBS antes das medições. Todos os experimentos de AFM foram realizados dentro de um período de 2 horas após a remoção das células da incubadora de CO₂. O número de células analisadas por grupo foi: $n_{\text{HACAT}} = (42, 31, 35, 37, 31)$, $n_{\text{L929}} = (15, 41, 30, 28, 31)$ e $n_{\text{OFCOLII}} = (31, 35, 29, 31, 30)$ para os grupos CTRL, IR25T10, IR25T20, IR50T10 e IR50T20, respectivamente.

Em cada célula, foram coletadas 16 curvas de força, distribuídas uniformemente em uma área de $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$, a fim de sondar diferentes regiões da célula. A Figura 32 mostra as distribuições de dados agrupados por célula, destacando os valores medianos das propriedades viscoelásticas e fornecendo informações sobre a variabilidade intercelular. Dados brutos adicionais estão disponíveis no Material Suplementar.

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism (versão 10.3.1), conforme a necessidade de cada experimento. Para a realização de comparações múltiplas, foi empregado o teste ANOVA de duas vias, seguido pelo teste post-hoc de Tukey para identificar diferenças entre pares, adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$. Para tanto, foi aplicado o teste de ANOVA de duas vias, que permitiu avaliar simultaneamente dois fatores (por exemplo, tipo celular e condição de iluminação – controle versus condições irradiadas como IR25T10, IR25T20, IR50T10 e IR50T20). Dessa forma, foi possível analisar os efeitos principais e interações entre fatores.

A identificação de outliers foi realizada pelo método ROUT (robust regression and outlier removal; $Q = 1\%$), utilizado para detectar e excluir pontos discrepantes, assegurando, assim, conjuntos de dados mais consistentes para as análises subsequentes. Nos ensaios de viabilidade celular e de cicatrização de feridas, o procedimento de detecção de outliers pelo método ROUT foi seguido de ANOVA de duas vias e teste de Tukey. Os tamanhos amostrais foram $n = 8$ e $n = 4$ réplicas por grupo, respectivamente.

Para as análises de propriedades biomecânicas (módulos de elasticidade e expoentes de fluidez), os valores medianos foram calculados a partir de 16 medições por célula. As comparações entre grupos de irradiação foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O Kruskal-Wallis também foi empregado, quando indicado (por exemplo,

em situações de distribuição assimétrica ou quando a hipótese de normalidade não foi atendida), para avaliar diferenças em parâmetros como a intensidade de F-actina obtida por microscopia confocal.

Em experimentos de microscopia confocal, as intensidades médias de pixels foram mensuradas para cada grupo. As diferenças significativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), quando as premissas paramétricas foram atendidas, ou à análise de Kruskal-Wallis, quando as suposições de normalidade não puderam ser assumidas. As premissas estatísticas foram verificadas previamente, sendo que a normalidade dos dados foi testada, quando aplicável, pelo teste de Shapiro-Wilk.

Todos os testes empregados adotaram o nível de significância estatística $p < 0,05$. Essas abordagens (detecção robusta de outliers, análise de variância de duas vias com comparações múltiplas por Tukey e testes não paramétricos quando apropriados) garantem uma análise rigorosa e consistente dos efeitos das diferentes condições de iluminação sobre os parâmetros biomecânicos, morfológicos e funcionais avaliados no estudo.

4 RESULTADOS

Neste trabalho, foram investigadas as respostas biomecânicas e de bancada de seis linhagens celulares, HaCaT, L929, OFCOL II, MG-63, C2C12 e RAW 264.7, possibilitando um retrato funcional da FBM por meio de alterações na mecânica celular. Com base nos objetivos e nas metodologias adotadas, os resultados são apresentados em duas partes. A Parte I reúne as análises realizadas em todas as seis linhagens e contempla três áreas principais: propriedades viscoelásticas medidas por AFM, quantificação da viabilidade e da citotoxicidade e avaliação da motilidade por meio de ensaios de migração (scratch test). A Parte II, aplicada exclusivamente às linhagens HaCaT, L929 e OFCOL II (conforme os critérios estabelecidos seção 3.5), apresenta os resultados das imagens de microscopia confocal e da análise proteômica (LC-MS/MS). Os resultados são ilustrados por meio de mapas de calor (*heatmaps*), diagramas de vias, gráficos de correlação e tabelas descritivas.

4.1 Parte I – Resultados biomecânicos e de bancada

Nesta primeira parte, analisamos como a exposição à luz vermelha afeta as propriedades viscoelásticas das células, utilizando microscopia de força atômica para investigar a relação entre alterações biomecânicas e mecanismos moleculares da resposta celular à irradiação. Os resultados referentes às linhagens HaCaT, L929 e OFCOL II foram publicados em artigo de nossa autoria (Silva *et al.*, 2025), e a consistência descritiva aqui mantida visa preservar a fidelidade ao texto publicado. Já os resultados referentes às linhagens C2C12, MG-63 e RAW 264.7 constituem contribuição inédita desta tese, não estando, portanto, naquele artigo.

Este estudo foi desenvolvido com base em um modelo que simula o tratamento de fotobiomodulação em um sistema multicamada, mimetizando a penetração da luz através dos tecidos em diferentes profundidades. O modelo abrange desde células superficiais da pele (importantes para a cicatrização de feridas) até estruturas profundas (como as envolvidas na dor articular crônica decorrente da osteoartrite). Nesse contexto, uma fonte de luz com comprimento de onda específico (633 nm) é direcionada para simular a aplicação sobre a pele, visando atingir as várias camadas subjacentes representadas em nosso estudo, conforme ilustrado na Figura 32.

Estudamos seis linhagens celulares (previamente detalhadas na Seção 2.9) com o propósito de simular as distintas profundidades anatômicas no local irradiado: os queratinócitos (HaCaT), que representam a epiderme superficial; os fibroblastos (L929), que simulam o tecido conjuntivo intermediário; os mioblastos (C2C12), que reproduzem a região muscular; os osteoblastos (OFCOL II) e o osteossarcoma (MG-63), que simulam a estrutura óssea; e, por fim, os macrófagos (RAW 264.7), que representam o componente do sistema imune. Ao correlacionar linhagens representativas de epiderme, estroma, osso, músculo e sistema imune, incluindo um modelo tumoral (MG-63), é possível diferenciar respostas específicas por tipo celular. Logo, é viável correlacionar vias bioenergéticas e redox com alterações mecânicas e funcionais, descrevendo, conseqüentemente, janelas de dose/tempo seguras e com aplicação translacional para a FBM.

Nos tratamentos clínicos, a luz penetra progressivamente nos tecidos, resultando em uma menor absorção energética pelas células localizadas em regiões mais profundas. No entanto, neste estudo experimental, todas as linhagens celulares foram submetidas à irradiação contínua com luz vermelha ($\lambda = 633$ nm), variando-se as condições de intensidade e duração: 25 mW/cm² ou 50 mW/cm² por 10 ou 20 minutos. Essas condições selecionadas baseiam-se em evidências prévias da literatura que demonstram resultados promissores e refletem a duração típica de protocolos terapêuticos (Medrado *et al.*, 2003; Michelogiannakis *et al.*, 2019; Rojas; Gonzalez-Lima, 2013; Zhao *et al.*, 2022). Os experimentos foram organizados em cinco grupos experimentais, definidos como IR25T10, IR25T20, IR50T10, IR50T20 e um grupo de controle (CTRL), que não foi exposto à luz.

4.1.1 Viscoelasticidade

A Figura 32c detalha as fases do experimento de curva de força característica medida com o AFM, em que cada curva força-tempo em célula única foi segmentada em três estágios: aproximação até o contato (quando a ponta do *cantilever* entra em contato com a célula, definida pelo tempo t_c), o período de *dwell* (t_d), onde ocorre o relaxamento viscoelástico da célula, e a retração, capaz de revelar fenômenos adesivos.

Durante a aproximação (fase de carregamento), o piezo avança com velocidade constante – controlada pela frequência vertical f_z – até que, em $t = t_c$, a ponta do *cantilever* entra em contato com a superfície celular e a deflexão deixa de zero, aumentando até a força

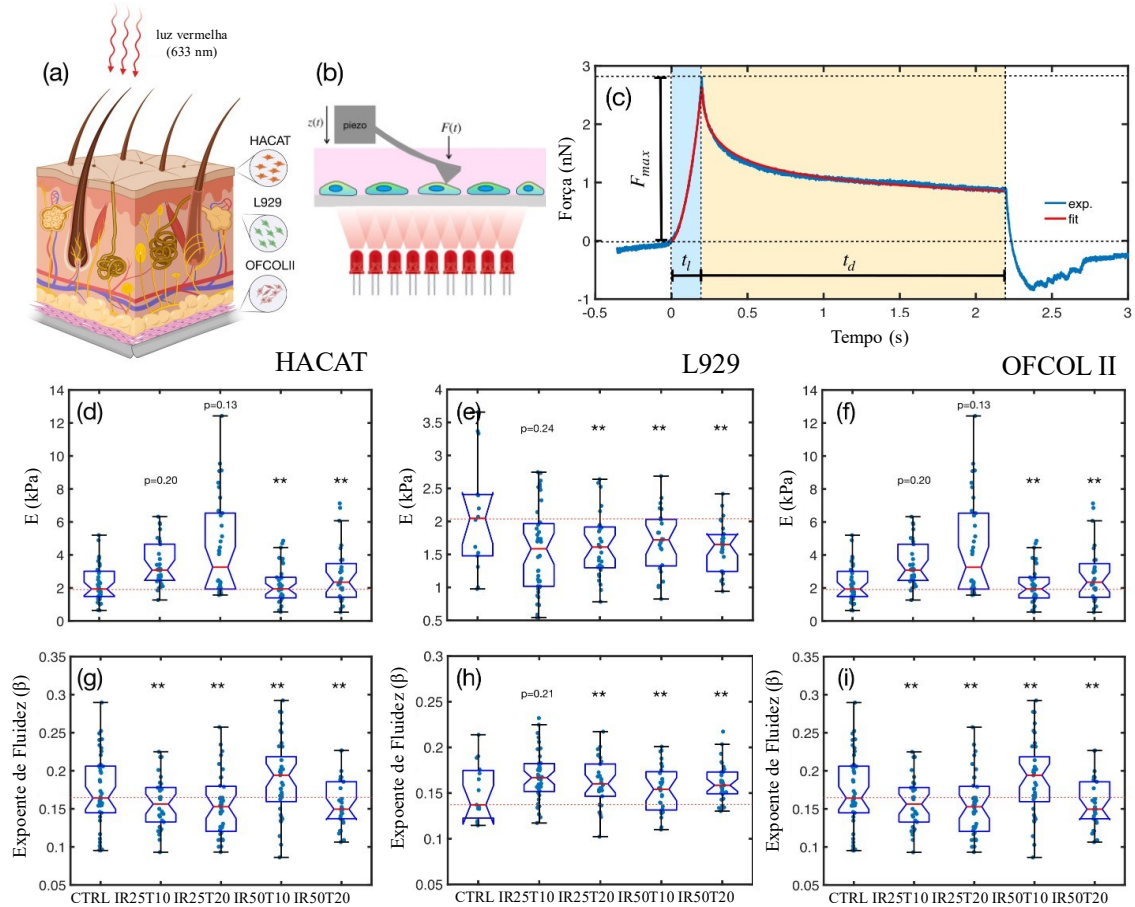
máxima F_{max} aplicada em $t = t_t$. O intervalo de tempo de carregamento $\Delta t = t_l - t_c$, onde $t_l \approx \frac{1}{2f_z}$, define a rigidez elástica inicial da célula. Na fase de *dwell*, τ_d , o piezo permanece estacionário enquanto F_{max} decai gradualmente em decorrência da relaxação viscoelástica da célula. O ciclo se completa na retração do piezoelétrico, em que o *cantilever* é afastado com a mesma velocidade de aproximação. Todo esse processo revela fenômenos adesivos ponta-célula e pode ser descrito por três parâmetros de entrada: f_z , F_{max} e t_d . Tais parâmetros servem de base para extração do módulo elástico efetivo E e do expoente de fluidez β associados ao material celular. A quantificação da resistência à deformação e do caráter sólido fluido do material celular é feita por meio desses parâmetros.

Em Lima *et al.* (2024), que utilizou o mesmo equipamento de AFM e os mesmos parâmetros de cantilever empregados nesta tese, foi testada a equivalência entre os modelos de Hertz-Sneddon e de lei de potência para as linhagens L929 e OFCOL II, verificando-se uma diferença de até 3% em condições de medição controladas de ponto único. Esse resultado valida o protocolo de extração dos parâmetros E e β para essas linhagens e fornece referência de metodologia para sua extensão às demais linhagens investigadas nesta tese, onde a análise é ampliada para diferentes condições de irradiação com luz vermelha.

As Figuras 32d-i mostram que células localizadas em diferentes profundidades exibiram respostas viscoelásticas distintas à absorção de luz. Nos queratinócitos (HaCaT), os módulos de elasticidade aumentaram de maneira dependente tanto do tempo de exposição quanto da intensidade da luz. Para intensidades mais baixas (25 mW/cm^2), os módulos de elasticidade aumentaram com tempos de exposição mais longos. No entanto, em intensidades mais altas (50 mW/cm^2), não foram observadas alterações significativas. Em relação à fluidez, a absorção de luz reduziu a fluidez das células, exceto no grupo IR50T10, que apresentou um leve aumento na fluidez em comparação ao grupo de controle.

Nos fibroblastos (L929), foi observada uma redução na rigidez e um aumento na fluidez em todas as intensidades de luz, quando comparados ao grupo de controle. Já para os osteoblastos (OFCOL II), os módulos de elasticidade apresentaram mínima sensibilidade à luz, oscilando em torno dos valores do grupo de controle. Ainda assim, tempos de exposição mais curtos tenderam a aumentar os módulos de elasticidade em comparação com tempos de exposição mais longos. Quanto à fluidez, a absorção de luz também reduziu a fluidez das células, embora exposições mais longas tenham provocado um aumento nessa propriedade.

Figura 32 – Perfil viscoelástico de HaCaT, L929 e OFCOL II medido por AFM.



(a) Representação esquemática do modelo: uma fina camada de pele nas regiões articulares recebe a aplicação de luz monocromática vermelha ($\lambda = 633 \text{ nm}$). As células analisadas estão localizadas em diferentes profundidades: queratinócitos (HaCaT) na superfície da pele, fibroblastos (L929) em tecidos conjuntivos (como tendões e ligamentos), em profundidade intermediária, e osteoblastos (OFCOL II) na superfície óssea, na maior profundidade. (b) Configuração de irradiação: as células aderidas a diferentes substratos foram irradiadas de baixo para cima, utilizando uma matriz de LEDs projetada para garantir iluminação uniforme. (c) Exemplo de curva de força de permanência adquirida por microscopia de força atômica (AFM), destacando os parâmetros principais: t_l (tempo de carregamento), t_d (tempo de descarregamento) e F_{max} (força máxima). (d-f) Módulos de elasticidade (E) e (g-i) expoentes de fluidez (β) obtidos para diferentes condições de irradiação com luz. Os boxplots foram construídos a partir de dados consolidados por célula individual, onde cada ponto de dados representa o valor mediano do parâmetro viscoelástico medido em uma célula. A linha horizontal fina serve como referência para facilitar a comparação entre os grupos controle e tratados. Os números de células analisadas em cada grupo de irradiação foram: HaCaT: (42, 31, 35, 37, 31); L929: (15, 41, 30, 28, 31) e OFCOL II: (31, 35, 29, 31, 30). Para cada célula, foram adquiridas 16 curvas de força, distribuídas uniformemente em uma área de $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$, permitindo uma análise representativa de diferentes regiões celulares. Boxplots construídos com os dados brutos estão disponíveis no material anexo. As distribuições dos grupos irradiados foram comparadas estatisticamente ao grupo controle usando o teste de Kruskal-Wallis. Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por (*) para $p < 0,05$, enquanto (**) indica distribuições estatisticamente indistintas ($p > 0,7$). O painel (a) foi criado usando a ferramenta BioRender.com. Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

As variações nos dados viscoelásticos foram relativamente grandes em todas as linhagens celulares. Por exemplo, os módulos de elasticidade dos fibroblastos (L929) diminuíram, em média, cerca de 25%, enquanto os queratinócitos (HaCaT) exibiram um

aumento de até 50% na rigidez no grupo IR25T20. Alterações comparáveis também foram observadas nos expoentes de fluidez em todas as linhagens.

Ao usar dados agrupados por célula individual, as comparações estatísticas entre os grupos irradiados e o grupo de controle dentro de cada linhagem indicaram que os grupos irradiados não diferiram significativamente do grupo de controle. Esses resultados sugerem que a exposição à luz em baixa intensidade induziu alterações diferenciais nas propriedades viscoelásticas, sem causar danos estruturais às células. Experimentos de viabilidade celular corroboraram esses achados, demonstrando que as células permaneceram saudáveis após o tratamento com luz.

Quando os testes estatísticos foram realizados utilizando os dados viscoelásticos brutos, os grupos irradiados apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo de controle (ver material anexo). No entanto, valores medianos permaneceram praticamente inalterados em relação aos dados agrupados por célula individual. As diferenças significativas observadas nos dados brutos provavelmente foram influenciadas pelo número substancialmente maior de pontos de dados, o que aumenta a sensibilidade dos testes estatísticos a pequenas variações.

Os gráficos da Figura 33 demonstram o módulo elástico efetivo (E) e o expoente de fluidez (β) para cada linhagem, a saber: C2C12 (mioblastos de camundongo), RAW 264.7 (macrófagos murinos) e MG-63 (osteossarcoma humano). Dessa forma, tal qual o procedimento realizado com as células de pele (HaCaT e L929) e a OFCOL II, foi realizada a comparação entre cinco grupos: o grupo controle, que não foi submetido à luz, e quatro condições de fotobiomodulação (irradiância de 25 ou 50 mW/cm² por 10 ou 20 min – I25T10, I25T20, I50T10 e I50T20).

Para a C2C12, com o aumento da dose e do tempo de exposição à luz vermelha, observa-se um comportamento bifásico, em que há uma leve tendência ao aumento da rigidez para I50T20, com maior variação da distribuição dos dados viscoelásticos. Já o expoente de fluidez β apresentou alternância em relação ao grupo controle, sendo difícil apontar uma tendência de comportamento. É possível que a não ativação dos mioblastos tenha afetado esse resultado.

Nos macrófagos RAW 264.7, foi observado um aumento tanto na rigidez celular, quanto na fluidez, indicando uma ativação substancial do citoesqueleto (e possivelmente de vias imunes/metabólicas) em resposta à luz vermelha. O módulo elástico apresentou uma variação de aproximadamente 1 kPa no grupo controle, elevando-se para cerca de 3 kPa nos

grupos I50T20. Apesar da menor intensidade, os demais grupos irradiados mostram tendência ao aumento da rigidez. Observou-se também aumento do expoente de fluidez, β , de todos os grupos irradiados em relação ao grupo controle, mas havendo diferença mínima entre os grupos irradiados. Além disso, nota-se que o aumento da viscoelasticidade dos macrófagos pode estar relacionado à heterogeneidade fenotípica induzida pela ativação.

Figura 33 – Perfil viscoelástico de C2C12, RAW 264.7 e MG-63 medido por AFM.



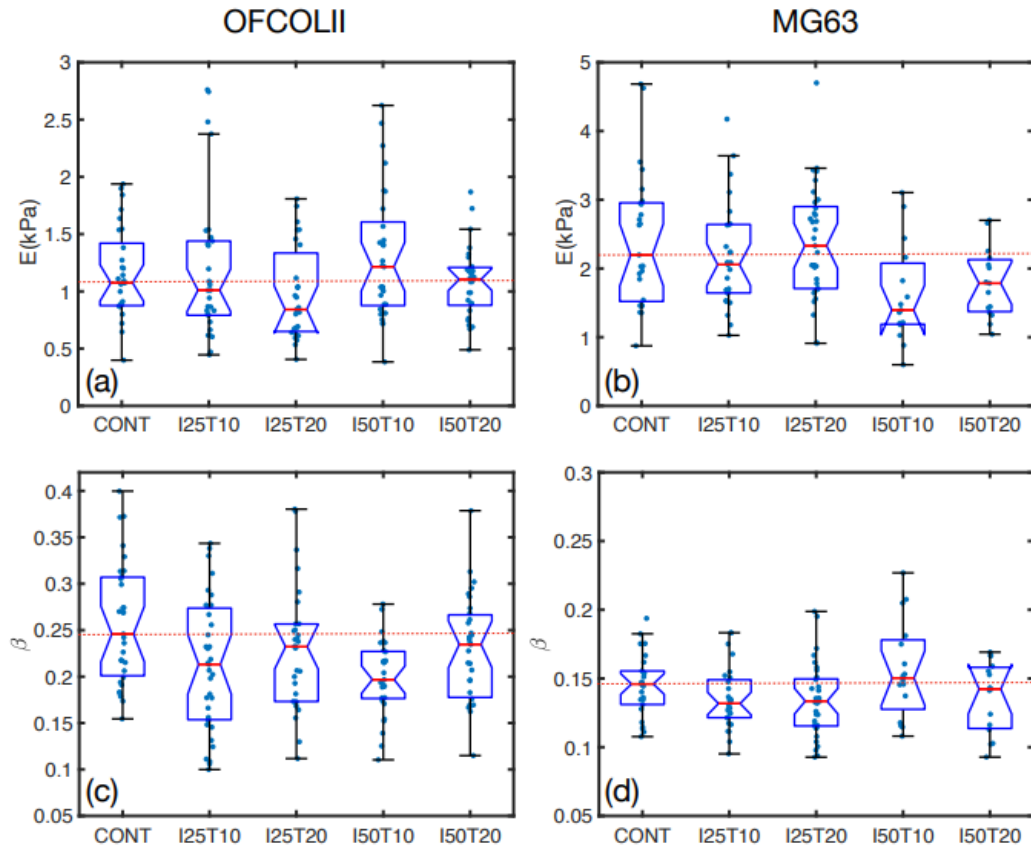
(a-c) Módulos de elasticidade (E) e (d-f) expoentes de fluidez (β) obtidos para diferentes condições de irradiação com luz. Os *boxplots* foram construídos a partir de dados consolidados por célula individual, sendo que cada ponto representa o valor mediano do parâmetro viscoelástico medido em uma célula. A linha horizontal fina foi incluída como referência para facilitar a comparação entre os grupos controle e tratados. Para cada célula, foram adquiridas 16 curvas de força distribuídas uniformemente em uma área de $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$, permitindo uma análise representativa de diferentes regiões da célula. As distribuições dos grupos irradiados foram comparadas ao grupo controle por meio do teste de Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pelo autor.

As células de osteossarcoma MG-63 demonstraram rigidez mais baixa em relação ao grupo controle, havendo diferença maior para I50T10 e I50T20. Para as irradiâncias menores, a rigidez mostrou alternância, o que pode indicar suscetibilidade da célula apenas para irradiâncias maiores e, possivelmente, com menor tempo de exposição. O expoente de fluidez apresentou leve tendência à diminuição, apesar das mudanças maiores para menores irradiâncias. Esses resultados indicam menor fluidez no início, seguida de normalização, mas com menor rigidez.

Em geral, os macrófagos RAW demonstraram o maior enrijecimento (exceto em IR50T10) em resposta à luz vermelha, enquanto os mioblastos C2C12 apresentaram alteração sutil. Nas células MG-63, o comportamento foi de diminuição do módulo de elasticidade, especialmente em intensidades maiores de luz. Houve aumento da fluidez nas RAW, aumento para IR25T20 (e diminuição em IR25T10 e IR50T10) nos C2C12 e diminuição nas MG-63. Observou-se também que todas as linhagens demonstraram maior sensibilidade à dose de 50 mW/cm², principalmente para a exposição de 20 minutos.

Como a MG-63 é de uma linhagem óssea, assim como a OFCOL-II, na Figura 34 mostramos o perfil viscoelástico de ambas. Apesar de terem a mesma origem, os resultados de E e β evidenciam perfis mecânicos bastante distintos sob AFM. As células MG-63, provenientes de osteossarcoma humano, apresentam um módulo elástico inicial maior, com valores próximos a 2 kPa, que apresenta tendência à menor rigidez, exceto pelo grupo I25T20. É possível que essa célula seja mais responsiva para tempos menores de aplicação da luz. Além disso, observamos uma redução no expoente de fluidez β , indicando uma redução da rigidez e perda de fluidez à medida que a dose é aumentada. Em contraste, os osteoblastos murinos OFCOL II saudáveis apresentam uma rigidez inicial menor (~ 1 kPa) e praticamente não alteram seu módulo elástico, permanecendo entre ~ 1 kPa e $\sim 1,5$ kPa em todas as condições. Esses osteoblastos exibem apenas uma discreta queda em β . Essas diferenças demonstram que as células MG-63 apresentam uma estrutura citoesquelética aberrante, típica de células de câncer.

Figura 34 – Perfil viscoelástico comparativo entre OFCOL II e MG-63 medido por AFM.



Módulo elástico (E) e expoente de fluidez (β) de células ósseas MG-63 e OFCOL II após diferentes condições de fotobiomodulação. As MG-63 apresentaram aumento da rigidez apenas para I25T20 e redução de fluidez com o aumento da dose de luz. Em contraste, as OFCOL II mantiveram estabilidade mecânica, com E praticamente constante e apenas leve queda em β , sugerindo menor sensibilidade à irradiação. As diferenças observadas destacam o comportamento mecanobiológico distinto entre células tumorais e normais do tecido ósseo. Fonte: Elaborada pelo autor. (a,c) Publicados em Silva *et al.* (2025).

Apesar de a MG-63 ter se apresentado mais rígida que a OFCOL II, e isso ser contraintuitivo, há fundamentos que consideram a morfologia biomecânica dependente do tipo celular e do contexto (Müller; Silvan, 2019). Tradicionalmente, estudos comparando a rigidez de células tumorais e de osteoblastos humanos normais, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura, demonstraram que as células tumorais apresentam menor rigidez estrutural, resultado da modulação do citoesqueleto, característica comum em células cancerosas (Docheva *et al.*, 2008). Em outras palavras, as células tumorais apresentam menor rigidez em comparação com os osteoblastos normais. A hipótese de que a menor rigidez das células cancerígenas facilita a migração e a invasão é amplamente documentada em diversos tipos de câncer (Gensbittel *et al.*, 2021; Mierke, 2019).

Embora a menor rigidez das células tumorais seja uma característica predominante, há condições de diferenciação, fase do ciclo e ambiente microambiental que podem resultar em aumento da rigidez celular em alguns contextos específicos (Müller; Silvan, 2019). A medição da rigidez mecânica de células únicas de osteossarcoma foi feita pela primeira vez em 1999, em que os autores encontraram um módulo de Young (E) próximo a 2 kPa (Shin; Athanasiou, 1999). De acordo com a linhagem e as condições do experimento, os valores de E podem variar de 1 a 4 kPa (Bartalena *et al.*, 2011; Müller; Silvan, 2019; Wang *et al.*, 2016).

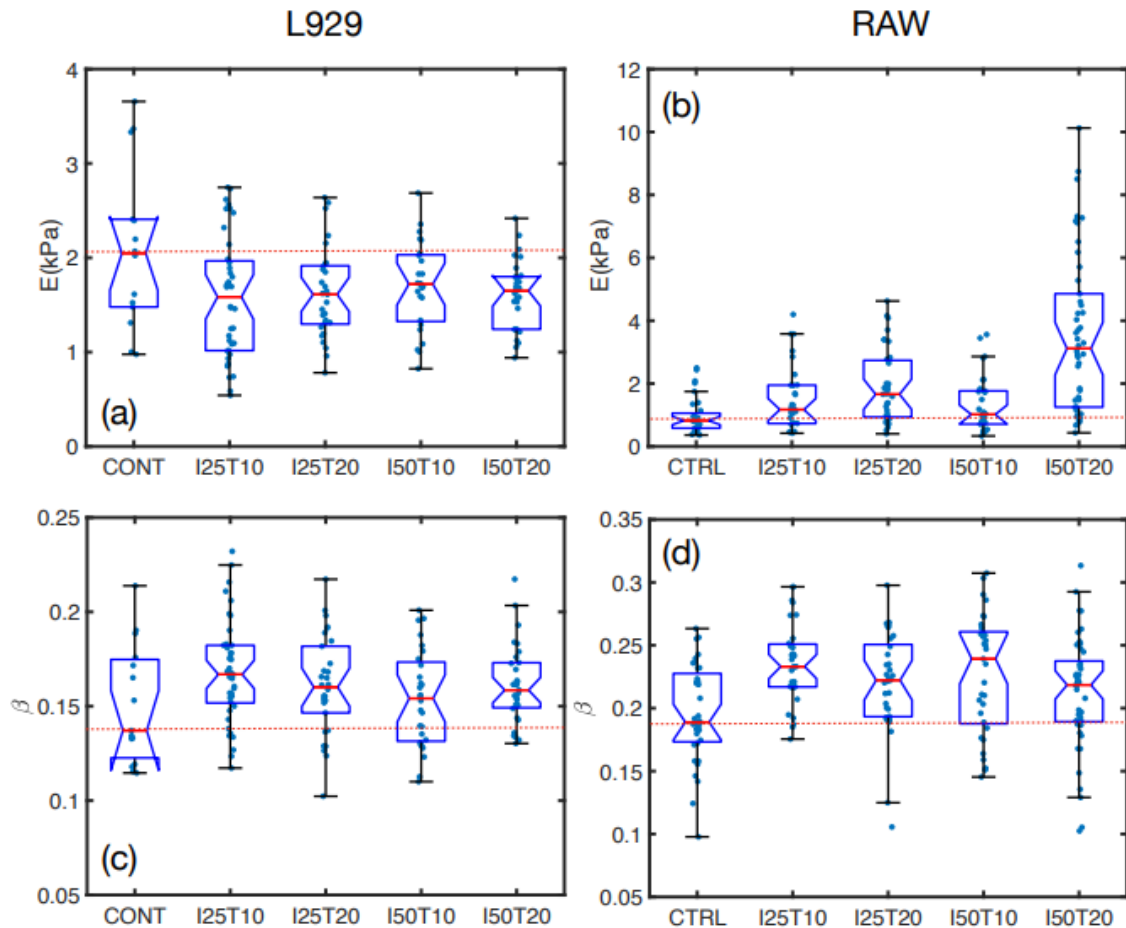
Estudos em sarcomas musculoesqueléticos demonstram que, quando o citoesqueleto apresenta robustez e o tumor está bem diferenciado, células como a MG-63 podem exibir módulo elástico igual ou superior ao dos osteoblastos saudáveis do mesmo tecido (Darling *et al.*, 2008). Além disso, devido à contração celular acentuada, as células de osteossarcoma apresentam maior resistência mecânica quando expostas a superfícies rígidas (Müller; Silvan, 2019).

Enquanto a análise das células tumorais permite identificar características sobre a rigidez e invasividade, a compreensão da mecânica celular no contexto da fotobiomodulação exige também o estudo de células que estão envolvidas no reparo tecidual. Tanto os macrófagos quanto os fibroblastos são ativados em uma lesão cutânea, constituindo células centrais nos estágios de inflamação, proliferação e remodelamento. Dada a natureza complementar das funções desempenhadas por tais células, no que tange à resposta imune, a análise comparativa entre elas contribui para a compreensão dos mecanismos pelos quais diferentes perfis fisiológicos respondem mecanicamente à fotobiomodulação.

Os resultados de AFM demonstram respostas mecânicas distintas entre fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 (ver Figura 35). Nos L929, observou-se uma redução no módulo elástico mediano, que passou de aproximadamente 2 kPa no controle para valores entre 1,4 e 1,8 kPa em todas as condições irradiadas. Este achado foi concomitante ao aumento do expoente de fluidez, que aumentou de cerca de 0,14 para 0,16-0,18. Portanto, nos fibroblastos, pode-se inferir que a luz vermelha torna essas células consistentemente mais flexíveis e fluidas. No entanto, os RAW 264.7 exibiram um comportamento bifásico: baixas irradiâncias (I25T10, I25T20) elevaram tanto a rigidez quanto a fluidez, enquanto a condição de maior dose e duração (I50T20) induziu um endurecimento abrupto, com mediana de ~ 4 kPa e ampla dispersão de valores, ao mesmo tempo em que a fluidez de I50T20 recuou em comparação à I50T10. Esses padrões sugerem que, embora os fibroblastos apresentem redução da rigidez progressivamente sob luz vermelha, os macrófagos apenas exibem enrijecimento significativo sob estímulos

máximos, reflexo de diferenças no remodelamento do citoesqueleto e na sensibilidade fisiológica de cada linhagem.

Figura 35 – Perfil viscoelástico comparativo entre L929 e RAW 264.7 medido por AFM.



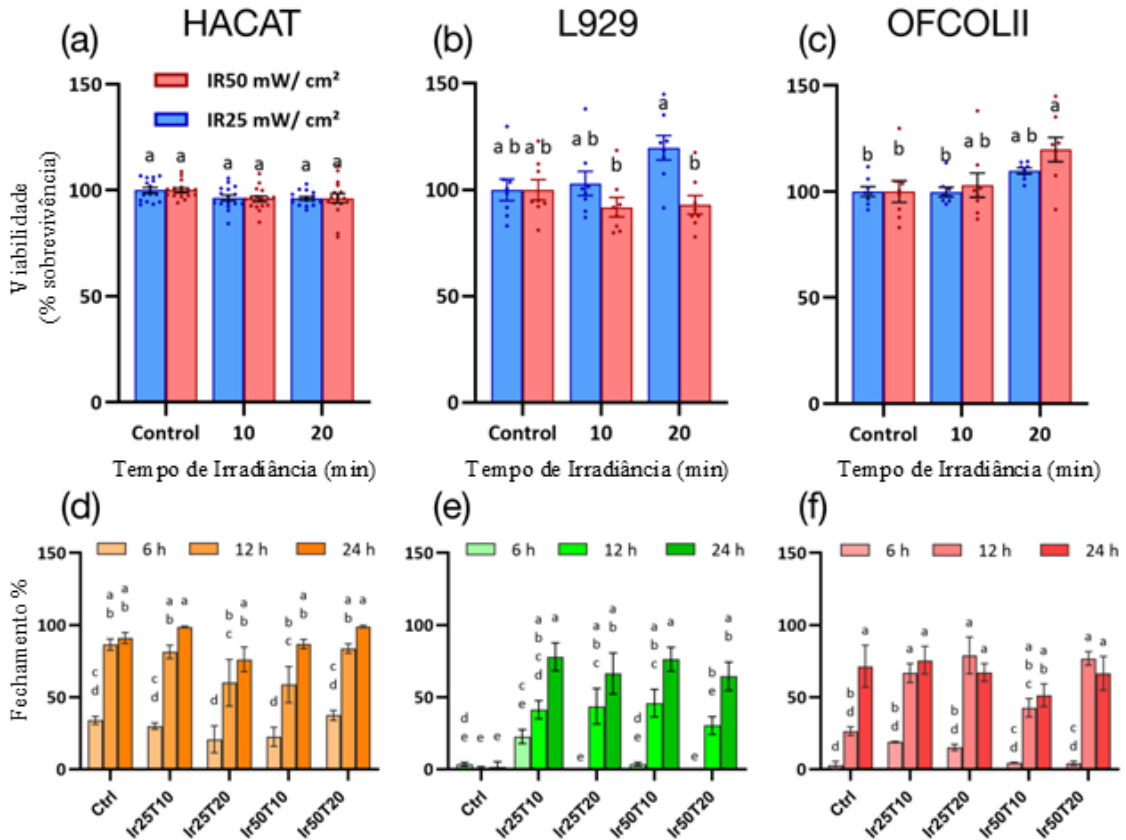
Módulo elástico (E) (a-b) e expoente de fluidez (β) (c-d) de fibroblastos L929 e macrófagos RAW 264.7 para diferente irradiâncias. Os fibroblastos apresentaram redução progressiva da rigidez e aumento da fluidez em todas as condições irradiadas, enquanto os macrófagos exibiram resposta bifásica: doses moderadas aumentaram levemente E e β , mas a maior dose (I50T20) induziu enrijecimento abrupto e queda na fluidez. Fonte: Elaborada pelo autor. (a,c) Publicados em Silva *et al.* (2025).

4.1.2 Viabilidade e motilidade celular

A viabilidade das células HaCaT foi levemente reduzida pelo tratamento com luz, sem que houvesse diferenças significativas entre as intensidades de luz testadas (ver Figura 36). A viabilidade das células L929 apresentou uma clara dependência da intensidade da luz irradiada: em baixas intensidades, a viabilidade aumentou com tempos de exposição mais longos, enquanto em intensidades elevadas, a viabilidade diminuiu independentemente da

duração da exposição. Para as células OFCOL II, a viabilidade aumentou de maneira proporcional à intensidade e à duração da exposição à luz, sugerindo maior resistência dessa linhagem ao tratamento.

Figura 36 – Viabilidade e distribuição média da intensidade de pixel das células HaCaT, L929 e OFCOL II.



(a-c) Viabilidade celular das células HaCaT, L929 e OFCOL II sob diferentes condições de irradiação, expressa como média \pm desvio padrão. As células HaCaT apresentam mudanças discretas e pouca influência da irradiação. Em L929, a viabilidade aumenta em intensidades baixas (IR25 mW/cm²), mas reduz-se em exposições longas e intensas (IR50 mW/cm²). Já as OFCOL II apresentam aumento geral com maior intensidade e duração da exposição. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas vias e teste post hoc de Tukey, com significância ($p < 0,05$) indicada por letras distintas. (d-f) Percentual de fechamento de feridas em 24 horas, analisado pelo ImageJ. As células HaCaT apresentam aumento consistente com maior intensidade e tempo de irradiação, enquanto nas L929 o fechamento atinge cerca de 70% em intensidades moderadas (IR25 mW/cm²), mas diminui em condições mais intensas e prolongadas. As OFCOL II são mais sensíveis ao tempo de exposição do que à intensidade, com maior fechamento observado em tempos intermediários. Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

As propriedades migratórias das células HaCaT e OFCOL II apresentaram flutuações, sem tendências consistentes em função da intensidade da luz ou do tempo de exposição. Por outro lado, nas células L929, a absorção de luz promoveu um aumento significativo na migração. Nos grupos tratados com luz, o fechamento das feridas aumentou de

um valor $\sim 0\%$ de fechamento inicial no grupo controle para cerca de 70% após 24 horas, evidenciando o impacto positivo da luz na motilidade celular (ver APÊNDICE B).

Esses resultados destacam a sensibilidade diferencial das linhagens celulares ao tratamento com luz, tanto em termos de viabilidade quanto de motilidade. As respostas observadas podem ser atribuídas a diferenças intrínsecas no metabolismo e na plasticidade das células, sendo que os fibroblastos (L929) demonstram maior adaptabilidade funcional à irradiação. O aumento da migração celular, especialmente em fibroblastos, sugere uma possível aplicação terapêutica para acelerar a cicatrização de feridas ou a remodelação tecidual (Chow *et al.*, 2009).

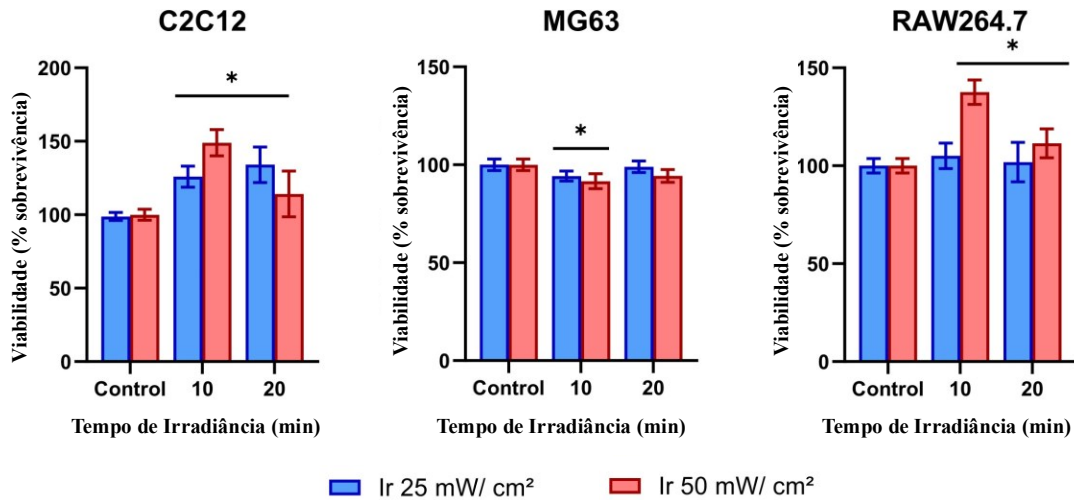
Análises adicionais de viabilidade celular indicam que o tratamento com luz não induz toxicidade significativa nas condições testadas, mas os efeitos são modulados por fatores como intensidade e duração da exposição. Estudos futuros poderão investigar como as mudanças na expressão gênica e na organização do citoesqueleto contribuem para as respostas celulares.

A Figura 37 apresenta três gráficos de barras que ilustram a viabilidade celular para os três tipos celulares distintos: C2C12 (mioblastos de camundongo), MG-63 (osteossarcoma humano) e RAW 264.7 (macrófagos de camundongo). No gráfico referente às células C2C12, observa-se um aumento significativo na viabilidade celular após 10 e 20 minutos de irradiação para ambas as intensidades, com um efeito mais pronunciado na irradiância de 50 mW/cm². A presença de um asterisco (*) indica que essa diferença é estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (sem irradiação).

No caso das células MG-63, a viabilidade celular não apresenta grandes variações entre os grupos. Há uma leve tendência de diminuição na viabilidade após 10 minutos de irradiação. O asterisco indica que há uma diferença estatística entre alguns grupos, possivelmente entre os tempos de 10 e 20 minutos.

Já para as células RAW 264.7, a irradiação promove um aumento significativo na viabilidade celular, especialmente após 10 e 20 minutos na irradiância de 50 mW/cm². O asterisco indica que a diferença observada entre os grupos é estatisticamente relevante.

Figura 37 – Viabilidade celular de C2C12, MG-63 e RAW 264.7.



Fonte: Elaborada pelo autor.

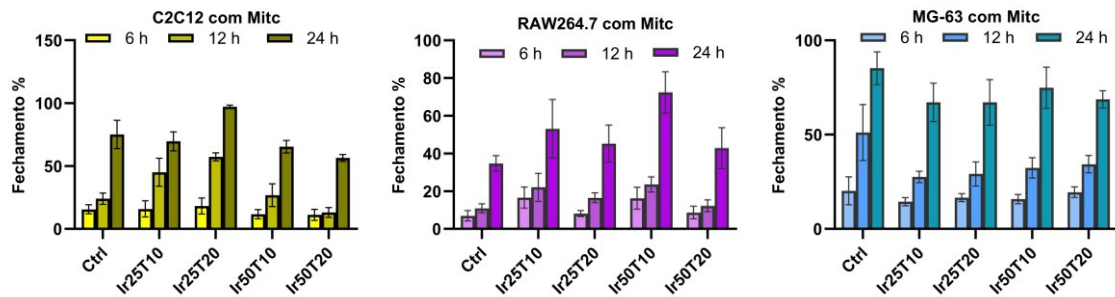
Esses resultados sugerem que a resposta celular à irradiação luminosa varia de acordo com o tipo celular e a intensidade aplicada. A irradiação parece estimular a viabilidade celular em C2C12 e RAW 264.7, enquanto os efeitos sobre MG-63 são menos evidentes. Além disso, a irradiância de 50 mW/cm² tende a produzir um efeito mais pronunciado nas células analisadas. Essa diferenciação na resposta pode ter implicações importantes para estudos envolvendo fotobiomodulação e suas aplicações terapêuticas.

O experimento de migração celular (Figura 38) foi conduzido na presença de Mitomicina C (Mitic), um inibidor da proliferação celular, o que garante que o fechamento da ferida ocorra predominantemente por migração celular, e não por divisão celular. Nos mioblastos C2C12, observa-se um aumento progressivo do fechamento da ferida ao longo do tempo. O efeito da irradiação é mais evidente nas condições de maior potência e tempo de exposição, sendo que Ir50T20 promove um fechamento quase completo da ferida em 24 horas. Esse achado sugere que a luz com maior densidade de potência e maior tempo de exposição potencializa a migração celular nesse tipo celular.

Nos macrófagos RAW 264.7, a tendência de fechamento da ferida ao longo do tempo também é observada, porém com menor intensidade em comparação aos mioblastos. Apesar disso, a irradiação apresenta um efeito positivo, especialmente nas condições Ir50T10 e Ir50T20, que resultam nos maiores percentuais de fechamento após 24 horas. No entanto, a migração dos macrófagos não atinge níveis tão elevados quanto os observados nos mioblastos, possivelmente em razão de suas funções biológicas distintas. Nas células de osteossarcoma

MG-63, a migração celular também é favorecida pela irradiação, embora com um padrão peculiar: o efeito positivo já é perceptível nas primeiras 6 horas, especialmente nas condições irradiadas. As condições Ir50T10 e Ir50T20 apresentam os maiores índices de fechamento da ferida, sugerindo que as células MG-63 são altamente responsivas à irradiação em termos de motilidade.

Figura 38 – Fechamento de ferida *in vitro* em células C2C12, RAW 264.7 e MG-63.



O ensaio foi realizado na presença de Mitomicina C (Mite) para inibir a proliferação celular, garantindo que o fechamento da ferida ocorresse predominantemente por migração celular. Os grupos experimentais incluem controle (Ctrl) e células irradiadas com diferentes parâmetros: Ir25T10 (25 mW/cm² por 10 min), Ir25T20 (25 mW/cm² por 20 min), Ir50T10 (50 mW/cm² por 10 min) e Ir50T20 (50 mW/cm² por 20 min). As barras representam a média ± erro padrão, e as diferentes cores indicam os tempos de análise: 6 horas, 12 horas e 24 horas. Fonte: Elaborada pelo autor.

Em termos gerais, os dados sugerem que a irradiação estimula a migração celular em todos os tipos celulares analisados, sendo o efeito mais pronunciado em C2C12 e MG-63. Além disso, observa-se que a densidade de potência de 50 mW/cm² e tempos de exposição maiores (20 min) tendem a produzir os melhores resultados. Como a Mitomicina C bloqueia a proliferação celular, confirma-se que os efeitos observados são, de fato, atribuídos à migração celular.

Esses resultados reforçam o potencial da fotobiomodulação na regulação da migração celular, destacando que diferentes tipos celulares respondem de maneira distinta à terapia com luz. As evidências moleculares que complementam esses resultados biomecânicos são apresentadas na Parte II, onde são discutidas imagens confocais de validação e dados proteômicos das linhagens HaCaT, L929 e OFCOL II.

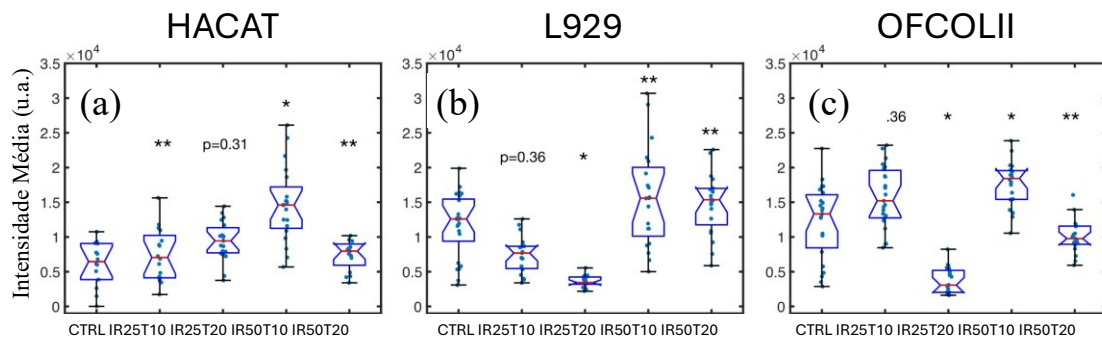
4.2 Parte II – Microscopia confocal e análise proteômica

Nesta seção, são apresentados os resultados das imagens de microscopia confocal e da análise proteômica de alta profundidade (LC-MS/MS), aplicadas às linhagens HaCaT, L929 e OFCOL II. A seleção das linhagens e os critérios experimentais encontram-se descritos detalhadamente na seção 3.5 (Materiais e Métodos).

4.2.1 Análise da microscopia confocal

A análise de imagens confocais permite uma avaliação indireta do conteúdo de F-actina e dos efeitos da absorção de luz no remodelamento do citoesqueleto de F-actina. Para isso, são comparadas imagens confocais de diferentes grupos de irradiação de uma mesma linhagem celular, adquiridas sob configurações idênticas de intensidade e ganho do *laser*. A Figura 39 ilustra a distribuição média da intensidade de pixels em todas as imagens para cada grupo de irradiação.

Figura 39 – Intensidade de F-actina e remodelamento do citoesqueleto.



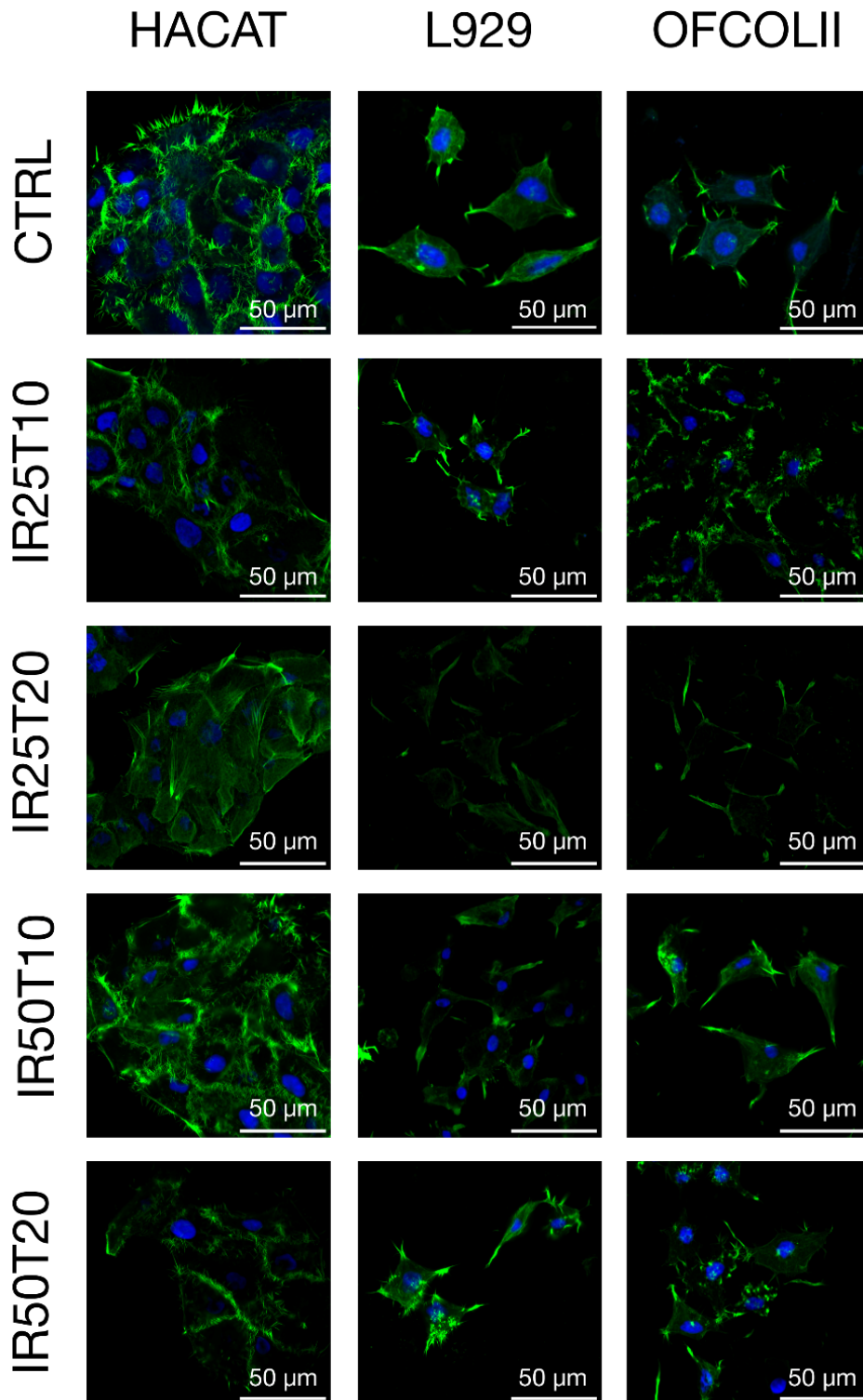
Intensidade média de F-actina em imagens confocais, avaliando o remodelamento do citoesqueleto em condições de irradiação (n = 20 imagens por grupo). Em HaCaT, a intensidade aumenta com exposições curtas e moderadas (IR25T10 e IR50T10), mas retorna ao controle em doses altas (IR50T20). Em L929, altas intensidades prolongadas (IR50T20) aumentam significativamente a F-actina, sugerindo remodelamento. Em OFCOL II, exposições curtas aumentam a F-actina, enquanto exposições longas reduzem sua intensidade para níveis inferiores ao controle. As imagens foram adquiridas sob configurações idênticas de intensidade e ganho. Comparações estatísticas foram realizadas com o teste de Kruskal–Wallis, e significância foi indicada por um único asterisco (*) para $p < 0,05$, e ausência de diferença por um duplo asterisco (**), para $p > 0,7$. Fonte: Elaborada pelo autor. (a, b) Publicados em Silva *et al.* (2025).

A absorção de luz afetou o citoesqueleto de F-actina de maneira distinta nas três linhagens celulares. Nas células HaCaT, a intensidade média aumentou com a dose de luz até um limiar (IR50T10), mas, em doses mais altas de energia (IR50T20), a intensidade diminuiu para níveis similares aos do grupo de controle (CTRL). Nas células L929, a emissão média do

citoesqueleto diminuiu em intensidades mais baixas (25 mW/cm²) e aumentou em intensidades mais altas (50 mW/cm²), independentemente da duração do tratamento. Por outro lado, nas células OFCOL II, a duração do tratamento teve maior influência do que a intensidade irradiada: exposições curtas aumentaram a emissão do citoesqueleto, enquanto exposições mais longas a reduziram para níveis inferiores aos do grupo de controle.

A resposta do citoesqueleto de F-actina à luz é específica para cada linhagem celular e depende tanto da intensidade quanto da duração da exposição (ver Figura 40).

Figura 40 – Microscopia confocal das células HaCaT, L929 e OFCOL II.



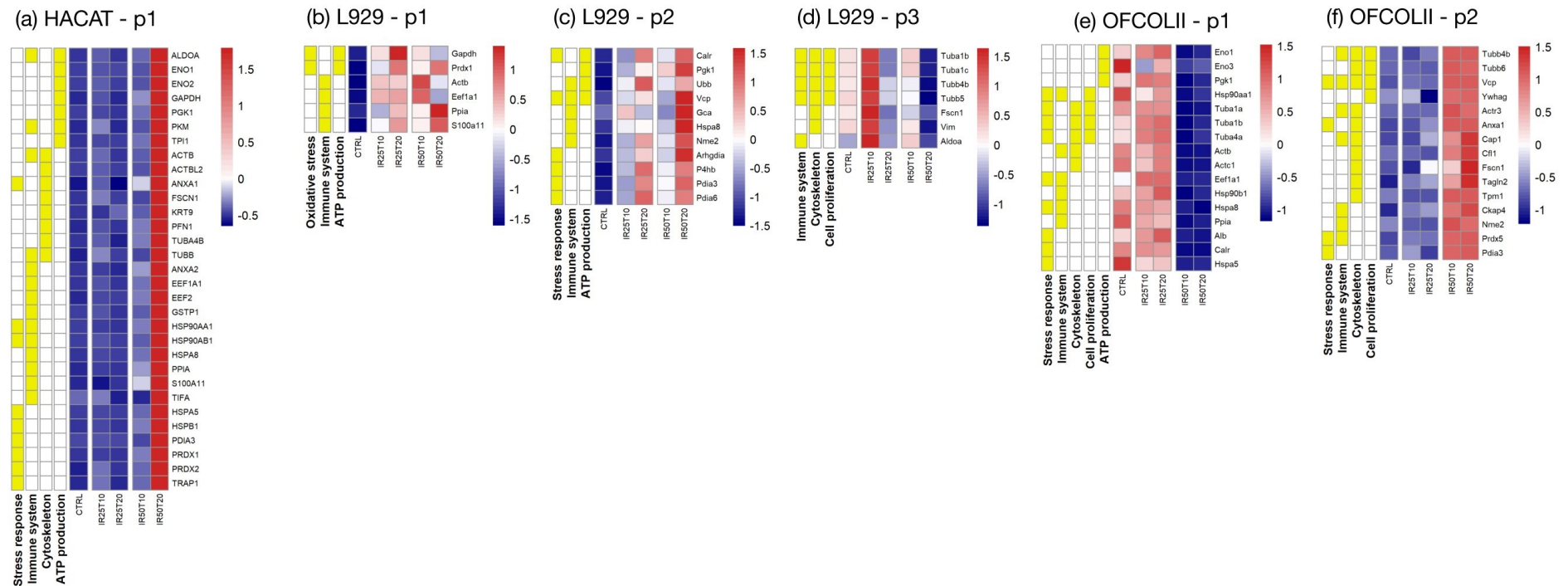
Imagens de microscopia confocal ilustram os valores medianos da intensidade média confocal correspondentes aos painéis (a-c) da Figura 39. Os filamentos de F-actina foram corados com faloidina (verde), e os núcleos, com DAPI (azul). As imagens mostram diferenças estruturais do citoesqueleto entre as linhagens celulares (HaCaT, L929 e OFCOL II) e condições de irradiação (CTRL, IR25T10, IR25T20, IR50T10 e IR50T20), evidenciando o remodelamento de F-actina em resposta às diferentes combinações de intensidade e duração da luz. Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

O remodelamento do citoesqueleto de F-actina é crucial para processos como migração, adesão e divisão celular, sendo um marcador importante de alterações funcionais induzidas pela luz. Nas HaCaT, a resposta sugere uma regulação dependente de um limiar energético, enquanto nas L929, a intensidade luminosa é o principal fator determinante. Já nas OFCOL II, a duração do tratamento exerce maior influência, destacando a complexidade dos mecanismos regulatórios do citoesqueleto em diferentes tipos celulares e a necessidade de personalizar os parâmetros de irradiação em aplicações terapêuticas.

4.2.2 *Análise proteômica*

A Figura 41 apresenta a análise proteômica de enriquecimento das proteínas diferencialmente expressas em cada linhagem celular. Foram identificadas aproximadamente 60 proteínas para cada linhagem (ver APÊNDICE B). Apenas vias enriquecidas com pelo menos três proteínas foram incluídas na análise. Os processos biológicos identificados incluem estresse oxidativo, resposta imune, proliferação celular e produção de ATP, frequentemente associados ao tratamento com fotobiomodulação (PBM) (Chung *et al.*, 2012; Dompe *et al.*, 2020; González-Muñoz *et al.*, 2023; Karu, 2008). Além disso, processos de remodelamento do citoesqueleto foram observados em todas as linhagens celulares.

Figura 41 – Análise proteômica das células HaCaT, OFCOL II e L929.



Os mapas de calor mostram proteínas identificadas ($n = 3$ réplicas por grupo) que estão associadas a pelo menos três vias bioquímicas, após análise de enriquecimento e comparação com três bancos de dados (ver APÊNDICE B). As proteínas estão agrupadas em perfis que exibem níveis de expressão semelhantes. As células HaCaT apresentaram um único perfil, enquanto as células L929 e OFCOL II apresentaram três e dois perfis, respectivamente. As proteínas listadas em caixa alta referem-se a proteínas de origem humana. A via de resposta ao estresse abrange reações a vários fatores estressores, como fatores ambientais, biológicos ou mecânicos, enquanto o estresse oxidativo refere-se aos mecanismos desencadeados por um desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes. Os perfis de expressão destacam diferenças específicas nas respostas proteicas entre as linhagens celulares: HaCaT (a) apresenta um perfil uniforme, com proteínas associadas predominantemente à produção de ATP e à resposta ao estresse; L929 (b-d) mostra uma segregação mais diversificada, com proteínas agrupadas em perfis relacionados à resposta ao estresse oxidativo (p1), ao sistema imunológico e à produção de ATP (p2) e à proliferação celular (p3). OFCOL II (e-f) apresenta dois perfis: o primeiro está relacionado ao sistema imunológico e à proliferação celular (p1), e o segundo, à produção de ATP e à resposta ao estresse (p2). Os gradientes de cor representam os níveis relativos de expressão proteica (azul para níveis reduzidos e vermelho para níveis elevados). Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Nos queratinócitos HaCaT, a expressão de proteínas relacionadas ao citoesqueleto aumentou com a dose de luz, atingindo níveis significativamente elevados em intensidades mais altas (50 mW/cm²).

Nos fibroblastos L929, houve uma diminuição na abundância de proteínas do citoesqueleto conforme a dose de luz aumentava. Já nos osteoblastos OFCOL II, as proteínas do citoesqueleto exibiram dois padrões distintos: um grupo com expressão reduzida à medida que a dose de luz aumentava, e outro com expressão elevada. Essa diversidade na expressão proteica entre as linhagens está alinhada às respostas viscoelásticas variadas observadas como resultado da absorção de luz.

Uma análise detalhada das proteínas relacionadas ao citoesqueleto em cada linhagem celular permitiu identificar os componentes modulados pela luz. Nos queratinócitos HaCaT, foram observadas proteínas associadas às três principais estruturas do citoesqueleto: F-actina (ACTB e ACTBL2), microtúbulos (TUBB e TUBA4B) e filamentos intermediários (KRT9). Além disso, foram expressas proteínas envolvidas na dinâmica de polimerização da F-actina, como FSCN1 e PFN1. A presença de ANXA1 foi notável, dada sua relevância na inflamação, proliferação e interações célula-matriz extracelular.

Nos fibroblastos L929, a absorção de luz afetou proteínas relacionadas aos microtúbulos (Tuba1b, Tuba1c, Tubb4b e Tubb5) e aos filamentos intermediários (Vim). A F-actina também foi impactada, com Actb superexpressa com maior intensidade por 10 minutos, enquanto Fscn1 foi superexpressa com intensidades mais baixas e por períodos mais curtos. Nessa linhagem, a Actb contribui principalmente para processos de resposta imune, diferentemente de seu papel estrutural predominante em HaCaT e OFCOL II.

Para os osteoblastos OFCOL II, identificaram-se proteínas relacionadas aos microtúbulos e às fibras de F-actina, cujos padrões de expressão dividiram-se em dois perfis: proteínas como Tuba1a, Tuba1b, Tuba4a, Actb e Actc1 tiveram expressão reduzida com o aumento da dose de luz, enquanto Tubb4b, Tubb6 e Actr3 apresentaram expressão aumentada. Outras proteínas reguladoras de actina, como Anxa1, Fscn1, Cap1 e Cfl1, também foram identificadas (Fu *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2016). As únicas proteínas relacionadas ao citoesqueleto presentes em todas as linhagens foram Actb e Fscn1, embora sua expressão tenha variado de acordo com as condições de irradiância e duração.

Essas proteínas são cruciais para os processos biológicos das células. A Actb (beta-actina) está envolvida na manutenção da estrutura do citoesqueleto e no suporte de funções celulares fundamentais, como motilidade e divisão celular. A Actbl2 é outra isoforma de actina que contribui para a organização do citoesqueleto. As principais constituintes dos microtúbulos,

a Tubb e a Tuba4b, participam do transporte intracelular e da segregação cromossômica durante a mitose. Os filamentos intermediários, representados por Vim e Krt9, fornecem resiliência mecânica às células e ajudam a manter sua integridade estrutural. Proteínas reguladoras, como a Fscn1 (que promove a formação de filamentos de actina) e a Pfn1 (que facilita a polimerização de actina), desempenham papéis essenciais na remodelação do citoesqueleto. Anxa1, Cap1 e Cfl1 estão associadas à resposta ao estresse e à regulação da dinâmica da actina, evidenciando o impacto multifacetado da luz sobre essas linhagens celulares.

As alterações observadas nos componentes do citoesqueleto destacam as diferentes composições estruturais e funções das linhagens celulares, refletindo sua plasticidade em resposta à luz. Esses resultados reforçam a complexidade da interação entre a fotobiomodulação e as proteínas do citoesqueleto, com implicações importantes para aplicações biomédicas e terapêuticas.

4.3 Correlação entre viscoelasticidade e proteômica

A correlação entre viscoelasticidade e proteômica foi investigada para compreender como as variações nas propriedades mecânicas das células se relacionam com a expressão proteica. A análise de correlação de Pearson foi utilizada para avaliar essa relação, permitindo uma comparação quantitativa entre os dois conjuntos de dados: (i) os valores medianos das propriedades viscoelásticas, que representam a resposta mecânica das células (Figura 32), e (ii) as pontuações z das abundâncias das proteínas individuais para cada grupo de irradiação (Figura 41).

Para as correlações envolvendo grupos de proteínas, as abundâncias brutas das proteínas individuais foram inicialmente somadas para gerar pontuações z combinadas. Essas pontuações z combinadas foram, então, correlacionadas com os parâmetros viscoelásticos, fornecendo uma visão mais abrangente das interações entre os componentes proteicos e as propriedades mecânicas das células. Essa abordagem permite identificar relações diretas entre proteínas específicas e propriedades viscoelásticas, além de revelar padrões mais amplos de interação entre o proteoma e o comportamento mecânico celular.

O método de correlação de Pearson, que avalia a intensidade e a direção da relação linear entre dois conjuntos de dados, foi empregado para determinar a força da associação entre os dados. Valores de correlação superiores a +0,7 são interpretados como correlações positivas fortes, indicando que as alterações na expressão proteica estão estreitamente relacionadas com

mudanças nas propriedades viscoelásticas. Por outro lado, valores abaixo de $-0,7$ sugerem correlações negativas fortes, indicando que o aumento ou a diminuição de proteínas específicas pode ter um efeito oposto nas propriedades viscoelásticas das células.

Esse tipo de análise é fundamental para entender como modificações no proteoma celular podem impactar a mecânica celular, o que tem implicações significativas na pesquisa de biologia celular, especialmente em estudos de doenças, como o câncer, onde as propriedades viscoelásticas das células podem ser alteradas. O estudo também pode abrir caminho para o desenvolvimento de biomarcadores para o diagnóstico e monitoramento de doenças baseadas em alterações nas propriedades mecânicas das células. O esquema detalhado do método utilizado está descrito no Material Suplementar.

4.4 Integração analítica e correlações dos perfis celulares

Nesta seção, realizamos a integração analítica entre os dados proteômicos e as propriedades biomecânicas das linhagens celulares. Esta estruturação reflete o escopo e os resultados detalhados no artigo principal desta tese, intitulado “Biomechanical Insights into the Proteomic Profiling of Cells in Response to Red Light Absorption” (artigo de pesquisa, **n. smll.202410062R1**), publicado no periódico *Small* (Silva *et al.*, 2025). A apresentação conjunta das correlações estatísticas e dos detalhes metodológicos nesta seção visa conferir rigor técnico à análise de dados, reservando-se ao Capítulo 5 a discussão integrativa sobre os mecanismos biológicos e o remodelamento do citoesqueleto em resposta à fotobiomodulação.

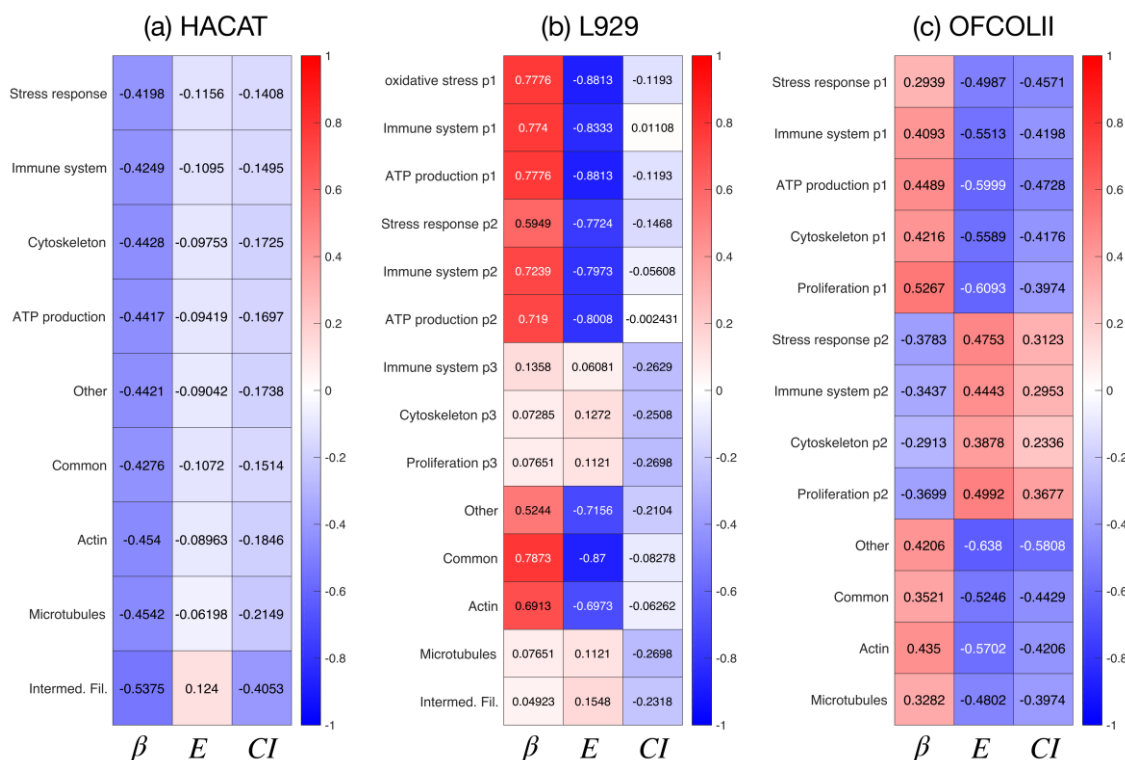
O citoesqueleto é um sistema altamente dinâmico, modulado por sinais intra e extracelulares, que fornece suporte mecânico e flexibilidade, controlando, assim, a forma e a função celular. Nosso principal objetivo é investigar os efeitos da absorção de luz no citoesqueleto e estabelecer uma relação direta entre a expressão proteica e as mudanças na rigidez ou na suavidade celular, utilizando dados proteômicos para essa conexão. Essa abordagem é viável porque as proteínas identificadas podem interagir com diversas vias de sinalização que influenciam a organização do citoesqueleto.

Neste estudo, focamos em correlacionar os dados mecânicos com a expressão proteica induzida pela luz para compreender como a absorção de luz vermelha afeta a viscoelasticidade das células (HaCaT, L929 e OFCOL II). Utilizando o mesmo formalismo de correlação de Pearson detalhado na seção 4.3, esta análise envolveu dois conjuntos de dados: (i) os escores-z das abundâncias individuais de proteínas obtidas por espectrometria de massa (Figura 41) e (ii) os valores medianos das propriedades viscoelásticas, como o expoente de

fluidez ou o módulo elástico, ambos medidos por AFM, apresentados na Figura 32. Para avaliar a correlação das propriedades biomecânicas com grupos de proteínas, somamos as abundâncias brutas obtidas por espectrometria de massa para gerar um escore-z combinado para cada grupo, antes de calcular sua correlação com os parâmetros viscoelásticos. Um esquema detalhado dessa metodologia está disponível no material anexo. Os mapas de calor resultantes, que ilustram a relação entre as propriedades viscoelásticas e a expressão proteica induzida pela luz para cada tipo celular, estão apresentados na Figura 42.

Nas células HaCaT, todas as proteínas identificadas na análise de enriquecimento (ver Figura 41) mostraram uma correlação negativa moderada com a fluidez celular, mas não com o módulo de elasticidade. Proteínas de actina e microtúbulos também demonstraram correlação moderada com os expoentes de fluidez. O grupo de filamentos intermediários, particularmente proteínas relacionadas à queratina, exibiu a maior correlação com a fluidez. Interessante notar, que apesar de apenas a F-actina ter sido marcada para a imagem confocal, o grupo de filamentos intermediários apresentou a correlação negativa mais forte com o sinal de intensidade confocal. Esses achados sugerem que as alterações biomecânicas induzidas pela luz nas células HaCaT estão relacionadas à modulação de filamentos intermediários e fibras de F-actina, com alterações significativas afetando predominantemente a rede de queratina.

Figura 42 – Correlações de Pearson para HaCaT, L929 e OFCOLII.



Mapas de calor das correlações de Pearson entre os valores médios dos dados viscoelásticos das Figuras 32d–i e o z-score da abundância combinada das proteínas identificadas em cada perfil da Figura 41. As colunas de dados indicadas por β , E e CI correspondem, respectivamente, à correlação com o expoente de fluidez, o módulo de elasticidade e a intensidade média confocal. Foram incluídos também grupos adicionais de proteínas na análise: o grupo “other” abrange todas as proteínas identificadas que não foram destacadas na análise de enriquecimento da Figura 41, enquanto o grupo “common” é composto pelas proteínas encontradas em todas as linhas celulares, independentemente de terem sido apresentadas na. Os grupos de Actina, microtúbulos e filamentos intermediários referem-se às proteínas associadas aos principais componentes do citoesqueleto. A lista das proteínas desses grupos adicionais está disponível no material em anexo. Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Nas células L929, as proteínas dos perfis p1 e p2 apresentaram uma forte correlação com as propriedades viscoelásticas, especificamente uma correlação positiva com a fluidez celular e uma correlação negativa com o módulo de elasticidade. Ressalta-se o fato de proteínas associadas à resposta ao estresse oxidativo, ao sistema imunológico e à produção de ATP estão fortemente correlacionadas com a viscoelasticidade celular, enquanto a via do citoesqueleto não apresenta correlação alguma. Entre as proteínas relacionadas à actina, a Actb, que está ligada à resposta imunológica nas células L929 (perfil p1), contribui significativamente para a alta correlação do grupo de actina. Em contraste, os grupos de proteínas relacionadas a microtúbulos ou filamentos intermediários não apresentaram correlação com as propriedades viscoelásticas.

Além disso, nenhum dos grupos apresentou correlação com o sinal de intensidade confocal, apesar de sua aparente dependência da irradiação, conforme demonstrado na Figura 39. Para as células L929, os dados de correlação sugerem que as mudanças biomecânicas induzidas pela luz estão exclusivamente ligadas à rede de F-actina.

Nas células OFCOL II, os perfis p1 e p2 apresentaram correlações opostas com as propriedades viscoelásticas e os sinais de intensidade confocal, sendo que as proteínas no perfil p1 exibiram correlações ligeiramente mais fortes do que aquelas no perfil p2. Muitos dos processos biológicos ativados, incluindo os relacionados ao citoesqueleto, apresentaram proteínas super ou subexpressas. Os processos de proliferação e remodelamento do citoesqueleto estão alinhados com a viabilidade celular aumentada e os padrões de motilidade flutuantes observados nas Figura 36, apresentando correlação moderada com as propriedades biomecânicas. Entre os principais componentes do citoesqueleto, apenas proteínas relacionadas à F-actina e aos microtúbulos foram expressas, e elas exibiram correlações mais fortes com o módulo de elasticidade. No entanto, como ilustram as Figuras 32f,i, a biomecânica das OFCOL II é quase insensível à absorção de luz, provavelmente devido às tendências de correlação opostas nos perfis p1 e p2.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O estudo realizado nesta parte da tese investigou a correlação entre biomecânica celular e proteômica em resposta à absorção de luz vermelha, revelando respostas variadas induzidas pela luz entre diferentes linhagens celulares. Essas variações provavelmente refletem as distintas características morfológicas e funcionais de cada tipo celular. No entanto, apesar dessas diferenças, algumas respostas específicas foram compartilhadas entre as linhagens. A análise proteômica revelou a ativação de processos biológicos, como resposta imune, proliferação celular, produção de ATP, resposta ao estresse e remodelamento do citoesqueleto, após a absorção de luz. Embora os mecanismos precisos subjacentes a esses efeitos ainda não sejam totalmente compreendidos, os resultados estão alinhados com a literatura existente (Dompe *et al.*, 2020; Ishimoto; Mori, 2022; Karu, 2008).

O grau de correlação entre proteínas associadas a esses processos biológicos e as propriedades biomecânicas variou de acordo com o tipo celular. Em células HaCaT, a expressão proteica apresentou correlação moderada exclusivamente com a fluidez celular. Em células L929, proteínas de dois dos três perfis identificados (p1 e p2) exibiram as correlações mais fortes tanto com a fluidez quanto com o módulo de elasticidade celular. Por outro lado, em células OFCOL II, os dois perfis proteicos identificados demonstraram tendências de correlação opostas com a fluidez e o módulo de elasticidade, destacando a natureza específica de cada tipo celular nas respostas induzidas pela luz.

Para todas as linhagens celulares, sempre que observadas correlações moderadas a fortes entre grupos de proteínas e propriedades biomecânicas, os sinais das correlações com fluidez e módulo de elasticidade eram sempre opostos. Esse padrão é consistente com a relação inversa entre essas propriedades relatada em estudos anteriores (Fabry *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2015; Kollmannsberger; Fabry, 2011; Kollmannsberger; Mierke; Fabry, 2011). Além disso, as diferenças nas magnitudes de correlação para fluidez e módulo de elasticidade sugerem que essas propriedades biomecânicas podem ser reguladas de forma independente pela expressão proteica. Isso é evidente em células HaCaT, onde a expressão proteica correlacionou-se apenas com a fluidez celular, com exceção de proteínas relacionadas à queratina, que apresentaram uma fraca correlação positiva com a elasticidade.

As correlações com a intensidade confocal espelharam os sinais de correlação observados para a elasticidade celular, sugerindo que o citoesqueleto de F-actina predominantemente determina o módulo de elasticidade. A exceção a essa tendência foram as proteínas relacionadas à queratina em células HaCaT, indicando que os filamentos

intermediários de queratina desempenham um papel crucial na rigidez dos queratinócitos. No nível celular, a viscoelasticidade regula processos essenciais, como manutenção da forma, divisão e migração, todos dependentes das propriedades físicas dos sistemas citoesqueléticos (Mierke, 2022). Assim, a interpretação das respostas viscoelásticas diversas deve considerar as funções biológicas desempenhadas pelas células e seu microambiente local.

Em células HaCaT, a absorção de luz resultou em aumento da rigidez até um limite de intensidade de 25 mW/cm² aplicado por 20 minutos, conforme mostrado na Figura 32d. Essa resposta de enrijecimento foi corroborada pelo aumento na intensidade confocal média (Figura 39). Essa reação pode estar ligada à função primária de barreira dos queratinócitos, que são abundantes na pele e produzem queratina para formar uma barreira protetora contra patógenos, perda de água e danos ambientais, incluindo exposição à luz solar (Juráňová; Franková; Ulrichová, 2017).

Para células OFCOL II, as propriedades viscoelásticas foram amplamente insensíveis à absorção de luz. Como células especializadas na formação óssea, os osteoblastos são responsáveis pela síntese e secreção da matriz óssea e pela facilitação do processo de mineralização, que endurece o tecido ósseo (Neve; Corrado; Cantatore, 2011). Essas células priorizam a proliferação celular (como observado na Figura 36) em detrimento de alterações biomecânicas, visando cumprir sua função na regeneração óssea.

Por outro lado, as células L929 exibiram a resposta viscoelástica mais pronunciada, tornando-se mais macias e fluidas em todas as intensidades de luz irradiada. Essas células também apresentaram as correlações mais fortes entre a expressão proteica induzida pela luz e as propriedades viscoelásticas. Nas células L929, a proteína ACTB, normalmente associada à via do citoesqueleto em células HaCaT e OFCOL II, foi identificada na via de resposta imune. Isso destaca o papel crítico dos fibroblastos no sistema imunológico. Os fibroblastos contribuem para a reparação tecidual e resolução da inflamação, produzindo e mantendo a matriz extracelular, bem como secretando citocinas e quimiocinas (Kendall; Feghali-Bostwick, 2014; Moretti *et al.*, 2022; Wei; Nguyen; Brenner, 2021). Sua motilidade, essencial para a cicatrização de feridas, é modulada por alterações nas propriedades viscoelásticas, permitindo migração eficiente pelos tecidos até os locais de lesão.

Nesse contexto, a fluidez aumentada e a elasticidade reduzida observadas nas células L929 irradiadas podem melhorar sua motilidade, auxiliando na reparação tecidual. Esse fenômeno é semelhante à elasticidade reduzida e à motilidade aprimorada observadas em células cancerígenas invasivas em comparação com células normais (Cross *et al.*, 2008; De Sousa *et al.*, 2021; Fuhs *et al.*, 2022).

Para as linhagens C2C12, MG-63 e RAW 264.7, há indicação de respostas celulares distintas para diferentes condições de potência e tempo de exposição à luz. Os resultados de viabilidade celular demonstraram que a irradiação provocou efeito positivo na linhagem C2C12, enquanto nas linhagens MG-63 e RAW 264.7, o efeito variou conforme o tempo de exposição e a intensidade da radiação.

Na linhagem C2C12, houve um aumento significativo da viabilidade celular após 10 e 20 minutos de irradiação, com uma tendência de maior resposta na intensidade de 50 mW/cm². Estudos anteriores indicam que a bioestimulação por luz vermelha e infravermelha pode favorecer a proliferação e diferenciação de mioblastos, promovendo recuperação muscular e aumento na atividade metabólica celular (Chaudary *et al.*, 2020; Shefer *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2016).

A linhagem MG-63 apresentou um padrão distinto. Observou-se um aumento na viabilidade celular com 10 minutos de irradiação, mas um leve decréscimo na condição de 20 minutos, sugerindo uma resposta adaptativa às condições experimentais. Esse efeito pode estar relacionado à sensibilidade dessas células ao estresse oxidativo induzido por radiação, um fenômeno previamente relatado em estudos que investigaram os efeitos da fotobiomodulação sobre células tumorais osteogênicas (Andrukhov *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2021).

As células RAW 264.7, derivadas de macrófagos murinos, também apresentaram uma resposta diferenciada. A viabilidade celular aumentou significativamente após 20 minutos de irradiação, especialmente na potência de 50 mW/cm². Esse resultado é compatível com a literatura, que sugere que a fotobiomodulação pode influenciar a atividade macrofágica, estimulando a proliferação e modulando a produção de citocinas inflamatórias (De Brito Sousa *et al.*, 2020; Hamblin, 2017).

O ensaio de fechamento de ferida também demonstrou diferenças entre as linhagens. As células C2C12 apresentaram um aumento na taxa de fechamento da ferida ao longo de 24 horas, reforçando a ideia de que a irradiação pode promover a migração e proliferação celular. Já as células RAW 264.7 e MG-63 tiveram um padrão menos pronunciado, com maior variabilidade na resposta. Esse comportamento pode ser explicado pela diferença na função biológica dessas células e pelo impacto diferencial da fotobiomodulação sobre a adesão celular e remodelamento tecidual.

De acordo com os dados obtidos na seção de viscoelasticidade, cada linhagem apresenta uma reação distinta à fotobiomodulação. Os macrófagos RAW exibiram um enrijecimento acentuado apenas sob maior dose e duração de luz, refletindo sua função imune e remodelamento rápido do citoesqueleto. Os fibroblastos L929 amoleceram consistentemente,

com queda de E e elevação da fluidez, condizentes com sua necessidade de plasticidade durante a cicatrização. Os mioblastos C2C12 mantiveram rigidez moderada, aumentando E de forma discreta em altas doses. Por sua vez, as células ósseas apresentaram contraste marcante. Enquanto a estabilidade mecânica foi mantida no OFCOL II, observou-se um aumento do módulo elástico e uma redução da fluidez na MG-63. Isso sugere que a estrutura citoesquelética de osteossarcomas bem diferenciados pode ser reforçada em resposta a estímulos externos. Esses achados reforçam que a rigidez e a fluidez celulares não seguem um único padrão em tumores versus células saudáveis, mas sim um perfil dependente da identidade e do estado de diferenciação de cada linhagem, apoiando o uso de parâmetros viscoelásticos como potenciais biomarcadores de resposta à FBM.

6 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Esta tese investigou os efeitos da fotobiomodulação sobre o perfil proteômico, a viabilidade, a motilidade e as propriedades biomecânicas de diferentes linhagens celulares, incluindo queratinócitos (HaCaT), fibroblastos (L929), osteoblastos (OFCOL II), mioblastos, osteossarcoma (MG-63) e macrófagos (RAW 264.7). Os resultados demonstraram que a aplicação de luz vermelha ($\lambda = 633$ nm) em intensidades de 25 e 50 mW/cm², com tempos de exposição de 10 e 20 minutos, promoveu alterações significativas nos processos celulares. Nas células L929, observou-se uma redução média de 25% no módulo de elasticidade e aumento significativo na fluidez, acompanhados por uma elevação de até 70% na migração após 24 h de irradiação. A viabilidade dessas células aumentou em exposições de baixa intensidade (25 mW/cm², 20 min) e diminuiu em intensidades mais altas (50 mW/cm²). Nas células HaCaT, o módulo de elasticidade aumentou em até 50% na condição IR25T20, enquanto a fluidez foi reduzida na maioria dos grupos irradiados. Os osteoblastos, OFCOL II, apresentaram pouca variação significativa nas propriedades viscoelásticas, com alterações menores que 10%. As análises proteômicas indicaram correlações fortes (coeficiente de Pearson > 0,7) entre expressão proteica e alterações biomecânicas, particularmente envolvendo proteínas relacionadas ao citoesqueleto, como ACTB e FSCN1, e processos como resposta imune e produção de ATP. Essas mudanças moleculares foram associadas ao remodelamento da rede de F-actina, evidenciado também pela intensidade em imagens de microscopia confocal.

Nos mioblastos C2C12 e macrófagos RAW 264.7, a irradiação, mais acentuada na intensidade de 50 mW/cm², induziu aumento da viabilidade e da motilidade, com fechamento quase completo da ferida em 24 horas para os mioblastos. As células MG-63 não mostraram ganhos expressivos de viabilidade, apesar da alta responsividade migratória inicial. Os macrófagos RAW 264.7 apresentaram o maior enrijecimento entre todas as linhagens, com módulo elástico atingindo mediana de ~ 4 kPa no grupo I50T20. As células tumorais MG-63 revelaram módulo elástico inicial próximo a 2 kPa com tendência à redução sob exposição luminosa, divergindo do perfil viscoelástico da linhagem saudável OFCOL II.

As evidências moleculares forneceram hipóteses importantes para os mecanismos que explicam as alterações biomecânicas observadas nas seis linhagens; entretanto, a extrapolação direta para C2C12, MG-63 e RAW 264.7 requer confirmação experimental adicional. Estudos futuros devem ampliar a análise proteômica às demais linhagens ou realizar validações direcionadas, como Western blot, qPCR (PCR quantitativa) ou imunomarcção

dirigida para os marcadores previamente identificados, a fim de testar a aplicabilidade e a generalidade das vias aqui descritas. Apesar dessa limitação, a robustez dos resultados biomecânicos e dos sinais moleculares identificados sustenta as conclusões centrais do trabalho e orienta hipóteses testáveis para pesquisas futuras.

A integração dos dados obtidos evidencia que as respostas celulares aos estímulos luminosos dependem fortemente tanto das características intrínsecas de cada linhagem quanto dos parâmetros experimentais utilizados. Esse entendimento corrobora estudos prévios na literatura, abrindo novas perspectivas para a aplicação clínica e experimental da fotobiomodulação, sobretudo na área de reparo tecidual e no tratamento de doenças degenerativas e oncológicas.

No que diz respeito às perspectivas futuras, destaca-se a preparação e caracterização de esferoides com todas as linhagens celulares estudadas (ver 142). A formação de esferoides, que já foi realizada com sucesso recentemente, permite a criação de modelos tridimensionais que se assemelham mais fielmente à microarquitetura dos tecidos *in vivo*. Nesse sentido, a cultura bidimensional é uma limitação metodológica, pois a interação das células com substratos rígidos pode produzir efeitos biomecânicos diferentes do real, no contato célula-célula. Entre as principais vantagens do cultivo em 3D e o uso de esferoides, pode-se citar a melhor mimetização do ambiente fisiológico: os esferoides promovem interações célula-célula e célula-matriz mais próximas das condições reais do organismo, permitindo a formação de gradientes de oxigênio, nutrientes e metabólitos. Estudos em cultura 3D refletem mais precisamente a resposta dos tecidos aos estímulos, o que possibilita a replicação dos resultados experimentais em aplicações clínicas.

Sob essa óptica, os modelos 3D permitem verificar como a heterogeneidade estrutural e as barreiras físicas influenciam a migração e a invasão celular, variáveis críticas para o avanço da oncologia e da medicina regenerativa. A transição da análise de viscoelasticidade para o ambiente dos esferoides oferecerá uma compreensão integral do comportamento mecânico celular em condições de maior relevância biológica. Portanto, a continuidade deste trabalho será direcionada à implementação dessas plataformas tridimensionais, aproveitando o aprendizado já obtido para aprofundar a análise dos mecanismos biofísicos e proteômicos. Essa abordagem possui o potencial de aproximar a biofísica de bancada da otimização de protocolos terapêuticos e das futuras intervenções clínicas.

REFERÊNCIAS

- AHN, Ki Bum *et al.* Irradiation by gallium–aluminum–arsenate diode laser enhances the induction of nitric oxide by *Porphyromonas gingivalis* in RAW 264.7 cells. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 9, p. 1259–1265, 1 set. 2014.
- ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALGHAMDI, Khalid M.; KUMAR, Ashok; MOUSSA, Noura A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in Medical Science**, [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0885-2>. Acesso em: 17 jun. 2023.
- ALVAREZ, Irene *et al.* Abstract #2369: effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on UV radiation-induced lipid peroxidation products in skin cancer models. **Cancer Research**, v. 69, n. 9_Supplement, p. 2369–2369, 1 maio 2009.
- ANDERS, Juanita J.; LANZAFAME, Raymond J.; ARANY, Praveen R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 183–184, 2015.
- ANDRUKHOV, Oleh *et al.* Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness. **Dental Materials**, v. 32, n. 11, p. 1374–1384, 1 nov. 2016.
- AON. **2019 Global medical trend rates report global benefits**. [S. l.: s. n.], 2018. 34 p. Disponível em: <https://www.aon.com/getmedia/0c375f10-3b16-4d2d-a452-4ae86968525b/2019-Global-Medical-Trend-Report.pdf.aspx>. Acesso em: 19 abr. 2020.
- ASKALSKY, Paula; IOSIFESCU, Dan V. Transcranial photobiomodulation for the management of depression: current perspectives. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, p. 3255–3272, 2019.
- AVCI, Pinar *et al.* Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 41–52, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24049929>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- BAKSHANDEH, Behnaz *et al.* Recent progress in the manipulation of biochemical and biophysical cues for engineering functional tissues. **Bioengineering & Translational Medicine**, v. 8, n. 2, p. e10383, 1 mar. 2023.
- BALL, Kerri A.; CASTELLO, Pablo R.; POYTON, Robert O. Low intensity light stimulates nitrite-dependent nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by cytochrome c oxidase: implications for phototherapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Switzerland, v. 102, n. 3, p. 182–191, 2011.
- BALLAND, M. *et al.* Power laws in microrheology experiments on living cells: comparative analysis and modeling. **Physical Review E**, v. 74, n. 2, p. 21911, 24 mar. 2006.
- BARTALENA, Guido *et al.* A novel method for assessing adherent single-cell stiffness in tension: design and testing of a substrate-based live cell functional imaging device. **Biomedical Microdevices**, v. 13, n. 2, p. 291–301, 2011.

- BAXTER, G. David *et al.* Low level laser therapy (photobiomodulation therapy) for breast cancer-related lymphedema: a systematic review. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 833, 7 dez. 2017.
- BECK JR., George R. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 234–243, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.10622>. Acesso em: 22 out. 2024.
- BERNI, Micaela *et al.* The role of low-level laser therapy in bone healing: systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, 2023.
- BERNING, Manuel *et al.* Three-dimensional in vitro skin and skin cancer models based on human fibroblast-derived matrix. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 21, n. 9, p. 958–970, 1 set. 2015.
- BHADRIRAJU, Kiran; HANSEN, Linda K. Extracellular matrix-and cytoskeleton-dependent changes in cell shape and stiffness. **Experimental Cell Research**, v. 278, n. 1, p. 92–100, 2002.
- BILLIAU, A. *et al.* Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 12, n. 1, p. 11–15, 1 jul. 1977.
- BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, Ch. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930–933, 3 mar. 1986.
- BODOR, Dani L. *et al.* Of cell shapes and motion: the physical basis of animal cell migration. **Developmental Cell**, v. 52, n. 5, p. 550–562, 9 mar. 2020.
- BRASSOLATTI, Patricia *et al.* Evaluation of the low-level laser therapy application parameters for skin burn treatment in experimental model: a systematic review. **Lasers in Medical Science**, England, v. 33, n. 5, p. 1159–1169, 2018.
- BROEDERSZ, Chase P.; MACKINTOSH, Fred C. Modeling semiflexible polymer networks. **Reviews of Modern Physics**, v. 86, n. 3, p. 995–1036, 2014.
- BURATTINI, S. *et al.* C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. **European Journal of Histochemistry**, v. 48, n. 3, p. 223–233, set. 2004.
- BUSTAMANTE, Carlos J. *et al.* Optical tweezers in single-molecule biophysics. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, p. 25, 2021.
- CALDIERARO, Marco A.; CASSANO, Paolo. Transcranial and systemic photobiomodulation for major depressive disorder: a systematic review of efficacy, tolerability and biological mechanisms. **Journal of Affective Disorders**, v. 243, p. 262–273, 15 jan. 2019.
- CARRETERO, Marta *et al.* In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 1, p. 223–236, 1 jan. 2008.
- CHANDRASEKHAR, S. **Radiative heat transfer**. New York: Dover Publications, 1960. p. 11–12.
- CHANG, Angela Y. *et al.* Past, present, and future of global health financing: a review of development assistance, government, out-of-pocket, and other private spending on health for

- 195 countries, 1995-2050. **The Lancet**, [S. l.], v. 393, n. 10187, p. 2233–2260, 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30841-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30841-4). Acesso em: 1 mar. 2021.
- CHANG, Yin-Yu *et al.* Biological characteristics of the MG-63 human osteosarcoma cells on composite tantalum carbide/amorphous carbon films. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95590, 23 abr. 2014.
- CHAUDARY, Sidrah *et al.* In vitro effects of 635 nm photobiomodulation under hypoxia/reoxygenation culture conditions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 209, p. 111935, 2020.
- CHEONG, W. F.; PRAHL, S. A.; WELCH, A. J. A review of the optical properties of biological tissues. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 2166–2185, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/3.64354>. Acesso em: 22 out. 2024.
- CHOW, Roberta T. *et al.* Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. **The Lancet**, v. 374, n. 9705, p. 1897–1908, 5 dez. 2009.
- CHUNG, Hoon *et al.* The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 516–533, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0454-7>. Acesso em: 7 mar. 2022.
- CIOS, Aleksandra *et al.* Effect of different wavelengths of laser irradiation on the skin cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, 2021.
- CLARK, Mary Ann; DOUGLAS, Matthew; CHOI, Jung. **Biology 2e**. Houston, Texas: OpenStax, 2018.
- COSTA, D. F. S. *et al.* Nanoindentation in finite thickness viscoelastic materials. **Journal of Applied Physics**, v. 132, n. 21, 2022.
- CROSS, Sarah E. *et al.* Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 780–783, 1 dez. 2007.
- CROSS, Sarah E. *et al.* AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. **Nanotechnology**, v. 19, n. 38, p. 384003, 12 ago. 2008.
- CRUVINEL, Wilson de Melo *et al.* Sistema imunitário: parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, 2010.
- DARLING, Eric M. *et al.* Viscoelastic properties of human mesenchymally-derived stem cells and primary osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. **Journal of Biomechanics**, v. 41, n. 2, p. 454–464, 2008.
- DE ABREU, Priscila Thaís Rodrigues *et al.* Photobiomodulation effects on keratinocytes cultured in vitro: a critical review. **Lasers in Medical Science**, England, v. 34, n. 9, p. 1725–1734, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02813-5>. Acesso em: 9 dez. 2022.
- DE AZEVEDO, Judson Welber Veríssimo *et al.* Biology and pathogenesis of human osteosarcoma (review). **Oncology Letters**, v. 19, n. 2, p. 1099–1116, 1 fev. 2020.
- DE BRITO SOUSA, Kaline *et al.* Differential expression of inflammatory and anti-inflammatory mediators by M1 and M2 macrophages after photobiomodulation with red or infrared lasers. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 2, p. 337–343, 2020.

DE FARIA, Clara Maria Gonçalves *et al.* Effects of photobiomodulation on the redox state of healthy and cancer cells. **Biomedical Optics Express**, v. 12, n. 7, p. 3902, jul. 2021.

DE FÁTIMA GOEBEL DE SOUZA, Tamiris *et al.* Human keratinocyte (HaCaT) stimulation and healing effect of the methanol fraction from the decoction from leaf from *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn on experimental burn wound model. **bioRxiv**, p. 2020.03.29.013839, 1 jan. 2020.

DE MARCHI, Thiago *et al.* Effects of photobiomodulation therapy combined with static magnetic field in severe COVID-19 patients requiring intubation: a pragmatic randomized placebo-controlled trial. **Journal of Inflammation Research**, [S. l.], v. 14, p. 3569–3585, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/JIR.S318758>. Acesso em: 12 mar. 2025.

DE MARCHI, Thiago *et al.* Can photobiomodulation therapy (PBMT) minimize exercise-induced oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, 2022.

DE SOUSA, F. B. *et al.* Multiple power-law viscoelastic relaxation in time and frequency domains with atomic force microscopy. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 54, n. 33, p. 335401, 4 jun. 2021.

DE SOUSA, J. S. *et al.* Analytical model of atomic-force-microscopy force curves in viscoelastic materials exhibiting power law relaxation. **Journal of Applied Physics**, [S. l.], v. 121, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.4974043>. Acesso em: 12 mar. 2022.

DE SOUSA, J. S. *et al.* Double power-law viscoelastic relaxation of living cells encodes motility trends. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 4749, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61631-w>. Acesso em: 19 fev. 2025.

DE SOUSA, Marcelo Victor Pires *et al.* Pain management using photobiomodulation: mechanisms, location, and repeatability quantified by pain threshold and neural biomarkers in mice. **Journal of Biophotonics**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2018.

DIGITAL INSTRUMENTS VMG. **Force imaging**. [S. l.: s. n.], 1999.

DOCHEVA, Denitsa *et al.* Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 537–552, abr. 2008.

DOMPE, Claudia *et al.* Photobiomodulation—underlying mechanism and clinical applications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, 2020.

EELLS, Janis T. *et al.* Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**, v. 4, n. 5–6, p. 559–567, 2004.

EFREMOV, Yuri M. *et al.* Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from AFM force-displacement curves. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1541, 8 maio 2017.

ELTING, Mary Williard; SURESH, Pooja; DUMONT, Sophie. The spindle: integrating architecture and mechanics across scales. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 11, p. 896–910, 1 nov. 2018.

FABRY, Ben *et al.* Scaling the microrheology of living cells. **Physical Review Letters**, v. 87, n. 14, p. 148102, 13 set. 2001.

- FERRARESI, Cleber *et al.* Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3–6 h. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 2, p. 411–416, 2015.
- FITZPATRICK, T. B.; PATHAK, M. A. Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins. **The Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 32, n. 2, Part 2, p. 229–231, 1959.
- FLETCHER, Daniel A.; MULLINS, R. Dyche. Cell mechanics and the cytoskeleton. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 485–492, 1 jan. 2010.
- FREITAS, Lucas Freitas De; HAMBLIN, Michael R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 348–364, jul. 2016.
- FU, Fangzhi *et al.* Role of actin-binding proteins in prostate cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 1430386, 2024.
- FUHS, Thomas *et al.* Rigid tumours contain soft cancer cells. **Nature Physics**, v. 18, n. 12, p. 1510–1519, 2022.
- GACTO-SANCHEZ, P. Surgical treatment and management of the severely burn patient: review and update. **Medicina Intensiva**, Spain, v. 41, n. 6, p. 356–364, 2017.
- GARCIA, Pablo D.; GUERRERO, Carlos R.; GARCIA, Ricardo. Nanorheology of living cells measured by AFM-based force-distance curves. **Nanoscale**, v. 12, n. 16, p. 9133–9143, 2020.
- GARDEL, Margaret L. *et al.* Chapter 19: Mechanical response of cytoskeletal networks. In: **Methods in cell biology**. [S. l.]: Academic Press, 2008. v. 89, p. 487–519.
- GÁSPÁR, Lajos. Professor Endre Mester, the father of photobiomodulation. **J Laser Dent**, v. 17, n. 3, p. 146–148, 2009.
- GAVISH, Lilach *et al.* Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 5, p. 371–378, 1 jul. 2008.
- GENSBITTEL, Valentin *et al.* Mechanical adaptability of tumor cells in metastasis. **Developmental Cell**, v. 56, n. 2, p. 164–179, 25 jan. 2021.
- GLASS, Graeme E. **Photobiomodulation: a review of the molecular evidence for low level light therapy**. [S. l.]: Churchill Livingstone, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2020.12.059>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- GONG, Bo *et al.* Modeling and simulations of the dynamic behaviors of actin-based cytoskeletal networks. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, n. 8, p. 3720–3734, 12 ago. 2019.
- GONZÁLEZ-MUÑOZ, Ana *et al.* Efficacy of photobiomodulation therapy in the treatment of pain and inflammation: a literature review. In: **HEALTHCARE**, 2023. Anais [...]. [S. l.]: MDPI, 2023.
- GOUVEIA, Viviane Almeida *et al.* Photobiomodulation reduces cell death and cytokine production in C2C12 cells exposed to Bothrops venoms. **Lasers in Medical Science**, v. 35, p. 1047–1054, 2020.

- GRECO, Margherita *et al.* Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with Helium-Neon laser. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 163, n. 3, p. 1428–1434, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91138-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91138-8). Acesso em: 12 mar. 2024.
- GROSSWEINER, Leonard I. *et al.* **The science of phototherapy: an introduction**. [S. l.]: Springer, 2005. 374 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/1-4020-2885-7>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- GUO, Ming *et al.* Probing the stochastic, motor-driven properties of the cytoplasm using force spectrum microscopy. **Cell**, v. 158, n. 4, p. 822–832, 2014.
- GUPTA, Asheesh *et al.* Shining light on nanotechnology to help repair and regeneration. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 607–631, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.003>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- HAMBLIN, Michael R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337, 2017.
- HAMBLIN, Michael R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. **Photochemistry and Photobiology**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 199–212, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/php.12864>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- HAMBLIN, Michael R.; DEMIDOVA, Tatiana N. Mechanisms of low level light therapy. In: **Mechanisms for low-light therapy**. [S. l.]: SPIE, 2006. p. 614001. Disponível em: <https://doi.org/10.1117/12.646294>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- HAMBLIN, Michael R.; PIRES DE SOUSA, Marcelo Victor; AGRAWAL, Tanupriya. **Handbook of low-level laser therapy**. [S. l.: s. n.], 2016.
- HARRIS, David M. Editorial comment biomolecular mechanisms of laser biostimulation. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 277–280, 1991.
- HECHT, Fabian M. *et al.* Imaging viscoelastic properties of live cells by AFM: power-law rheology on the nanoscale. **Soft Matter**, v. 11, n. 23, p. 4584–4591, 2015.
- HELLINGWERF, Klaas J.; HENDRIKS, Johnny; GENSCH, Thomas. Photoactive yellow protein, a new type of photoreceptor protein: will this "yellow lab" bring us where we want to go? **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 107, n. 8, p. 1082–1094, 2003.
- HERTZ, H. Über die Berührung fester elastischer Körper. **Journal für die reine und angewandte Mathematik**, [S. l.], v. 92, p. 156–171, 1881.
- HESS, Alfred F.; WEINSTOCK, Mildred. Antirachitic properties imparted to inert fluids and to green vegetables by ultra-violet irradiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 301–313, 1 dez. 1924.
- HOCHMUTH, Robert M. Micropipette aspiration of living cells. **Journal of Biomechanics**, v. 33, n. 1, p. 15–22, 1 jan. 2000.
- HU, Zunguo *et al.* Current status and prospects of targeted therapy for osteosarcoma. **Cells**, v. 11, n. 21, 2022.
- HUANG, Ying-Ying *et al.* Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose-Response**, v. 7, n. 4, p. 358–383, 2009.

- HUANG, Ying-Ying *et al.* Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose-Response: a publication of International Hormesis Society**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 602–618, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- ISHIMOTO, Tetsuya; MORI, Hisashi. Control of actin polymerization via reactive oxygen species generation using light or radiation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022.
- JACQUES, Steven L. Optical properties of biological tissues: a review. **Physics in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 58, n. 11, p. R37–R61, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/11/r37>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- JANG, Yoonjeong *et al.* Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. **Toxicology**, v. 338, p. 37–46, 2 dez. 2015.
- JARRETT, Paul; SCRAGG, Robert. A short history of phototherapy, vitamin D and skin disease. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 16, n. 3, p. 283–290, 1 mar. 2017.
- JUNG, Wonyeong *et al.* Collective and contractile filament motions in the myosin motility assay. **Soft Matter**, v. 16, n. 6, p. 1548–1559, 2020.
- JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica I**. 12. ed. Rio de Janeiro: [s. n.], 2013.
- JURÁŇOVÁ, Jana; FRANKOVÁ, Jana; ULRICHOVÁ, Jitka. The role of keratinocytes in inflammation. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 15, n. 3, p. 169–179, 2017.
- KANG, Moon Sung *et al.* Biosafety of inorganic nanomaterials for theranostic applications. **Emergent Materials**, v. 5, n. 6, p. 1995–2029, 1 dez. 2022.
- KARU, Tiina. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, [S. l.], v. 56, n. 5, 1989. Disponível em: https://journals.lww.com/health-physics/Fulltext/1989/05000/Photobiology_of_Low_power_Laser_Effects.15.aspx. Acesso em: 12 mar. 2024.
- KARU, Tiina. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 1–17, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00219-X). Acesso em: 12 mar. 2024.
- KARU, Tiina I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 5, p. 1091–1099, 1 set. 2008.
- KARU, Tiina I. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 2, p. 159–160, 2010.
- KARU, Tiina I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 355–361, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.355>. Acesso em: 12 mar. 2024.
- KARU, Tiina I.; PYATIBRAT, Ludmila V.; AFANASYEVA, Natalia I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers in Surgery and Medicine**,

[S. l.], v. 36, n. 4, p. 307–314, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/lsm.20148>. Acesso em: 12 mar. 2024.

KARU, Tiina I.; PYATIBRAT, Ludmila V.; KALENDO, Galina S. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 211–216, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B306126D>. Acesso em: 12 mar. 2024.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 219–223, 1995.

KENDALL, Ryan T.; FEGHALI-BOSTWICK, Carol A. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 123, 2014.

KHAN, I. *et al.* Accelerated burn wound healing with photobiomodulation therapy involves activation of endogenous latent TGF- β 1. **Scientific Reports**, v. 11, p. 13371, 2021.

KIERSZENBAUM, Abraham L.; TRES, Laura L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KOLLMANNSBERGER, Philip; FABRY, Ben. Linear and nonlinear rheology of living cells. **Annual Review of Materials Research**, v. 41, n. 1, p. 75–97, 2011.

KOLLMANNSBERGER, Philip; MIERKE, Claudia Tanja; FABRY, Ben. Nonlinear viscoelasticity of adherent cells is controlled by cytoskeletal tension. **Soft Matter**, v. 7, n. 7, p. 3127–3132, 2011.

KOVÁCS, Iren B.; MESTER, E.; GÖRÖG, P. Stimulation of wound healing with laser beam in the rat. **Experientia**, v. 30, n. 11, p. 1275–1276, 1 nov. 1974.

KUFFLER, Damien P. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. **Regenerative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 107–122, 2016.

LANE, Nick. Cell biology: power games. **Nature**, v. 443, n. 7114, 2006.

LAURENT, Valérie M. *et al.* Assessment of mechanical properties of adherent living cells by bead micromanipulation: comparison of magnetic twisting cytometry vs optical tweezers. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 124, n. 4, p. 408–421, 2002.

LENOBLE, J. **Radiative transfer in scattering and absorbing atmospheres: standard computational procedures**. [S. l.]: A. Deepak Publishing, 1985.

LI, Liwei *et al.* Advances in research on cell models for skeletal muscle atrophy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115517, 1 nov. 2023.

LIEBERT, Ann *et al.* "Photobiomics": can light, including photobiomodulation, alter the microbiome? **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, [S. l.], v. 37, n. 11, p. 681–693, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/photob.2019.4628>. Acesso em: 9 dez. 2023.

LIMA, I. V. M. *et al.* Measuring the viscoelastic relaxation function of cells with a time-dependent interpretation of the Hertz-Sneddon indentation model. **Heliyon**, v. 10, n. 10, jul. 2024.

- LITSCHER, Gerhard. Laser watch—new generation 2021: modern integrative photomedicine equipment for photobiomodulation. **OBM Integrative and Complementary Medicine**, v. 6, n. 4, p. 037, 22 out. 2021.
- LITSCHER, Gerhard; AILIOAIE, Laura M. Comments on new integrative photomedicine equipment for photobiomodulation and COVID-19. **Photonics**, v. 8, n. 8, 2021.
- LIU, Hongjun *et al.* Redox-dependent transcriptional regulation. **Circulation Research**, [S. l.], v. 97, n. 10, p. 967–974, 2005.
- LODISH, Harvey F. *et al.* **Molecular cell biology**. [S. l.]: Macmillan, 2008.
- LUKACS, Andras; TONGE, Peter J.; MEECH, Stephen R. Photophysics of the blue light using flavin domain. **Accounts of Chemical Research**, v. 55, n. 3, p. 402–414, 2022.
- MACKEE, G. M. Ultraviolet therapy in dermatology. **Journal of the American Medical Association**, v. 93, n. 18, p. 1553–1561, 1932.
- MCGUFF, Paul E.; DETERLING, Ralph A.; GOTTLIEB, Leonard S. Tumoricidal effect of laser energy on experimental and human malignant tumors. **New England Journal of Medicine**, v. 273, n. 9, p. 490–492, 26 ago. 1965.
- MEDRADO, Alena R. A. P. *et al.* Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 239–244, 2003.
- MERCER MARSH BENEFITS. **2018 Medical trends around the world**. [S. l.: s. n.], 2019. 37 p.
- MESTER, Andrew; MESTER, Adam. The history of photobiomodulation: Endre Mester (1903–1984). **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 35, n. 8, p. 393–394, 1 ago. 2017.
- MESTER, E. *et al.* The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. **Laser Review**, v. 1, p. 3, 1 jan. 1968a.
- MESTER, E. *et al.* Untersuchungen über die hemmende bzw. fördernde Wirkung der Laserstrahlen. **Langenbecks Archiv für Klinische Chirurgie**, v. 322, n. 1, p. 1022–1027, 1 nov. 1968b.
- MESTER, E. *et al.* Effect of laser rays on wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 122, n. 4, p. 532–535, 1 out. 1971.
- MESTER, E. *et al.* The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers (preliminary report). **Zeitschrift für Experimentelle Chirurgie**, v. 8, n. 4, p. 258–262, 1975.
- MESTER, E. *et al.* Laser stimulation of wound healing. **Acta Chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 17, n. 1, p. 49–55, 1976.
- MESTER, E. *et al.* Stimulation of wound healing by means of laser rays: part III-- investigation of the effect on immune competent cells. **Acta Chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 19, n. 2, p. 163–170, 1978.
- MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 31–39, 1985.
- MESTER, Endre; SZENDE, Béla; GÄRTNER, P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. **Radiobiologia, Radiotherapia**, v. 9, n. 5, p. 621–626, 1968.

- MICHELOGIANNAKIS, Dimitrios *et al.* Influence of low-level laser therapy on orthodontically-induced inflammatory root resorption: a systematic review. **Archives of Oral Biology**, v. 100, p. 1–13, 2019.
- MIERKE, Claudia Tanja. The matrix environmental and cell mechanical properties regulate cell migration and contribute to the invasive phenotype of cancer cells. **Reports on Progress in Physics**, v. 82, n. 6, p. 064602, 21 maio 2019.
- MIERKE, Claudia Tanja. Editorial: editor's pick 2021: highlights in cell adhesion and migration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022.
- MIYAZONO, Kohei. TGF- β signaling by Smad proteins. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 11, n. 1, p. 15–22, 1 abr. 2000.
- MIZUNO, Daisuke *et al.* Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. **Science**, v. 315, n. 5810, p. 370–373, 19 jan. 2007.
- MONTANARI, Tatiana. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3. ed. Porto Alegre: [s. n.], 2016. E-book.
- MORETTI, Leandro *et al.* The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 2, 2022.
- MOURA, A. L. D. *et al.* Viscoelastic relaxation of fibroblasts over stiff polyacrylamide gels by atomic force microscopy. **Nano Express**, v. 4, n. 3, p. 035008, 5 set. 2023.
- MULLA, Yuval; AUFDERHORST-ROBERTS, Anders; KOENDERINK, Gijssje H. Shaping up synthetic cells. **Physical Biology**, v. 15, n. 4, p. 041001, 30 abr. 2018.
- MÜLLER, Daniel A.; SILVAN, Unai. On the biomechanical properties of osteosarcoma cells and their environment. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 63, n. 1–2, p. 1–8, 2019.
- MUSSTAF, Ruwaidah A.; JENKINS, David F. L.; JHA, Awadhesh N. Assessing the impact of low level laser therapy (LLL) on biological systems: a review. **International Journal of Radiation Biology**, v. 95, n. 2, p. 120–143, jul. 2019.
- NEJATIFARD, Marzieh *et al.* Probable positive effects of the photobiomodulation as an adjunctive treatment in COVID-19: a systematic review. **Cytokine**, [S. l.], v. 137, p. 155312, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155312>. Acesso em: 9 dez. 2023.
- NEUMAN, Keir C.; NAGY, Attila. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. **Nature Methods**, v. 5, n. 6, p. 491–505, 1 jun. 2008.
- NEVE, Anna; CORRADO, Addolorata; CANTATORE, Francesco Paolo. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. **Cell and Tissue Research**, v. 343, p. 289–302, 2011.
- NIEMZ, Markolf H. **Laser-tissue interactions: fundamentals and applications**. 3. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2007. v. 322.
- NOBEL PRIZE. **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1903**. [S. l.: s. n.], 2024. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1903/summary/>. Acesso em: 7 fev. 2025.

OREKHOV, Alexander N. *et al.* Monocyte differentiation and macrophage polarization. **Vessel Plus**, v. 3, p. 10, 2019.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **Brazil 2019**. [S. l.: s. n.], 2020. v. II, p. 1–6.

ORON, Uri. Light therapy and stem cells: a therapeutic intervention of the future? **Interventional Cardiology**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 627, 2011.

PALCZEWSKI, Krzysztof. G protein-coupled receptor rhodopsin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 743–767, 2006.

PASTORE, Donato *et al.* Increase in H^+/e^- -ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser. **Biochemistry and Molecular Biology International**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 817–826, 1994.

PASTORE, Saveria *et al.* Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 63, n. 2, p. 104–114, 1 ago. 2011.

PAUTKE, C. *et al.* Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. **Anticancer Research**, v. 24, n. 6, p. 3743–3748, 2004.

PEGORARO, Adrian F.; JANMEY, Paul; WEITZ, David A. Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 11, p. a022038, 2017.

PEPLOW, Philip V. *et al.* Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomedicine and Laser Surgery**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 285–304, 2011.

PHAN, Duc Tri *et al.* A flexible, and wireless LED therapy patch for skin wound photomedicine with IoT-connected healthcare application. **Flexible and Printed Electronics**, v. 6, n. 4, p. 045002, 18 out. 2021.

PLIKUS, Maksim V. *et al.* Fibroblasts: origins, definitions, and functions in health and disease. **Cell**, [S. l.], v. 184, n. 15, p. 3852–3872, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>. Acesso em: 7 fev. 2025.

POGODA, Katarzyna *et al.* In search of the correlation between nanomechanical and biomolecular properties of prostate cancer cells with different metastatic potential. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 697, p. 108718, 15 jan. 2021.

POSTEN, William *et al.* Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatologic Surgery**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 334–340, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31086>. Acesso em: 5 jul. 2024.

POYTON, Robert O.; BALL, Kerri A. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. **Discovery Medicine**, United States, v. 11, n. 57, p. 154–159, 2011.

QUINTO-SU, Pedro A.; VENUGOPALAN, Vasan. Mechanisms of laser cellular microsurgery. **Methods in Cell Biology**, United States, v. 82, p. 113–151, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)82004-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)82004-2). Acesso em: 5 jul. 2024.

RABEL, Kerstin *et al.* Controlling osteoblast morphology and proliferation via surface micro-topographies of implant biomaterials. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12810, 30 jul. 2020.

- RADMACHER, Manfred. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 16, n. 2, p. 47–57, 1997.
- RADMACHER, Manfred. Chapter 4: Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. In: **Methods in cell biology**. [S. l.]: Academic Press, 2002. v. 68, p. 67–90.
- RAHMANNIA, Maryam *et al.* Impact of photobiomodulation on macrophages and their polarization during diabetic wound healing: a systematic review. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 7, p. 2805–2815, 1 set. 2022.
- RALPH, Peter; NAKOINZ, Ilona. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. **Nature**, v. 257, n. 5525, p. 393–394, 1 out. 1975.
- REBELO, L. M. *et al.* Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. **Nanotechnology**, v. 24, n. 5, p. 055102, 16 jan. 2013.
- REINER, Markus. The Deborah number. **Physics Today**, v. 17, n. 1, p. 62, 1964.
- REIS, Amanda. **Impacto do envelhecimento sobre as despesas assistenciais da saúde suplementar (2020-2031) - Textos para discussão no 79-2021 (IESS)**. [S. l.: s. n.], 2021. 16 p. Disponível em: <https://bit.ly/36E6woP>. Acesso em: 5 jul. 2024.
- RICO, Félix *et al.* Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. **Physical Review E**, United States, v. 72, n. 2, p. 021914, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.72.021914>. Acesso em: 6 jul. 2024.
- RISS, Tammy L. *et al.* Cell viability assays. In: **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.
- RODRIGUEZ, Luis G.; WU, Xiaoyang; GUAN, Jun-Lin. Wound-healing assay. In: **Cell migration: developmental methods and protocols**. [S. l.]: Springer, 2005. p. 23–29.
- ROJAS, Julio C.; GONZALEZ-LIMA, F. Low-level light therapy of the eye and brain. **Eye and Brain**, p. 49–67, 2011.
- ROJAS, Julio C.; GONZALEZ-LIMA, F. Neurological and psychological applications of transcranial lasers and LEDs. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 447–457, 2013.
- SALEHPOUR, Farzad *et al.* Penetration profiles of visible and near-infrared lasers and light-emitting diode light through the head tissues in animal and human species: a review of literature. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 37, n. 10, p. 581–595, 1 out. 2019.
- SANCAR, Aziz. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 6, p. 2203–2238, 2003.
- SÁNCHEZ-MUÑOZ, Isabel *et al.* The use of adipose mesenchymal stem cells and human umbilical vascular endothelial cells on a fibrin matrix for endothelialized skin substitute. **Tissue Engineering Part A**, United States, v. 21, n. 1–2, p. 214–223, 2015.
- SANGHVI-SHAH, Rucha; WEBER, Gregory F. Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, 2017.

- SANTIAGO, T. M. **Estudo de propriedades mecânicas e morfológicas de hemácias em indivíduos portadores de anemia falciforme por microscopia de força atômica**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- SANTOS, J. A. C. *et al.* Thickness-corrected model for nanoindentation of thin films with conical indenters. **Soft Matter**, v. 8, n. 16, p. 4441–4448, jul. 2012.
- SCHAFFLER, Mitchell B. *et al.* Osteocytes: master orchestrators of bone. **Calcified Tissue International**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 5–24, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9790-y>. Acesso em: 6 jul. 2024.
- SENDER, Ron; FUCHS, Shai; MILO, Ron. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. **PLOS Biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 19 ago. 2016.
- SERRAGE, Hannah *et al.* Under the spotlight: mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1877–1909, 2019.
- SETIAWATI, Rosy; RAHARDJO, P. Bone development and growth. In: **Bone development and growth**. Rijeka: IntechOpen, 2019. Cap. 1. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.82452>. Acesso em: 6 jul. 2024.
- SHAO, J. Y.; HOCHMUTH, R. M. Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 5, p. 2892–2901, nov. 1996.
- SHEFER, Gabi *et al.* Primary myogenic cells see the light: improved survival of transplanted myogenic cells following low energy laser irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, n. 1, p. 38–45, 2008.
- SHEN, Min Ye; MICHAELSON, Jarett; HUANG, Hayden. Rheological responses of cardiac fibroblasts to mechanical stretch. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 430, n. 3, p. 1028–1033, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.044>. Acesso em: 6 ago. 2024.
- SHIN, Daehwan; ATHANASIOU, Kyriacos. Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 17, n. 6, p. 880–890, 1999.
- SHIVA, Sruti; GLADWIN, Mark T. Shining a light on tissue NO stores: near infrared release of NO from nitrite and nitrosylated hemes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 1–3, 2009.
- SILVA, Antônio V. S. *et al.* Biomechanical insights into the proteomic profiling of cells in response to red light absorption. **Small**, v. 21, n. 9, p. 2410062, 1 mar. 2025.
- SILVA, Luciana Miato Gonçalves *et al.* Photobiomodulation protects and promotes differentiation of C2C12 myoblast cells exposed to snake venom. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0152890, 2016.
- SILVENT, Jérémie *et al.* Collagen osteoid-like model allows kinetic gene expression studies of non-collagenous proteins in relation with mineral development to understand bone biomineralization. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. e57344, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057344>. Acesso em: 6 ago. 2024.
- SMITH, K. The first law of photochemistry and lasers. **Official Journal of the World Association for Laser Therapy**, [S. l.], v. 11, p. 162–163, 1999.

- SMITS, Jos P. H. *et al.* Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11838, 19 set. 2017.
- SNEDDON, Ian N. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. **International Journal of Engineering Science**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 47–57, 1965. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0020-7225\(65\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0020-7225(65)90019-4). Acesso em: 6 ago. 2024.
- SOHEILIFAR, Sepideh; FATHI, Homa; NAGHDI, Navid. Photobiomodulation therapy as a high potential treatment modality for COVID-19. **Lasers in Medical Science**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 935–938, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03206-9>. Acesso em: 6 ago. 2024.
- STRICKER, Jonathan; FALZONE, Tobias; GARDEL, Margaret L. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. **Special Issue on Cell Mechanobiology**, v. 43, n. 1, p. 9–14, 5 jan. 2010.
- SUAREZ-ARNEDO, Alejandra *et al.* An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. **PLOS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0232565, 28 jul. 2020.
- SWINEHART, Donald F. The Beer-Lambert law. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 7, p. 333, 1962.
- TACIAK, Bartłomiej *et al.* Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198943, 11 jun. 2018.
- TANI, Alessia *et al.* Red (635 nm), near-infrared (808 nm) and violet-blue (405 nm) photobiomodulation potentiality on human osteoblasts and mesenchymal stromal cells: a morphological and molecular in vitro study. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19071946>. Acesso em: 17 set. 2023.
- TEDFORD, Clark E. *et al.* Quantitative analysis of transcranial and intraparenchymal light penetration in human cadaver brain tissue. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 312–322, 1 abr. 2015.
- TETI, Anna. Osteoclasts and hematopoiesis. **BoneKEY Reports**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bonekey.2012.46>. Acesso em: 17 set. 2023.
- THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. **Niels Ryberg Finsen**. [S. l.: s. n.], 15 jul. 2024. (Nota técnica).
- THOMAS, Gawain *et al.* Measuring the mechanical properties of living cells using atomic force microscopy. **Journal of Visualized Experiments (JoVE)**, n. 76, p. e50497, 27 jun. 2013.
- TORUNER, Ebru Kilicarslan; KAYHAN, Handan; EZGU, Fatih Suheyl. The effect of a geometric-shaped tool with blue led light on the activation of human dermal fibroblasts and cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 8, jul. 2021.
- TSOUPRAS, Alexandros *et al.* Anti-inflammatory and antithrombotic potential of metal-based complexes and porphyrins. **Compounds**, v. 4, n. 2, p. 376–400, 2024.
- VALVERDE, Audrey; MITROFANIS, John. Photobiomodulation for hypertension and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 90, n. 3, p. 1045–1055, 2022.

VANG MOURITZEN, Michelle; JENSSEN, Håvard. Optimized scratch assay for in vitro testing of cell migration with an automated optical camera. **Journal of Visualized Experiments (JoVE)**, n. 138, p. e57691, 8 ago. 2018.

WANG, Xinlong *et al.* Morphological and mechanical properties of osteosarcoma microenvironment cells explored by atomic force microscopy. **Analytical Sciences**, v. 32, n. 11, p. 1177–1182, 2016.

WANG, Yuguang *et al.* Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7781, 2017.

WANG, Yuting *et al.* Verteporfin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by multiple functions in RAW 264.7 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 387, p. 114852, 2020.

WEI, Kevin; NGUYEN, Hung N.; BRENNER, Michael B. Fibroblast pathology in inflammatory diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 20, 2021.

WILLIS TOWERS WATSON. **2021 Global medical trends survey report: 2019 global medical trends survey report**. [S. l.: s. n.], 2020.

WITTMANN, Torsten; DEMA, Alessandro; VAN HAREN, Jeffrey. Lights, cytoskeleton, action: optogenetic control of cell dynamics. **Cell Dynamics**, v. 66, p. 1–10, 1 out. 2020.

WONG-RILEY, Margaret T. T. *et al.* Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 280, n. 6, p. 4761–4771, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M409650200>. Acesso em: 22 out. 2024.

WU, Pei-Hsun *et al.* Particle tracking microrheology of cancer cells in living subjects. **Materials Today**, v. 39, p. 98–109, 2020.

WU, Xingjia *et al.* Organic light emitting diode improves diabetic cutaneous wound healing in rats. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 1, p. 104–114, 1 jan. 2015.

XIA, Yuqi *et al.* Photobiomodulation with blue laser inhibits bladder cancer progression. **Frontiers in Oncology**, v. 11, jul. 2021.

YAFFE, D.; SAXEL, O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. **Differentiation**, v. 7, n. 1, p. 159–166, 1 abr. 1977.

YANG, Chuntao *et al.* Oxidative stress mediates chemical hypoxia-induced injury and inflammation by activating NF- κ B-COX-2 pathway in HaCaT cells. **Molecules and Cells**, v. 31, n. 6, p. 531–538, 1 jun. 2011.

YANG, Jiali *et al.* Progress of phototherapy for osteosarcoma and application prospect of blue light photobiomodulation therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022.

YANG, Jiali *et al.* Blue light photobiomodulation induced osteosarcoma cell death by facilitating ferroptosis and eliciting an incomplete tumor cell stress response. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 258, p. 113003, 1 set. 2024.

YANG, Yanmei *et al.* Tunable C2N membrane for high efficient water desalination. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29218, 2016.

ZHAO, Hongyou *et al.* Comparative study on photobiomodulation between 630 nm and 810 nm LED in diabetic wound healing both in vitro and in vivo. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 15, n. 02, p. 2250010, 2022.

APÊNDICE A – SENSIBILIDADE DAS DFCs

Em substituição às curvas de força convencionais, adotamos o protocolo de curva de força com permanência (DFC, do inglês *dwelt force curve*) para investigar a relaxação viscoelástica das células. De forma resumida, em uma DFC, o piezo do eixo z se desloca com uma taxa constante de 6 $\mu\text{m/s}$, aproximando o cantilever do AFM até que uma força predefinida seja atingida ($F_{MAX} = 3 \text{ nN}$, conforme ilustrado na Figura 32c). Após o contato ser estabelecido, a extensão do piezo no eixo z permanece constante durante a fase de permanência ($t_d = 1\text{s}$). Em seguida, a ponta do cantilever é retraída da superfície com a mesma velocidade de aproximação até que o contato com a célula seja perdido.

Conforme ilustrado na Figura 32c, uma única DFC leva aproximadamente 2 segundos para completar o processo de relaxação, o que é adequado para estudar as propriedades de relaxação lenta das células. Embora a fase de aproximação ocorra de maneira relativamente rápida, a fase de permanência tem um impacto significativo no ajuste dos dados experimentais.

Para avaliar se o AFM é capaz de detectar expoentes de fluidez extremamente baixos, é necessário estimar a amplitude de relaxação do cantilever (Δd) durante a fase de permanência. No AFM, a força exercida é proporcional à deflexão do cantilever ($\Delta F = k_c \Delta d$, com $k_c = 0,06 \text{ N/m}$). As amplitudes de relaxação da força e da deflexão, medidas entre o início e o final da fase de permanência, são definidas da seguinte forma:

$$\Delta F = F(t_l) - F(t_l + t_d) = F_{MAX} - F(t_l + t_d), \quad (\text{A.1})$$

$$\Delta d = \frac{F_{MAX} - F(t_l + t_d)}{k_c}. \quad (\text{A.2})$$

Para atender aos critérios de resolução, Δd deve ser maior que a flutuação térmica do cantilever ($\Delta d_{\text{thermal}}$). No vácuo, essa quantidade pode ser estimada utilizando o teorema da equipartição, conforme a seguinte expressão:

$$\Delta d_{\text{thermal}} = \sqrt{\frac{k_B T}{k_c}}, \quad (\text{A.3})$$

onde k_B é a constante de Boltzmann. Para $k_c = 0,06 \text{ N/m}$, obtemos $\Delta d_{\text{thermal}} = 0,26 \text{ nm}$ e $\Delta F_{\text{thermal}} = 16 \text{ pN}$. Utilizando o modelo de força em lei de potência, estabelecido na literatura e descrito nesta Tese (De Sousa *et al.*, 2021, 2020; Garcia; Guerrero; Garcia, 2020; Hecht *et al.*, 2015), é possível: (i) simular curvas DFC realistas para diferentes expoentes de fluidez, (ii) estimar as amplitudes de relaxação da força na fase de permanência e (iii) compará-las com a

sensibilidade do sistema AFM, a fim de determinar os limites inferiores do expoente de relaxação mensuráveis pelo equipamento.

Considerando um material com $E(t_1) = 2$ kPa, $t_1 = 0,2$ s e $F_{MAX} = 3$ nN, valores compatíveis com os dados experimentais obtidos neste estudo, pode-se resolver a Equação (2.19) para $t = t_1$, a fim de determinar a profundidade máxima de indentação δ_0 :

$$\delta_0 = \sqrt{\frac{\pi(1-\nu^2)}{4tg\theta B(2,1-\beta)} \frac{F_{MAX}}{E(t_1)}}. \quad (A.4)$$

O Quadro 1 apresenta estimativas das amplitudes de relaxação da força para diferentes valores do expoente de fluidez, considerando $t_d = 1$ s. Observa-se que um expoente de fluidez tão baixo quanto 0,05 exige uma relaxação de força de 0,89 nN ao longo de uma DFC de 1 segundo. Essas amplitudes de força são facilmente detectáveis por sistemas padrão de AFM.

Neste estudo, as medições foram realizadas com $t_d = 2$ s, o que resulta em amplitudes de relaxação ainda maiores, garantindo maior precisão na determinação de expoentes de fluidez extremamente baixos.

Quadro 1 – Estimativas das amplitudes de relaxação da força em curvas de força com permanência (DFC) em função dos expoentes de fluidez, considerando $E(t_1) = 2$ kPa, $t_1 = 0,2$ s, $F_{MAX} = 3$ nN e $t_d = 1$ s.

β	F_{MAX} (nN)	t_1 (s)	t_d (s)	k_c (N/m)	$E(t_1)$ (kPa)	δ_0 (μ m)	Δd (nm)	ΔF (nN)
0	3	0,2	1	0,06	2	1,5	0	0
0,05	3	0,2	1	0,06	2	1,45	14,8	0,89
0,1	3	0,2	1	0,06	2	1,39	27,7	1,66
0,2	3	0,2	1	0,06	2	1,28	48,5	2,90

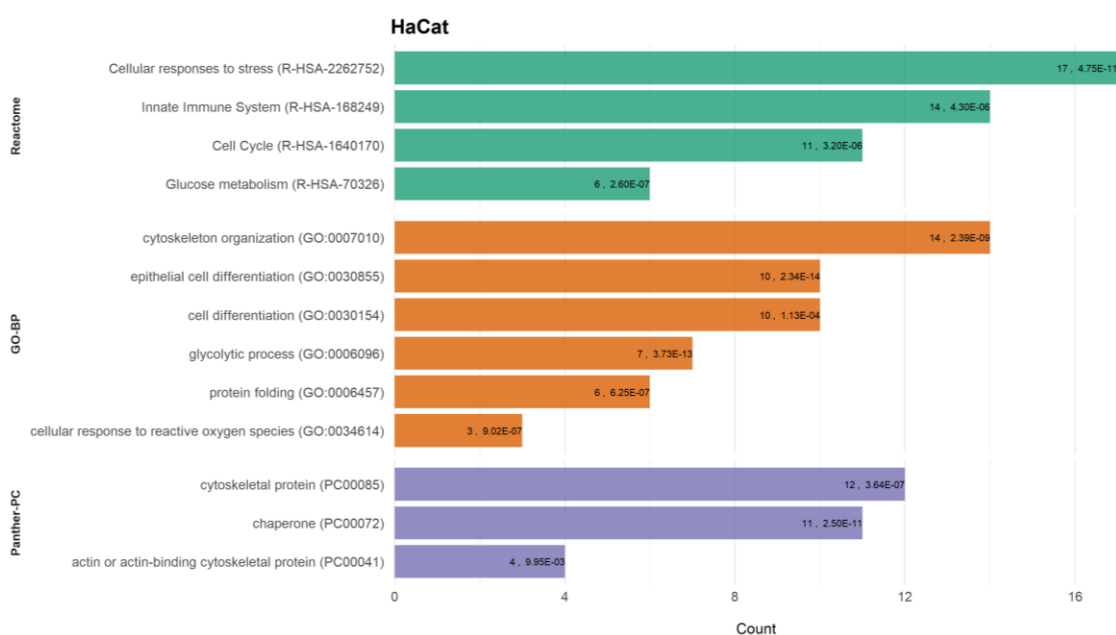
Fonte: Elaborado pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

APÊNDICE B - PROTEÔMICA: ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

O material do Apêndice B está organizado em sete figuras (Figura 43 a Figura 49) e quatro quadros (Quadro 2 a Quadro 5). As Figura 43 a Figura 45 apresentam análises de enriquecimento funcional das proteínas detectadas em cada tipo celular (HaCaT, L929 e OFCOL II), evidenciando vias ou processos biológicos modulados pela irradiação com luz vermelha. A Figura 46 exhibe imagens dos experimentos de cicatrização *in vitro*, com o uso de mitomicina para inibir a proliferação celular, demonstrando visualmente como a fotobiomodulação pode afetar a migração celular. A Figura 47 explora a relação entre elasticidade e fluidez celular sob diferentes condições de irradiação, com coeficientes de correlação de Spearman que indicam tendências nessas propriedades mecânicas.

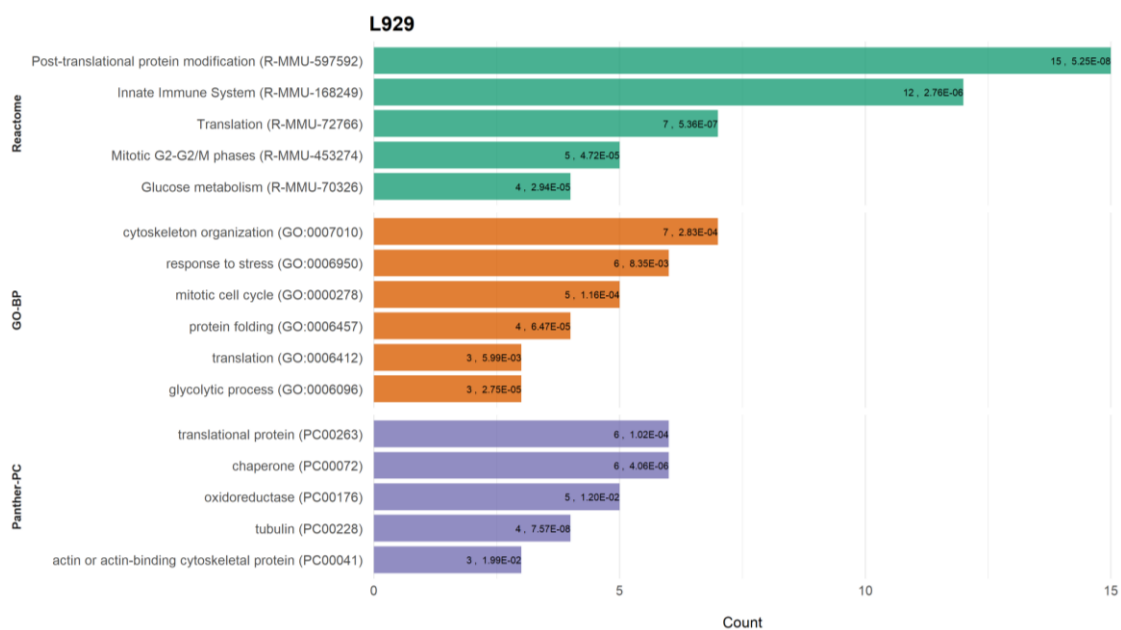
O Quadro 2 – Composição proteica dos grupos analisados na correlação da Figura 42. lista as proteínas agrupadas conforme categorias de interesse (ex.: citoesqueleto, proteínas comuns), enquanto os Quadros Quadro 3, Quadro 4 e Quadro 5 detalham as correlações entre dados viscoelásticos (expoente de fluidez, módulo de elasticidade e intensidade média em imagem) e a abundância de proteínas específicas em cada linhagem celular.

Figura 43 – Análise de enriquecimento dos genes das células HaCaT.



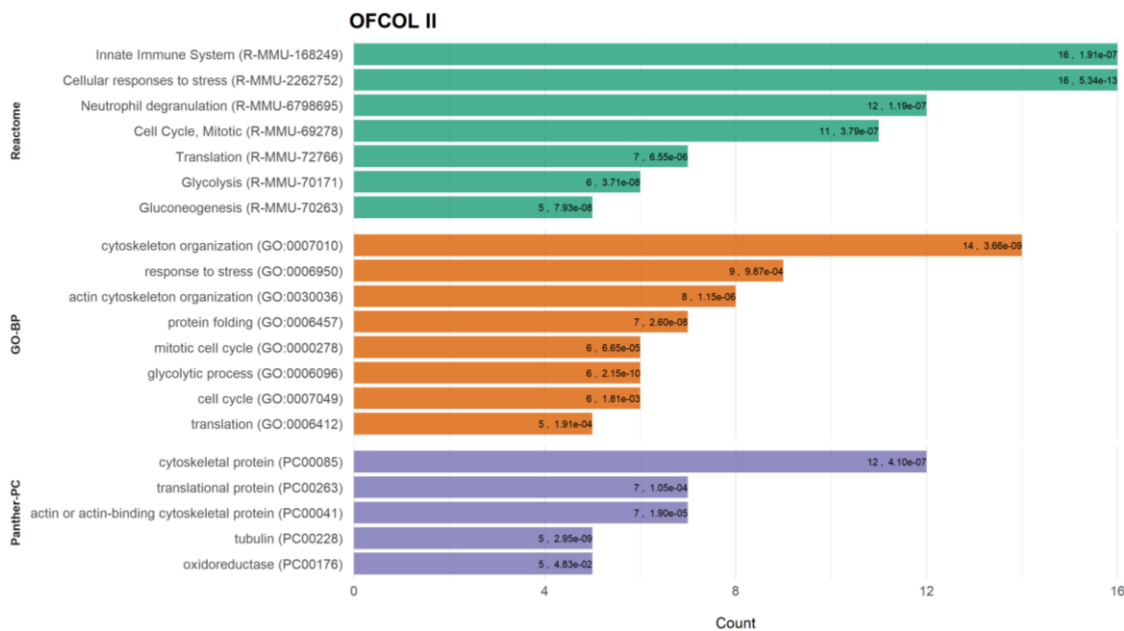
Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Figura 44 – Análise de enriquecimento dos genes das células L929.

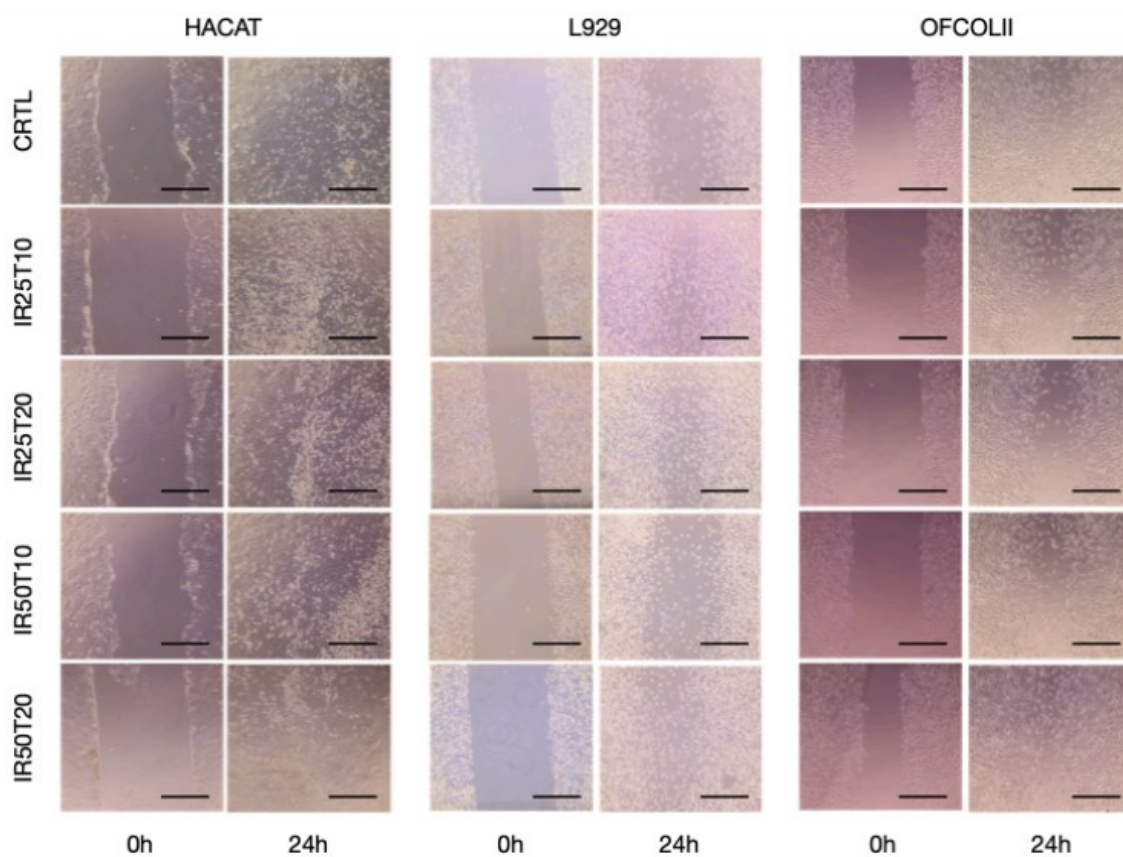


Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

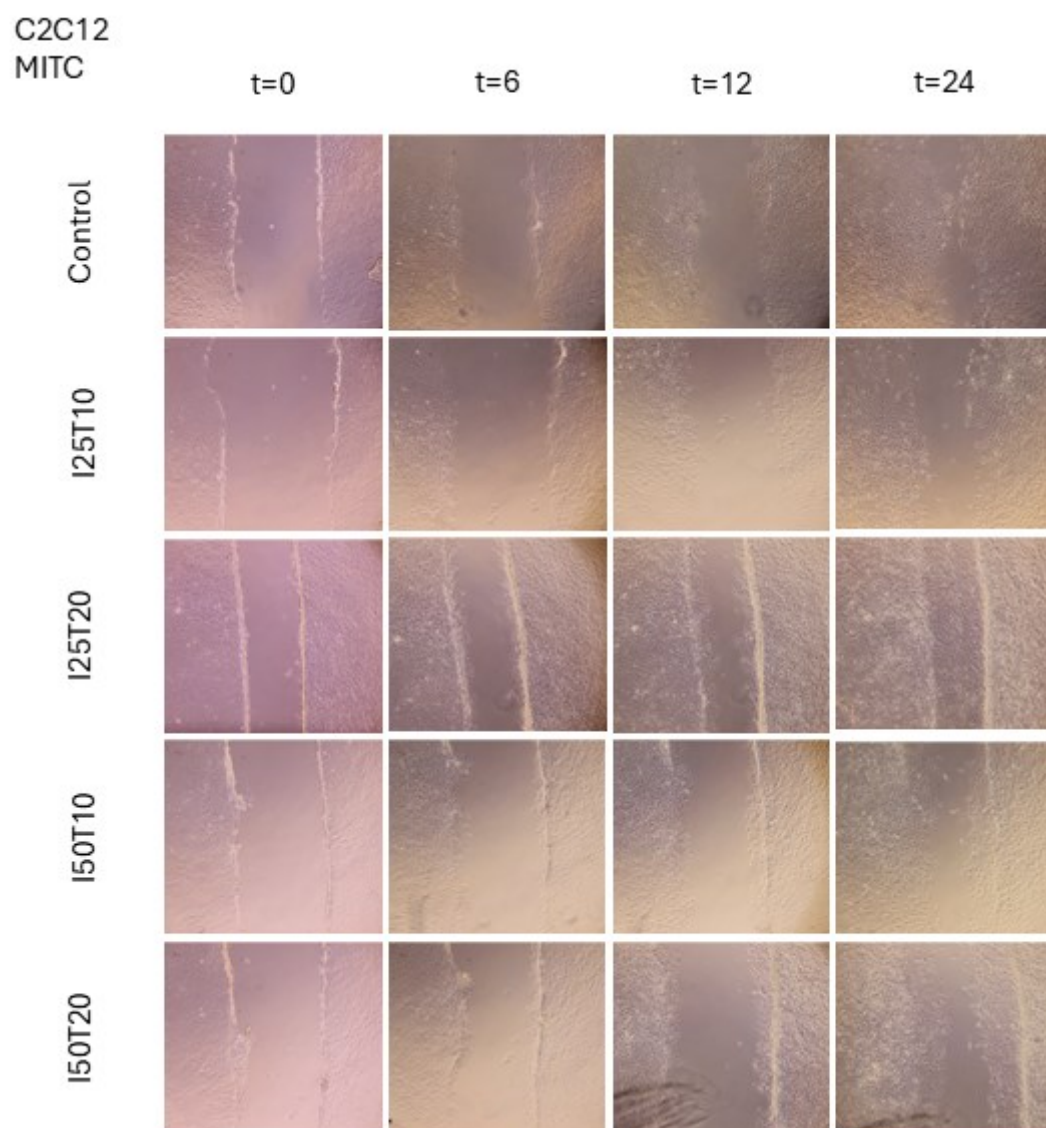
Figura 45 - Análise de enriquecimento dos genes das células OFCOL II.



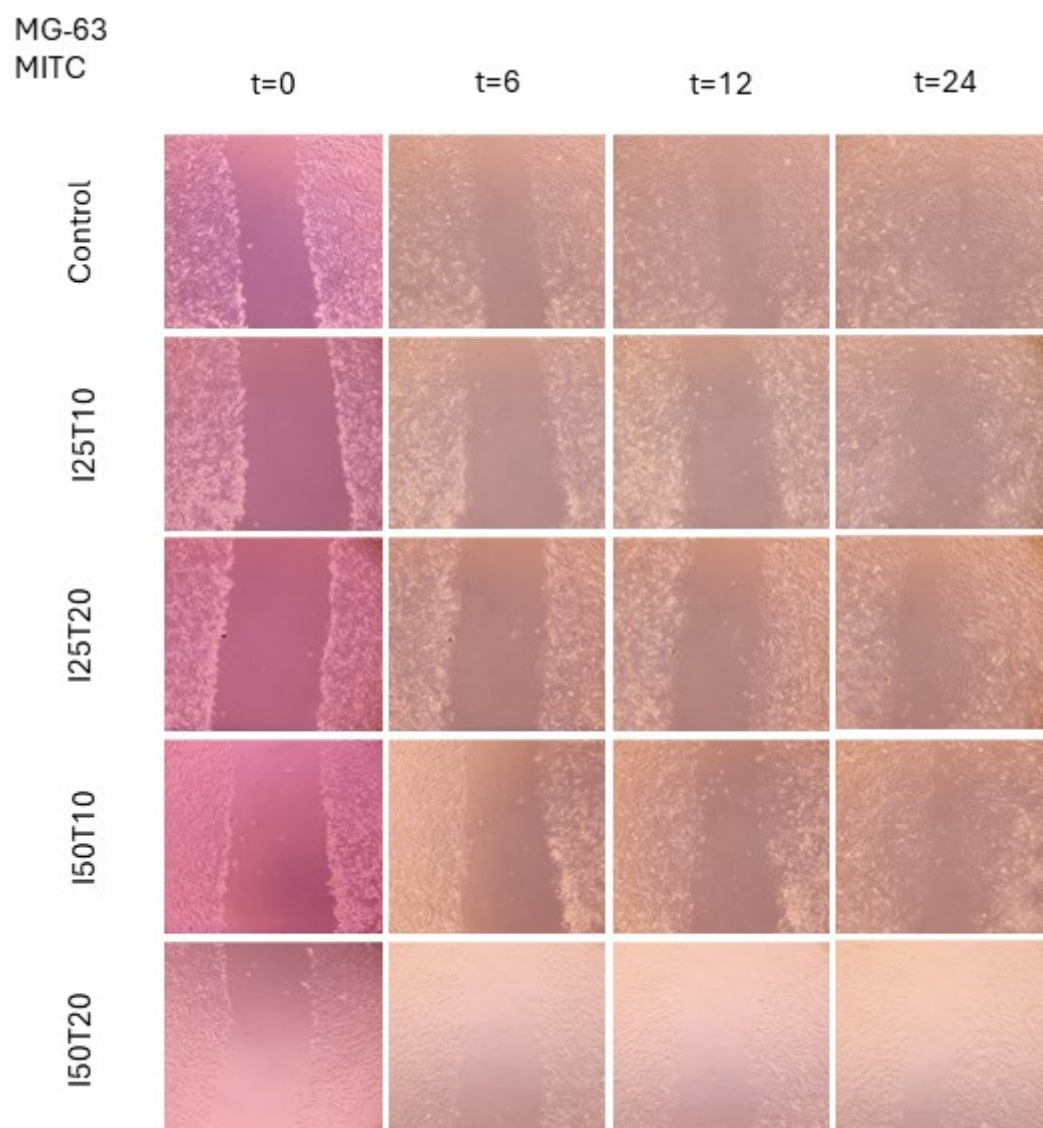
Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Figura 46 – Imagens dos experimentos de cicatrização de feridas (*wound-healing*).

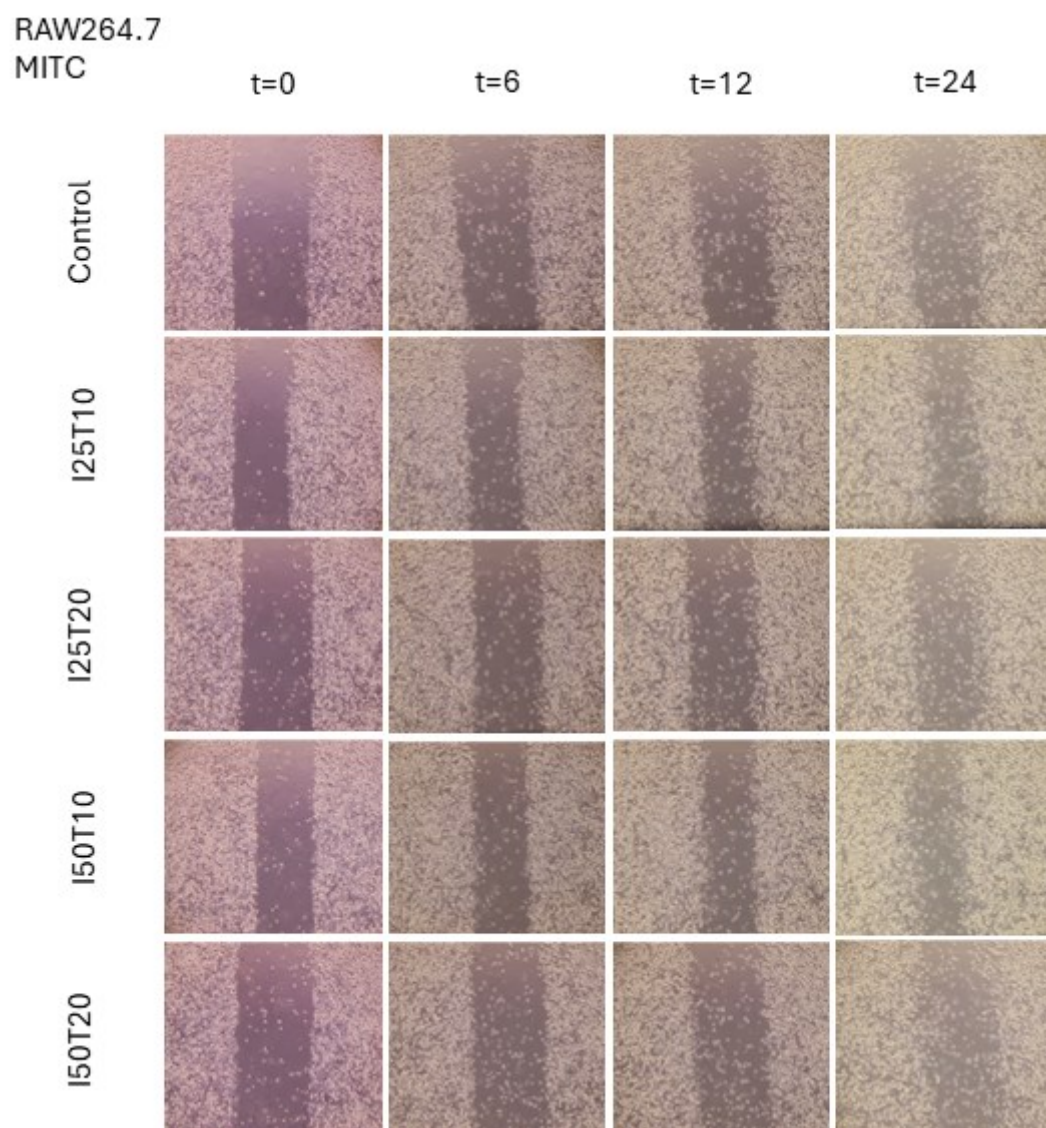
Imagens dos experimentos de cicatrização de feridas (*wound-healing*) realizados com mitomicina para evitar os efeitos da divisão celular. A barra de escala em cada painel: 500 μm. Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).



Fonte: Elaborada pelo autor.

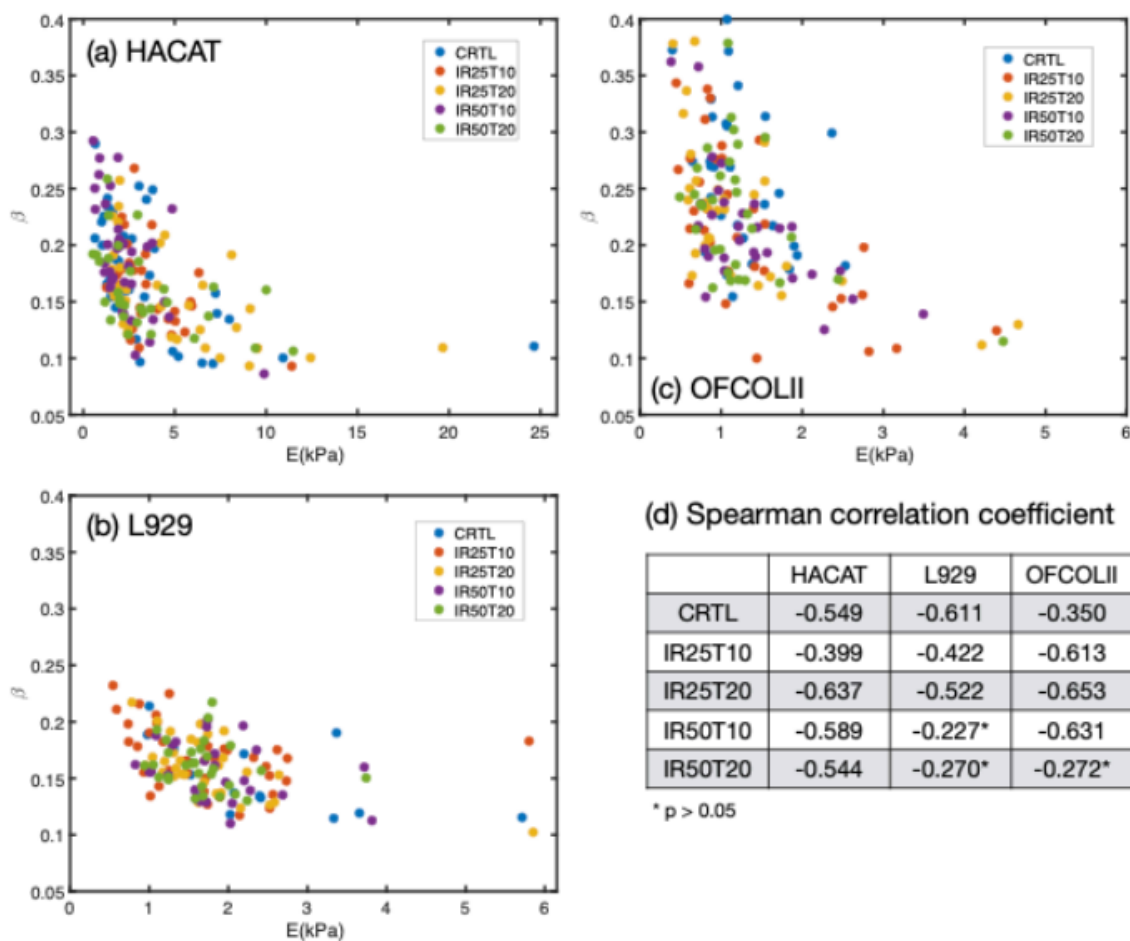


Fonte: Elaborada pelo autor.



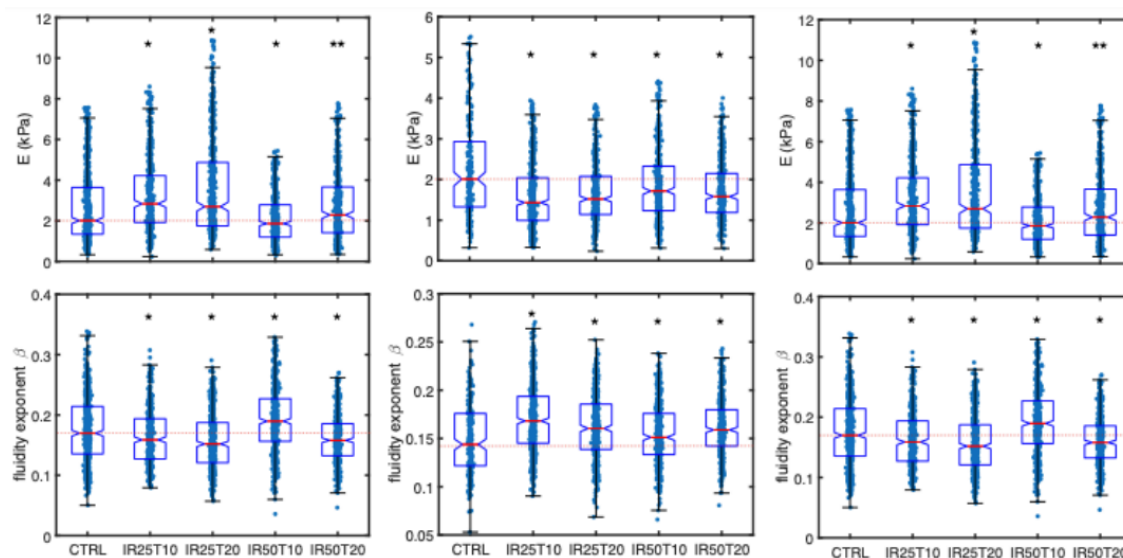
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 47 – Elasticidade celular e o expoente de fluidez das células HaCaT, L929 e OFCOL II.



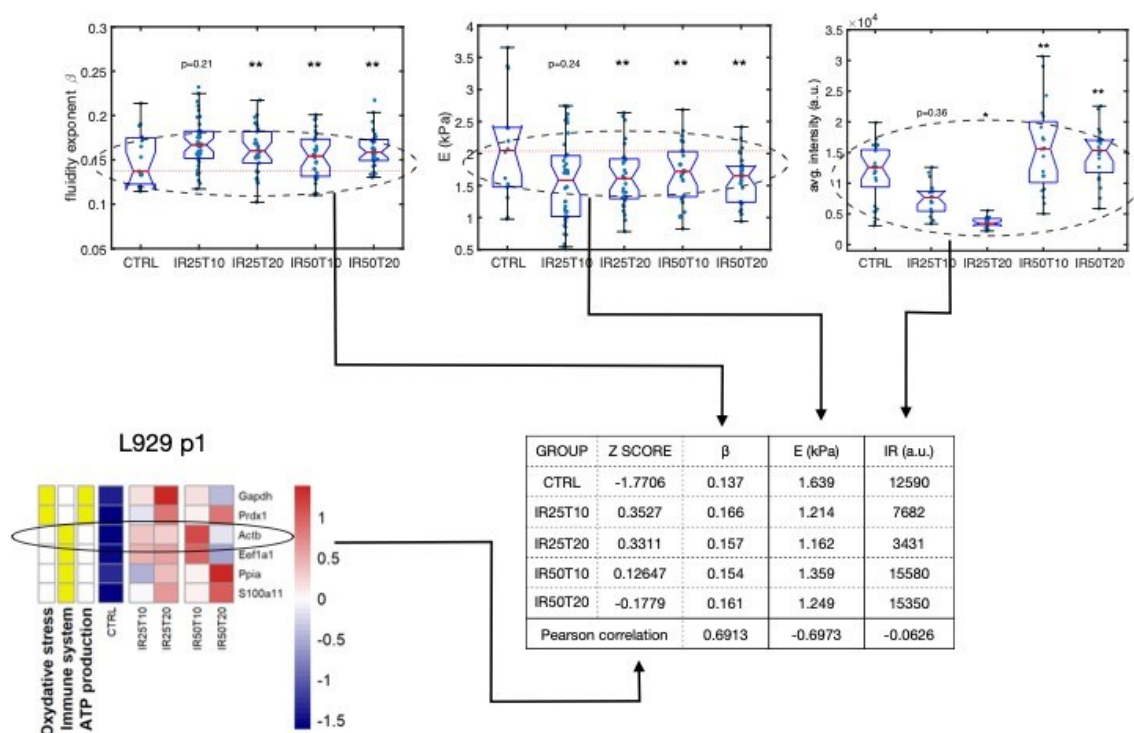
Relação entre a elasticidade celular e o expoente de fluidez das células sob diferentes condições de irradiação (a-c). Cada ponto de dado representa uma célula individual, cujas propriedades viscoelásticas foram obtidas a partir da média em uma região quadrada de $8 \mu\text{m}$ de lado. (d) O cálculo dos coeficientes de correlação de Spearman indica uma correlação negativa entre a elasticidade celular e a fluidez. Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Figura 48 – Módulos de elasticidade e expoentes de fluidez.



Módulos de elasticidade e expoentes de fluidez para diferentes condições de irradiação luminosa, agrupados de acordo com o tipo de tratamento. O número de células analisadas em cada grupo de irradiação foi: $n_{\text{HaCaT}} = (42, 31, 35, 37, 31)$, $n_{\text{L929}} = (15, 41, 30, 28, 31)$ e $n_{\text{OFCOLII}} = (31, 35, 29, 31, 30)$, respectivamente. Para cada célula, 16 curvas de força foram adquiridas, distribuídas uniformemente sobre uma área quadrada de $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$. A linha horizontal fina serve como referência visual para facilitar a comparação entre os grupos controle e irradiados. As distribuições das células irradiadas foram comparadas estatisticamente ao grupo controle utilizando o teste de Kruskal-Wallis, onde: (*) indica distribuições estatisticamente independentes ($p < 0,05$), (**) indica distribuições que não diferem significativamente entre si ($p > 0,7$). Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Figura 49 – Ilustração do Cálculo de Correlação entre a Abundância Proteica e as Propriedades Mecânicas.



Este diagrama demonstra o procedimento utilizado para calcular as correlações entre a abundância padronizada (z-score) de proteínas individuais (extraída dos *heatmaps* da Figura 41) e as propriedades mecânicas medidas, incluindo parâmetros viscoelásticos e intensidades de microscopia confocal (obtidas da Figura 32). Para grupos de proteínas, a abundância de cada proteína individual é somada, gerando um z-score combinado, que é então correlacionado com os parâmetros viscoelásticos. Especificamente, o diagrama ilustra a correlação entre a abundância da proteína ACTB (beta-actina) e as propriedades viscoelásticas das células L929. Fonte: Elaborada pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Quadro 2 – Composição proteica dos grupos analisados na correlação da Figura 42.

Outras (HaCaT)	ANKRD29, ANXA2P2, ARSI, HSPA1L, HSPA2, KRT5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT17, KRT75, KRT79, KRT6A, LMNA, NME1, NT5C1A, PLK1, RPLP0, RPLP1, RPLP2, S100G, SET, SETSIP, SFN, SOD1, TUBB3, YWHAB, YWHAG.
Outras (L929)	Anxa5, Arf3, Arf4, Arhgdia, Eef1a1, Fabp4, Gapdh, H1-2, H2ac4, H2bc7, H3c2, H4c1, Hspd1, Ldha, Lgals1, Mdh2, Nme1, Pde6a, Pfn1, Rpl12, Rpl9, Rplp1, Rplp2, Rps19, S100a13, S100a4, Serpinh1, Slc25a4, Srsf9, Uncharacterized C8orf74.
Outras (OFCOL II)	Alpl, Bpifb3, Bri3bp, Ckap4, Eef1b, Eif5a, Eno2, Eqtn, Esd, Gapdh, Gid8, Grxcr1, Gstm1, Gstm2, H2ac4, H2az1, H2bc7, H3-5, H4c1, Hmgn5, Hsp90ab1, Hspd1, Ldha, Lgals1, Lmna, Marecks, P4hb, Pkm, Pol, Ptma, Rpl12, Rplp1, Rps28, Rpsa, Serpinh1, Slc15a3, Ubb, Ube2l3, Zic1.
Comuns	ACTB, EEF1A, FSCN1, GAPDH, HSPA8, PDIA3, PGK1, PPIA, RPLP1.
Actina	ACTB, ACTC1, ACTBL2, ACTR3.
Microtúbulos	TUBA1A, TUBA1B, TUBA1C, TUBA4A, TUBA4B, TUBB, TUBB4B, TUBB5, TUBB6, TUBB3.
Filamentos intermediários	KRT5, KRT9, KRT13, KRT14, KRT15, KRT17, KRT75, KRT79, KRT6A, VIM.

Fonte: Elaborado pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Nota: A segunda coluna apresenta os genes correspondentes às proteínas identificadas em cada perfil celular (HaCaT, L929 e OFCOL II) e nos grupos estruturais do citoesqueleto.

Quadro 3 – Correlação entre dados viscoelásticos e proteínas individuais em células HaCaT.

N	Proteínas	β	E	CI
1	TUBB3	-0,1297	0,4137	-0,4233
2	SET	-0,3389	-0,1885	-0,0743
3	SETSIP	-0,4574	-0,0875	-0,1782
4	ENO1	-0,4634	-0,0824	-0,1841
5	ACTBL2	-0,4616	-0,0832	-0,1865
6	PLK1	-0,4138	-0,0987	-0,2284
7	S100G	-0,3741	-0,1513	-0,0855
9	HSP90AB1	-0,4472	-0,0921	-0,1648
10	SFN	-0,3992	-0,1261	-0,1053
11	KRT79	-0,2202	0,3351	-0,4392
12	TUBA4B	-0,4043	-0,1341	-0,1412
13	PFN1	-0,4081	-0,1211	-0,1310
14	KRT75	-0,5154	0,1093	-0,3623
15	ANXA2P2	-0,4361	-0,1032	-0,1552
16	SOD1	-0,3959	-0,1391	-0,1133
17	RPLP1	-0,4054	-0,1225	-0,1183
18	EEF2	-0,4145	-0,1096	-0,1263
19	RPLP2	-0,3462	-0,1693	-0,0565
20	S100A11	-0,3184	-0,1920	-0,0206
21	PRDX1	-0,4125	-0,1226	-0,1292
22	TPI1	-0,4268	-0,1102	-0,1449
23	NME1	-0,4392	-0,1034	-0,1623
24	ANXA1	-0,2887	-0,2139	-0,0311
25	KRT14	-0,5082	0,2540	-0,5107
26	RPLP0	-0,4411	-0,0966	-0,1655
27	KRT9	-0,4651	-0,0581	-0,1498
28	KRT17	-0,5343	0,0387	-0,3457
29	HSP90AA1	-0,4078	-0,1324	-0,1286
30	EEF1A1	-0,4290	-0,1021	-0,1488
31	ANKRD29	-0,4712	-0,0690	-0,1848
32	KRT5	-0,5345	0,1500	-0,4193
33	HSPA5	-0,4426	-0,0985	-0,1620
34	YWHAB	-0,4663	-0,0811	-0,1938
35	KRT15	-0,5223	0,0770	-0,3973
36	ENO2	-0,4610	-0,0820	-0,1883
37	ANXA2	-0,3780	-0,1496	-0,0977
38	GSTP1	-0,4427	-0,0989	-0,1683
39	HSPA8	-0,4239	-0,1103	-0,1421
40	ACTB	-0,4504	-0,0926	-0,1837
41	PRDX2	-0,4323	-0,0873	-0,1566
42	HSPA1L	-0,4801	-0,1076	-0,2639
43	NT5C1A	-0,4604	-0,0934	-0,1902
44	PGK1	-0,4210	-0,1171	-0,1426
45	LMNA	-0,4478	-0,0902	-0,1679

46	TUBB	-0,4662	-0,0557	-0,1946
47	PDIA3	-0,4737	-0,0747	-0,1970
48	YWHAG	-0,4372	-0,0935	-0,1415
49	ARSI	-0,4595	-0,0956	-0,2053
50	PPIA	-0,3817	-0,1414	-0,0925
51	PKM	-0,4602	-0,0723	-0,2012
52	ALDOA	-0,4354	-0,0994	-0,1584
53	KRT13	-0,5396	0,0630	-0,3592
54	GAPDH	-0,3801	-0,1421	-0,1027
55	TIFA	-0,4909	-0,0914	-0,2666
56	KRT6A	-0,5287	0,0848	-0,3579
57	FSCN1	-0,4749	-0,0628	-0,2079
58	HSPB1	-0,4168	-0,1199	-0,1373
59	HSPA2	-0,4285	-0,0983	-0,1306
60	TRAP1	-0,4288	-0,0982	-0,1600

Fonte: Elaborado pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Nota: As colunas indicadas por β , E e CI referem-se aos coeficientes de correlação com o expoente de fluidez, o módulo de elasticidade e a intensidade confocal média, respectivamente.

Quadro 4 – Correlação dos dados viscoelásticos com as proteínas individuais das células L929.

N	Proteínas	β	E	CI
1	Actb	0,6913	-0,6973	-0,0626
2	ADH1	0,7836	-0,8366	0,0121
3	Tuba1b	0,0771	0,1511	-0,1294
4	Tuba1c	0,0771	0,1511	-0,1294
5	Eef1a1	0,6527	-0,7081	-0,2888
6	Serpinh1	0,2106	-0,0422	-0,4005
7	Hspa8	0,6824	-0,6524	0,1719
9	Aldoa	0,4174	-0,1943	-0,2128
10	Gca	0,6382	-0,4921	0,2060
11	Ubb	0,7272	-0,9251	-0,4375
12	Nme1	0,7650	-0,8935	-0,2860
13	Gapdh	0,6042	-0,8377	-0,6717
14	Vcp	0,6212	-0,6352	0,0874
15	Fscn1	0,1969	0,0602	-0,2086
16	Hspd1	0,8298	-0,8130	0,0806
17	Pgk1	0,6252	-0,6270	0,3047
18	Ldha	0,4903	-0,2600	-0,0954
19	Tubb5	0,0495	0,0892	-0,4054
20	Nme2	0,6352	-0,7580	-0,0384
21	Pdia3	0,6000	-0,7658	-0,0978
22	Pdia6	0,5782	-0,7927	-0,2416
23	Calr	0,5375	-0,7223	-0,1063
24	Arf3	0,0655	0,0673	-0,4698
25	Mdh2	0,5063	-0,6417	0,0210
26	Arf4	0,0666	0,1078	-0,3745
27	Rplp1	0,5347	-0,7026	-0,0454
28	Tubb4b	0,1312	0,0225	-0,4132
29	Anxa5	0,6865	-0,8657	-0,2826
30	Pfn1	0,5443	-0,6274	0,1678
31	Arhgdia	0,6164	-0,6683	0,1091
32	Rplp2	0,6752	-0,7516	0,0150
33	P4hb	0,6444	-0,8340	-0,2365
34	Rps19	0,8883	-0,9091	-0,1422
35	Prdx1	0,7541	-0,8971	-0,2247
36	Lgals1	0,5378	-0,6652	0,0767
37	Fabp4	0,7741	-0,8438	-0,1234
38	Ppia	0,6229	-0,7013	0,1145
39	Rpl12	0,7802	-0,8605	-0,0568
40	S100a13	0,7963	-0,8283	-0,0527
41	H1-2	0,4689	-0,6634	-0,4874
42	S100a11	0,8064	-0,8850	-0,1069
43	H2ac4	0,2162	-0,4641	-0,3084
44	Slc25a4	0,4173	-0,2246	-0,3687
45	Srsf9	0,6909	-0,7777	0,0358

46	S100a4	0,6526	-0,7290	0,1101
47	Vim	0,0492	0,1548	-0,2318
48	H2bc7	0,3729	-0,5332	-0,2219
49	H4c1	0,2270	-0,4654	-0,3993
50	Rpl9	0,2726	-0,0564	-0,3640
51	Pde6a	0,0011	0,0663	0,5971
52	H3c2	0,0750	0,1081	0,3650
53	Uncharac C8orf74	-0,0046	0,0705	0,5866

Fonte: Elaborado pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

Nota: As colunas indicadas por β , E e CI referem-se à correlação com o expoente de fluidez, o módulo de elasticidade e a intensidade confocal média, respectivamente.

Quadro 5 – Correlação dos dados viscoelásticos com as proteínas individuais das células OFCOL II.

N	Proteínas	β	E	CI
1	P4hb	0,1696	0,1794	0,4375
2	Hsp90b1	0,3254	-0,5449	-0,5235
3	Hsp90ab1	0,5040	-0,3067	0,1095
4	Calr	0,3562	-0,4555	-0,3050
5	Pdia3	-0,3922	0,5479	0,4167
6	Pgk1	0,2320	-0,4217	-0,4184
7	Ywhag	-0,3787	0,6168	0,5618
9	Hspd1	0,6009	-0,4483	-0,0301
10	Gstm2	0,2965	-0,6195	-0,8394
11	Serpinh1	0,3796	-0,5564	-0,4842
12	Hspa8	0,3419	-0,4187	-0,2384
13	Cap1	-0,1948	0,2428	0,0567
14	Ldha	0,4607	-0,5540	-0,3756
15	Tuba4a	0,2349	-0,4538	-0,4786
16	Tuba1b	0,2342	-0,4440	-0,4569
17	Anxa1	-0,3503	0,4092	0,2304
18	Ppia	0,4664	-0,4833	-0,2355
19	Hspa5	0,5734	-0,5378	-0,2066
20	Cfl1	-0,2150	0,3718	0,2701
21	Eif5a	-0,1448	0,3096	0,2428
22	Gstm1	0,4205	-0,6596	-0,8934
23	Fscn1	0,0434	-0,0398	-0,2233
24	Ubb	-0,4079	0,7334	0,8802
25	Alpl	0,3781	-0,6675	-0,6990
26	Rpl12	-0,3032	0,4317	0,3456
27	Gapdh	0,0252	-0,3831	-0,6823
28	Eno1	0,2553	-0,4785	-0,4843
29	Rplp1	-0,2706	0,3391	0,1230
30	pol	0,1936	0,1673	0,4182
31	Tuba1a	0,3546	-0,4812	-0,3622
32	Gid8	0,6336	-0,7950	-0,7493
33	H4c1	0,3190	-0,6842	-0,7897
34	Eqtn	0,3191	-0,3864	-0,2018
35	Ckap4	-0,3533	0,3983	0,1746
36	Pkm	0,2376	-0,5893	-0,7106
37	Eef1a1	0,0881	-0,3361	-0,4220
38	Lgals1	0,3210	-0,5061	-0,4536
39	H2bc7	0,3764	-0,6576	-0,6634
40	Actc1	0,4857	-0,6081	-0,4299
41	Vcp	-0,3886	0,4946	0,3402
42	H2az1	0,3351	-0,6221	-0,6321
43	Prdx5	-0,3930	0,4844	0,3096
44	Rps28	-0,0702	0,3263	0,3543
45	Lmna	-0,3445	0,4956	0,4293

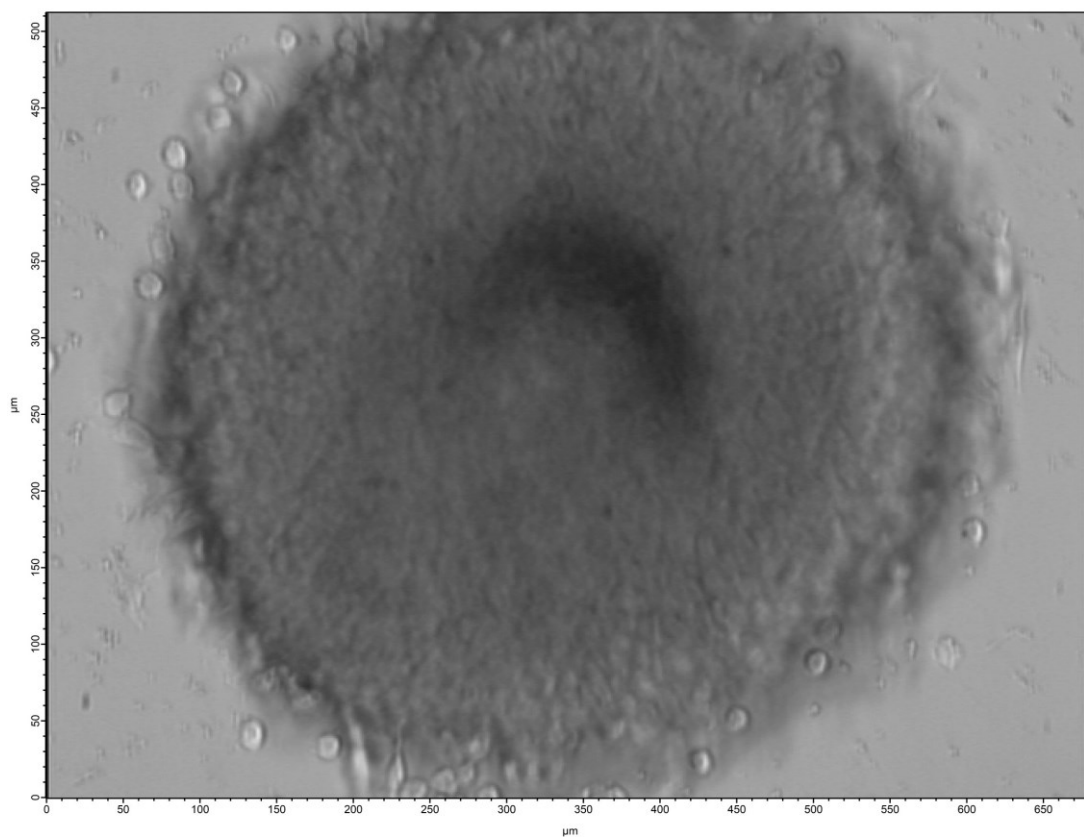
46	Tubb4b	-0,3025	0,4032	0,2747
47	Nme2	-0,3475	0,4907	0,4034
48	Hsp90aa1	0,6294	-0,6653	-0,3822
49	Tagln2	-0,2464	0,2951	0,0669
50	Actb	0,4316	-0,5675	-0,4197
51	H2ac4	0,3438	-0,6304	-0,6571
52	Eno2	-0,2544	0,4106	0,3320
53	Eno3	0,7528	-0,7108	-0,3302
54	Rpsa	-0,3608	0,5006	0,3713
55	Ube2l3	-0,4300	0,5404	0,3853
56	Bri3bp	0,4324	-0,5282	-0,3300
57	Marcks	-0,4022	0,5433	0,4334
58	Hmgn5	-0,3224	0,4836	0,4016
59	Alb	0,2281	-0,4784	-0,4926
60	Slc15a3	-0,4142	0,5234	0,3880
61	Eef1b	-0,3186	0,4525	0,3252
62	Tpm1	-0,3000	0,4455	0,3533
63	Bpifb3	-0,3802	0,5250	0,4422
64	Esd	-0,3675	0,4981	0,3949
65	H3-5	0,0743	0,0491	-0,0784
66	Ptma	0,0958	0,1014	0,0580
67	Zic1	-0,3261	0,4509	0,3258
68	Grxcr1	-0,3124	0,4347	0,3041
69	Actr3	-0,3853	0,4954	0,3632
70	Tubb6	-0,3589	0,4761	0,3462

Fonte: Elaborado pelo autor. Publicado em Silva *et al.* (2025).

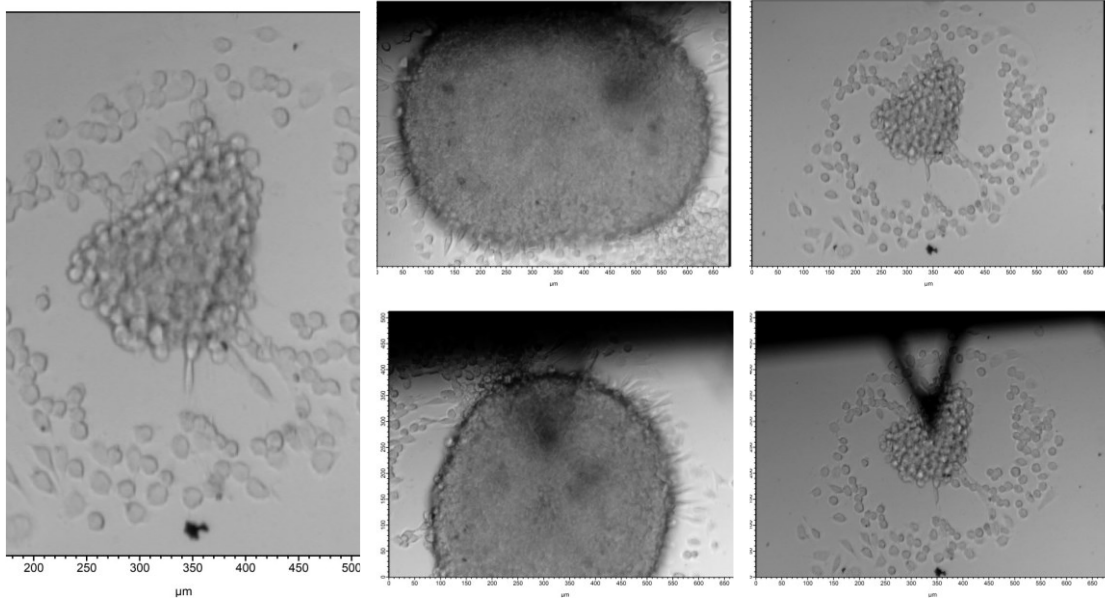
Nota: As colunas indicadas por β , E e CI referem-se à correlação com o expoente de fluidez, o módulo de elasticidade e a intensidade confocal média, respectivamente.

APÊNDICE C – ESFEROIDES: RESULTADOS PRELIMINARES

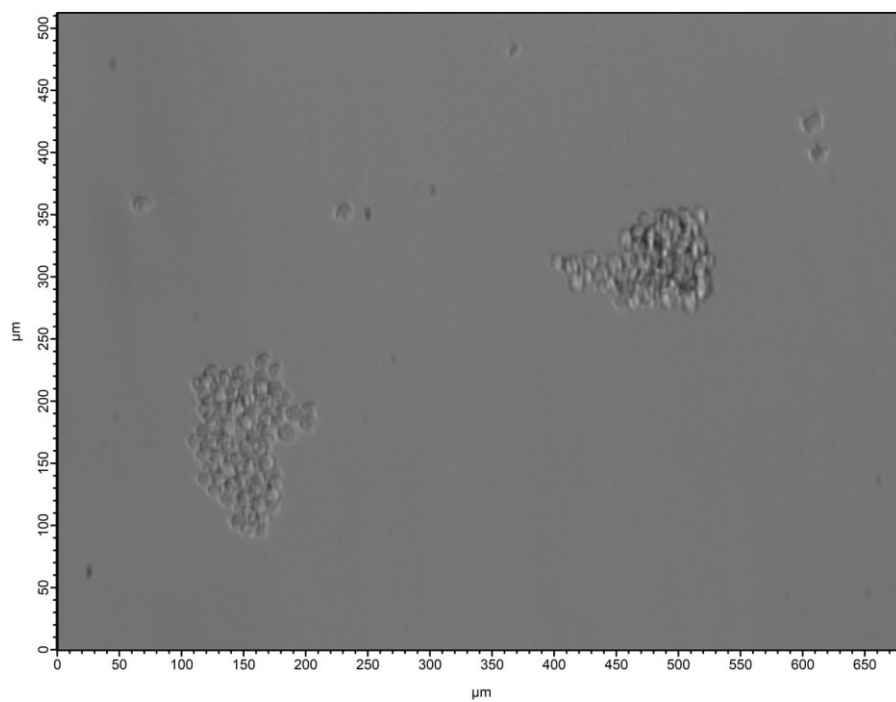
Esferoide de L929



Esferoides de OFCOL II



Esferoides de RAW 264.7



APÊNDICE D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Este apêndice apresenta os trabalhos produzidos durante o doutorado. O artigo principal – Silva *et al.* (2025), publicado na *Small* – concentra os resultados biomecânicos e proteômicos da tese. Lima *et al.* (2024), publicado na *Heliyon*, é um artigo de coautoria do qual o presente autor participou na metodologia e na curadoria dos dados, e que fundamenta o protocolo de AFM utilizado neste trabalho. Também constam um artigo publicado na *Spectrochimica Acta Part A* sobre espectroscopia Raman em filmes de $\text{La}_2\text{CoMnO}_6$; um trabalho em colaboração com Macedo *et al.*, ainda em fase experimental, sobre o uso de AFM na avaliação biomecânica de biomembranas com proteínas de *Calotropis procera* em cicatrização de úlceras diabéticas; e um trabalho sobre econofísica aplicada à educação financeira no ensino médio, desenvolvido no IFRN – Campus Pau dos Ferros, apresentado no XXXIX Encontro de Física do Norte e Nordeste (EFNNE 2025), realizado em Natal-RN, estando atualmente em fase de escrita..

Biomechanical Insights into the Proteomic Profiling of Cells in Response to Red Light Absorption

Antônio V. S. Silva, Felipe D. Sousa, Brandon F. Sousa, Wallace V. Santos, Antônio E. R. Oliveira, Marina D. P. Lobo, Márcio V. Ramos, Nylane M. N. Alencar, Marcelo V. P. de Sousa, Rosemayre S. Freire, Cláudio L. N. Oliveira, and Jeanlex S. de Sousa*

Photobiomodulation (PBM) is a promising non-invasive therapy for tissue repair, but its underlying cellular mechanisms are not fully understood. In this study, the biomechanical and proteomic responses of three cell types – keratinocytes (HACAT), fibroblasts (L929), and osteoblasts (OFCOLII) – exposed to red light (633 nm) are investigated using atomic force microscopy (AFM) and mass spectrometry-based proteomic analysis. Red light absorption resulted in cell-type-specific changes in viscoelastic properties, with fibroblasts exhibiting increased fluidity, reduced stiffness, and enhanced motility. Conversely, keratinocytes exhibited intensity-dependent responses, while osteoblasts appeared to be relatively insensitive to irradiation conditions. Proteomic profiling identified key signaling pathways involved in immune response, ATP production, and stress regulation. The immune and ATP pathways are strongly linked to the modulation of viscoelastic properties, particularly in fibroblasts, while weaker correlations were observed in keratinocytes. Cytoskeletal remodeling, primarily within the F-actin network, is identified as the main driver of mechanical alterations, with additional contributions from microtubules and intermediate filaments. These findings provide new insights into how red light absorption modulates cellular viscoelasticity through cytoskeletal remodeling, with potential applications in optimizing light-based therapies for tissue regeneration and disease treatment.

1. Introduction

Photobiomodulation (PBM), also known as low-level light therapy (LLLT), employs low-intensity light to treat various medical conditions. Initially proposed for chronic pain^[1,2] and tissue damage,^[3] PBM has emerged as a potential therapeutic strategy for several diseases, including Alzheimer's disease,^[4] depression,^[5,6] and stroke rehabilitation.^[7] However, the interest in PBM is tempered by skepticism due to conflicting reports about its efficacy. For instance, a randomized placebo-controlled trial of patients with low back pain found no significant difference between placebo and PBM-treated groups.^[8,9] In contrast, PBM produced significant pain reduction in patients with fibromyalgia in another randomized placebo-controlled trial.^[10] One plausible origin for these conflicting reports is the substantial variability among studies using different illumination parameters (e.g., wavelength, power density, and pulse structure). Despite the

A. V. S. Silva, W. V. Santos, M. V. P. de Sousa, C. L. N. Oliveira, J. S. de Sousa

Departamento de Física
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza, CE 60440-900, Brazil
E-mail: jeanlex@fisica.ufc.br

A. V. S. Silva
Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Pau dos Ferros, RN 59900-000, Brazil

F. D. Sousa, A. E. R. Oliveira
Núcleo de Biologia Experimental
Universidade de Fortaleza
Fortaleza, CE 60811-905, Brazil

B. F. Sousa, M. V. Ramos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza, CE 60440-900, Brazil

M. D. P. Lobo
Departamento de Biologia
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza, CE 60440-900, Brazil

N. M. N. Alencar
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza, CE 60430-275, Brazil

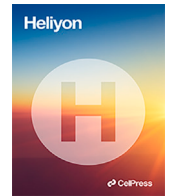
M. V. P. de Sousa
Bright Photomedicine
São Paulo, SP 05508-000, Brazil

M. V. P. de Sousa
Instituto Federal de Sergipe
Estância, SE 49200-000, Brazil

R. S. Freire
Central Analítica
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza, CE 60440-900, Brazil

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/sml.202410062>

DOI: 10.1002/sml.202410062



Research article

Measuring the viscoelastic relaxation function of cells with a time-dependent interpretation of the Hertz-Sneddon indentation model

I.V.M. Lima ^a, A.V.S. Silva ^{a,d}, F.D. Sousa ^c, W.P. Ferreira ^a, R.S. Freire ^b, C.L.N. de Oliveira ^a, J.S. de Sousa ^{a,*}^a Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 60440-900, Ceará, Brazil^b Central Analítica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 60440-900, Ceará, Brazil^c Núcleo de Biologia Experimental, Universidade de Fortaleza, Fortaleza, 60811-905, Ceará, Brazil^d Instituto Federal do Rio Grande do Norte, Pau dos Ferros, 59900-000, Rio Grande do Norte, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Atomic force microscopy
Cell viscoelasticity
Viscoelastic force model
Hertz-Sneddon contact model

ABSTRACT

The Hertz-Sneddon elastic indentation model is widely adopted in the biomechanical investigation of living cells and other soft materials using atomic force microscopy despite the explicit viscoelastic nature of these materials. In this work, we demonstrate that an exact analytical viscoelastic force model for power-law materials, can be interpreted as a time-dependent Hertz-Sneddon-like model. Characterizing fibroblasts (L929) and osteoblasts (OFCOLII) demonstrates the model's accuracy. Our results show that the difference between Young's modulus E_y obtained by fitting force curves with the Hertz-Sneddon model and the effective Young's modulus derived from the viscoelastic force model is less than 3%, even when cells are probed at large forces where nonlinear deformation effects become significant. We also propose a measurement protocol that involves probing samples at different indentation speeds and forces, enabling the construction of the average viscoelastic relaxation function of samples by conveniently fitting the force curves with the Hertz-Sneddon model.

1. Introduction

Atomic force microscopy (AFM) has become ubiquitous in the rheological characterization of soft matter, particularly in the nanomechanics of living cells [1–7]. The success of the AFM is in part due to its high spatial resolution, precise force control up to a few nano newtons, and ability to probe cells in liquid, but also because that the measured force curves are easily modeled with the well-known Hertz-Sneddon's (HS) model, that describes the axisymmetric indentation of semi-infinite elastic materials [8].

Although soft materials always exhibit some degree of viscoelasticity, the HS model successfully described qualitatively many interesting microscopic phenomena by comparing the mechanical properties of materials with a reference sample measured with identical loading conditions. For instance, a large volume of AFM studies reported that individual cancer cells are less rigid than their normal counterparts [3,9–12], and the same trend was also observed comparing normal and cancerous tissues of the human breast [13]. Beyond cancer, other diseases like osteoarthritis [14,15], tissue fibrosis [16,17] and myocardial infarction [18] exhibit

* Corresponding author.

E-mail address: jeanlex@fisica.ufc.br (J.S. de Sousa).<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30623>

Received 6 February 2024; Received in revised form 15 April 2024; Accepted 30 April 2024

Available online 8 May 2024

2405-8440/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



Dynamics of magnetic inhomogeneity in $\text{La}_2\text{CoMnO}_6$ films probed by Raman spectroscopy

A.V.S. Silva^{a,c}, R.X. Silva^b, C. W. A. Paschoal^c, A.R. Paschoal^c, A. Nonato^{d,*}

^a Instituto Federal do Rio Grande do Norte, Campus Pau dos Ferros, Pau dos Ferros, Rio Grande do Norte 59900-000, Brazil

^b Centro de Ciência e Tecnologia em Energia e Sustentabilidade, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Feira de Santana, Bahia 44085-132, Brazil

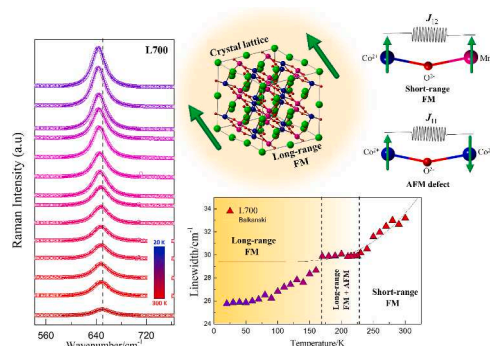
^c Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, PO BOX 6030, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará 65455-900, Brazil

^d Coordenação de Ciências Naturais, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências de Bacabal, Bacabal, Maranhão 65700-000, Brazil

HIGHLIGHTS

- High-quality LCMO polycrystalline films were obtained via chemical solution deposition, annealed at different temperatures (700, 800, and 900 °C).
- Temperature-dependent Raman spectroscopic studies reveal multiple anomalous phonon energy behaviors, which are associated with strong spin-phonon coupling.
- Temperature-dependent Raman spectroscopy uncovered the dynamic interplay of antiferromagnetic (AFM) and ferromagnetic (FM) competition during the phase transition.
- Raman spectroscopy uncovered the presence of short-range $\text{Mn}^{4+}/\text{Co}^{2+}$ ferromagnetic clusters at room temperature.
- Phonon lifetime analysis elucidated the temperature regime in which magnetic phases compete, shedding light on the dynamics of FM superexchange $\text{Mn}^{4+}\text{-O-Co}^{2+}$ and AFM interactions resulting from anti-site disorder.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Magnetodielectric
Double perovskites
Raman spectroscopy
Spin-phonon coupling
Chemical solution deposition
Polycrystalline films

ABSTRACT

We report the dynamic effects of magnetic inhomogeneity on the temperature evolution of the Raman modes in polycrystalline $\text{La}_2\text{CoMnO}_6$ (LCMO) films. The LCMO films were obtained via chemical solution deposition and annealed at different temperatures, 700, 800 and 900 °C. Temperature-dependent Raman spectroscopic studies uncover anomalous phonon energy behaviors, associated with strong spin-phonon couplings revealed even at ambient conditions. This effect, which is observed to occur well above ferromagnetic ordering temperature is ascribed to short-range $\text{Mn}^{4+}/\text{Co}^{2+}$ ferromagnetic clusters. Moreover, our study has shown that spin-phonon coupling strength is governed by competing antiferromagnetic (AFM) and ferromagnetic (FM) interactions.

* Corresponding author.

E-mail address: ariel.nonato@ufma.br (A. Nonato).

<https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125112>

Received 12 June 2024; Received in revised form 9 August 2024; Accepted 7 September 2024

Available online 12 September 2024

1386-1425/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Biomembrana com proteínas do látex de *Calotropis procera*
(BioMemCpLP) como ferramenta farmacológica na cicatrização de úlceras
diabéticas: Mecanismos celulares e moleculares e envolvidos

Fernanda Soares Macedo¹

Nylane Maria Nunes de Alencar¹

Antônio Vinnie dos Santos Silva^{3,4}

Jeanlex Soares de Sousa³

Brandon Ferraz e Sousa²

Liviane Maria Alves Rabelo¹

Mireia de Oliveira Correia¹

Márcio Viana Ramos²

O emprego de curvas de força, obtidas por microscopia de força atômica (AFM), pode agregar uma dimensão mecânica de alta resolução ao desenvolvimento e à avaliação da biomembrana contendo proteínas de *Calotropis procera* (BioMemCpLP) no contexto da cicatrização de úlceras diabéticas. A análise de nanoindentação por AFM permite determinar o módulo elástico local e perfis de adesão tanto da membrana quanto das células (fibroblastos e queratinócitos) submetidas ao tratamento, oferecendo parâmetros que refletem a compatibilidade mecânica do biomaterial com o tecido cutâneo e a capacidade das células de migrar e proliferar em torno dele. Além disso, ensaios de relaxação ou *creep* com AFM possibilitam a extração de propriedades viscoelásticas celulares, as quais se relacionam a reorganizações do citoesqueleto e podem ser correlacionadas a marcadores moleculares de inflamação e sinalização observados nos experimentos *in vitro*. Quando amostras de tecido cicatrizado *ex vivo* são submetidas à AFM, é viável avaliar se o reparo promovido pela BioMemCpLP resulta em características mecânicas próximas às da pele saudável, complementando dados histológicos e bioquímicos. Do ponto de vista metodológico, a preparação adequada das amostras, a seleção de *cantilevers* e modelos de contato apropriados, bem como o mapeamento espacial da rigidez, são essenciais para a obtenção de resultados confiáveis. Isso reforça a compreensão dos mecanismos de ação e orienta as otimizações do biomaterial para aplicações clínicas futuras.

1. Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do Ceará Fortaleza, CE 60430-275, Brazil.
2. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular Universidade Federal do Ceará Fortaleza, CE 60440-900, Brazil
3. Departamento de Física Universidade Federal do Ceará Fortaleza, CE 60440-900, Brazil
4. Colégio Militar de Fortaleza (CMF), Fortaleza - CE, 60150-160, Brazil

ECONOPHYSICS AS A PATH TO FINANCIAL EDUCATION IN HIGH SCHOOL: A STUDY AT IFRN – PAU DOS FERROS CAMPUS

ECONOFÍSICA COMO CAMINHO PARA A EDUCAÇÃO FINANCEIRA NO ENSINO MÉDIO: UM ESTUDO NO IFRN – CAMPUS PAU DOS FERROS

Antônio Vinnie dos Santos Silva^{a,c}, Maria Rita Alves de Lima^b, Leticia Maria Morais^b, Anna Angelina de Brito Oliveira^b, Maria Eduarda Guedes Moura^b, Luma Maria Andrade Bandeira^b, Thárcio Adelino Cerqueira^b

^a *Colégio Militar de Fortaleza, Fortaleza, Ceará, 60150-160, Brazil*

^b *Instituto Federal do Rio Grande do Norte, Campus Pau dos Ferros, Rio Grande do Norte 59900-000, Brazil*

^c *Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará 65455-900, Brazil*

Econophysics is an interdisciplinary field that applies tools and concepts from physics – particularly from statistical mechanics – to the study of economic phenomena such as income distribution, market fluctuations, and the collective behavior of economic agents. Although traditionally associated with advanced theoretical models, key concepts from econophysics can be introduced at the high school level through simplified and accessible approaches that promote interdisciplinary learning and demonstrate real-world applications.

When integrated with financial education, econophysics offers a powerful and innovative framework to help students develop a deeper understanding of essential topics such as consumption, financial planning, credit, debt management, and socioeconomic inequality. Beyond encouraging scientific reasoning and analytical thinking, this interdisciplinary approach contributes to the development of critical consciousness and supports the formation of socially engaged individuals who are better equipped to make informed and responsible financial decisions in their everyday lives.

At the Federal Institute of Rio Grande do Norte (IFRN), Campus Pau dos Ferros, a voluntary survey conducted among high school students revealed that a significant number of them reported having no prior knowledge or formal exposure to financial education. This finding highlights an existing educational gap and reinforces the urgent need to incorporate financial literacy into the high school curriculum, especially through strategies that connect scientific knowledge to students' lived realities.

While this initiative does not aim to teach econophysics in its full technical or academic form, it leverages the logic and perspective of physics to introduce economic ideas in an interdisciplinary and innovative way. This alone represents a meaningful educational advancement and demonstrates the relevance of science in everyday life.

Keywords:

Econophysics; Financial Education; High School; Interdisciplinarity; Applied Physics; Citizenship Education.