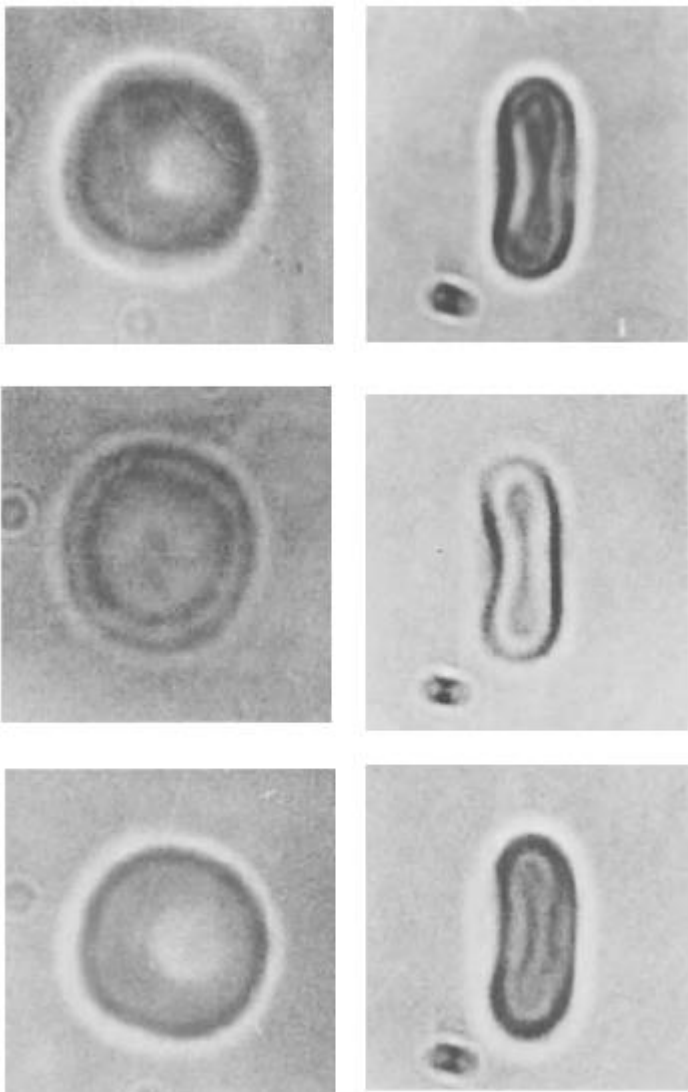


Avaliação de Mecânica Celular por Citometria Magnético Ótica de Oscilação (OMTC)

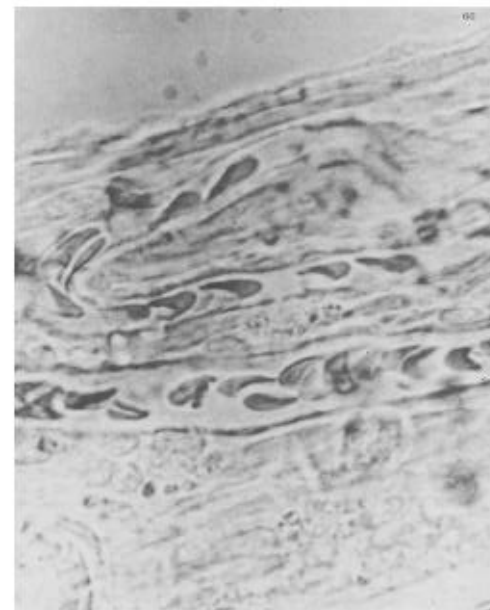
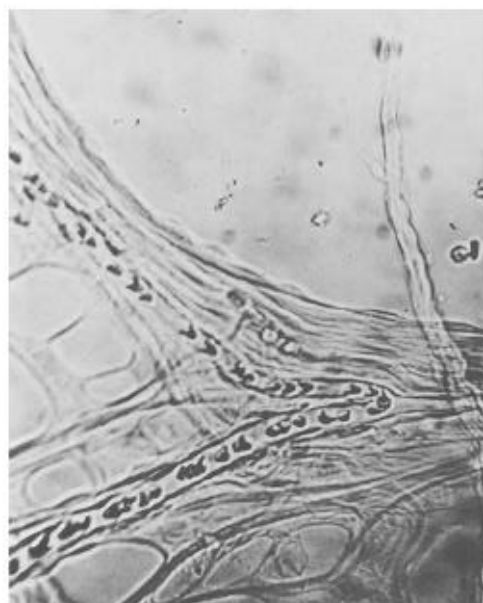
Laboratório de Engenharia Biomédica – Poli USP

Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular – IF USP

Tipos Celulares e Formas



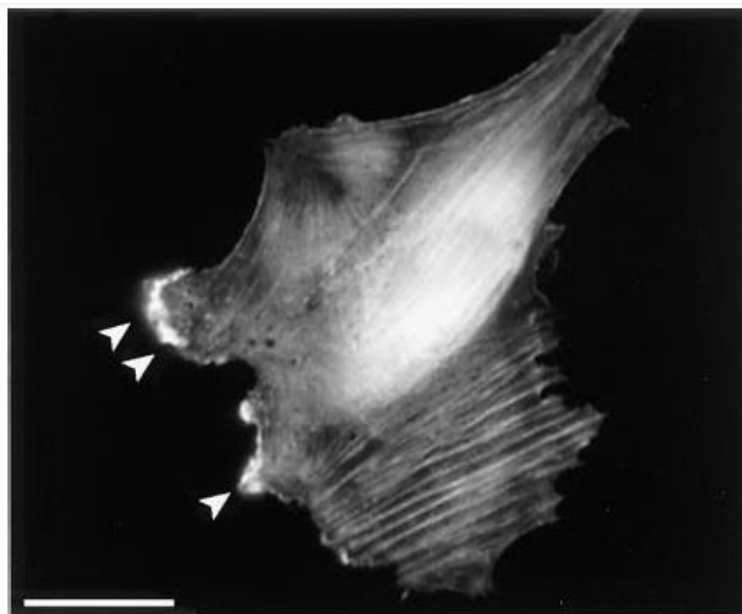
Hemácias



Fung (1993)

Tipos Celulares e Formas

Fibroblastos



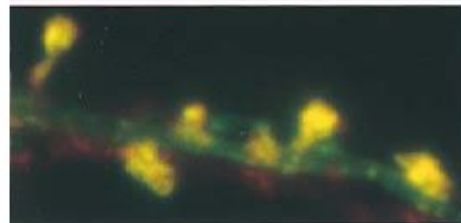
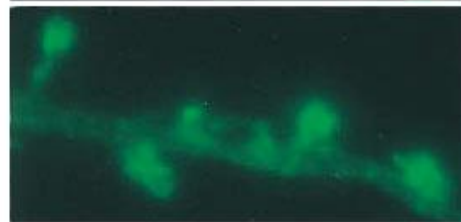
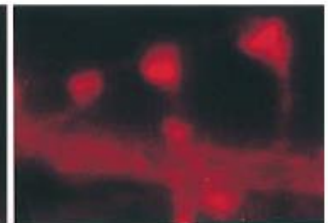
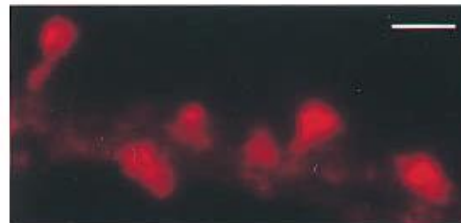
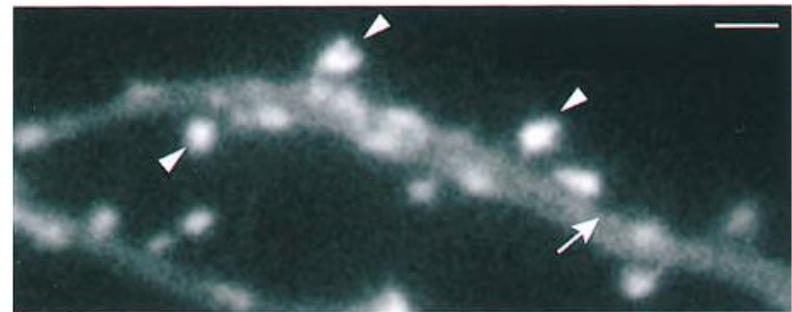
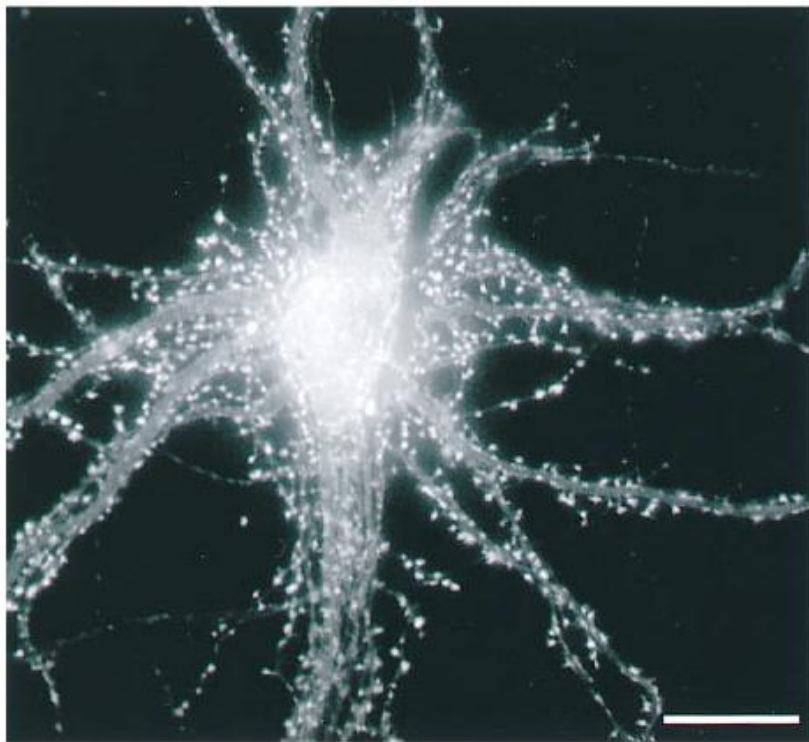
Neurônios



Fischer et al. (1998)

Tipos Celulares e Formas

Neurônios



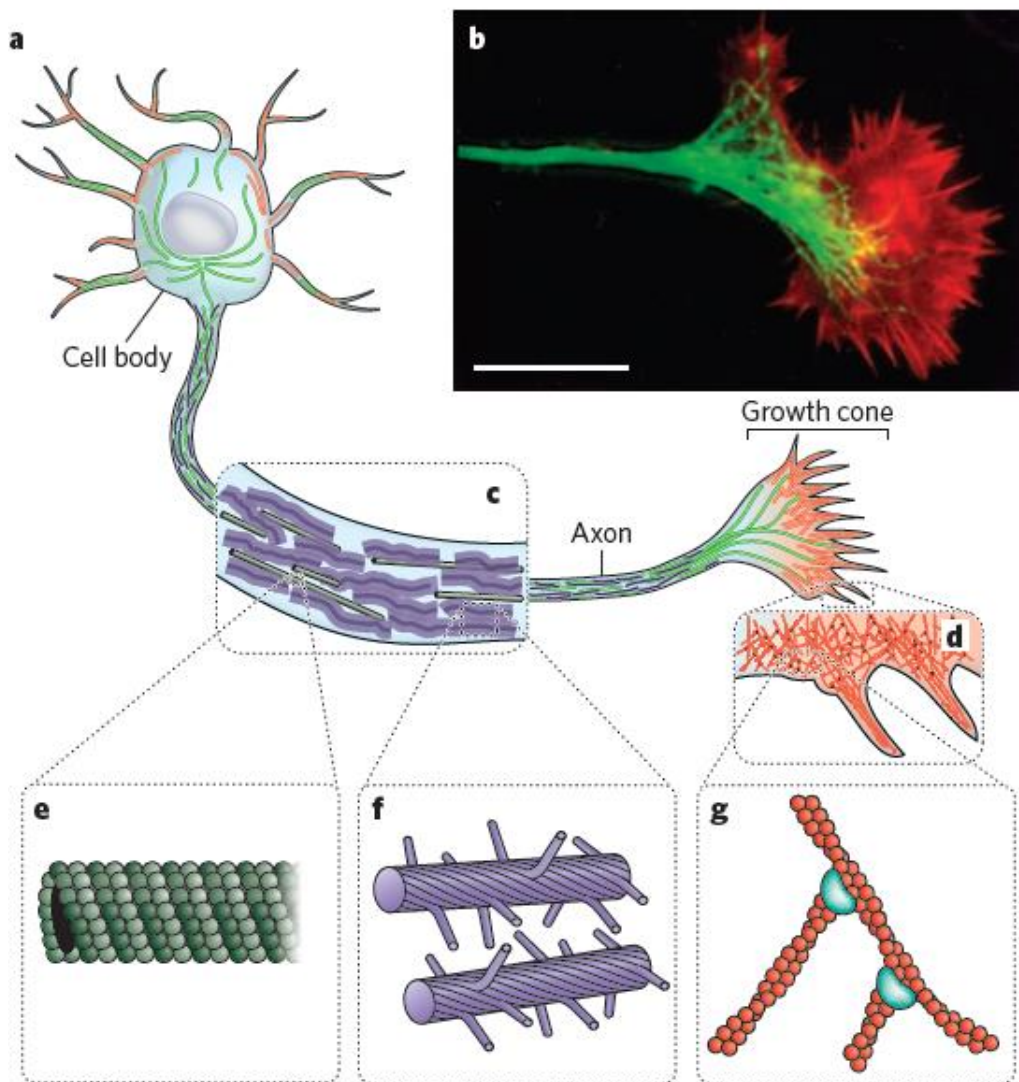
Citoesqueleto

Citoesqueleto – permite rigidez, mas também flexibilidade às células

Possui amplamente três funções:

- Organiza espacialmente o conteúdo celular
- Conecta a célula física e bioquimicamente ao ambiente externo
- Gera forças coordenadas que permitem à célula se mover e mudar de forma

Citoesqueleto



Composição do
Citoesqueleto

e – microtúbulos
f – neurofilamentos
(filamentos
Intermediários)
g – actina

Fletcher and Mullins (2010)

Citoesqueleto

Como toda a arquitetura do citoesqueleto ocorre?

- Diversidade de proteínas regulatórias (fatores promotores de nucleação, polimerases, fatores despolimerizantes etc.)
- Forças mecânicas de dentro ou de fora da célula podem afetar a atividade destes fatores regulatórios e alterar a organização local da rede citoesquelética.

Citoesqueleto

A polimerização e despolimerização dos filamentos de actina e microtúbulos gera forças direcionadas que levam à mudança na forma celular.

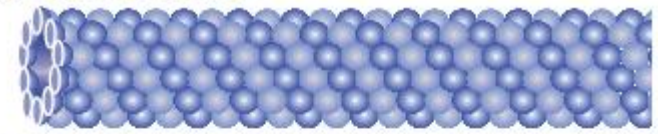
- Motores celulares (dineína, cinesina e miosina) , guiam a organização de componentes celulares.

Citoesqueleto

Composição do Citoesqueleto

- Microtúbulos – mais rígidos
 - Orientam o tráfego durante a divisão celular
 - Fuso mitótico
 - Proteínas motoras – dineína e cinesina

MICROTUBULES



DONALD E. INGBER



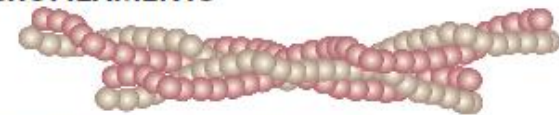
Ingber (1998)

Citoesqueleto

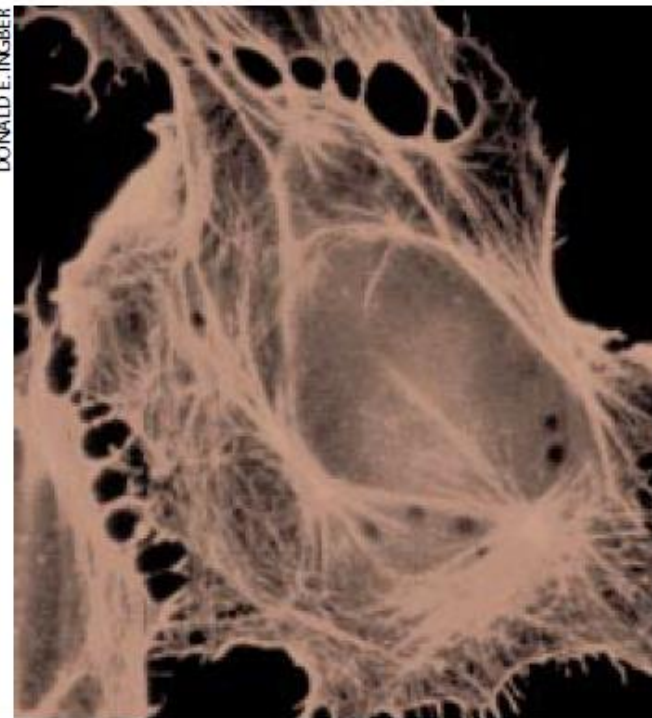
Composição do Citoesqueleto

- Actina
 - Formação de filopódios
 - Contração muscular
 - Fagocitose
 - Endocitose
 - Proteínas motoras - miosinas

MICROFILAMENTS



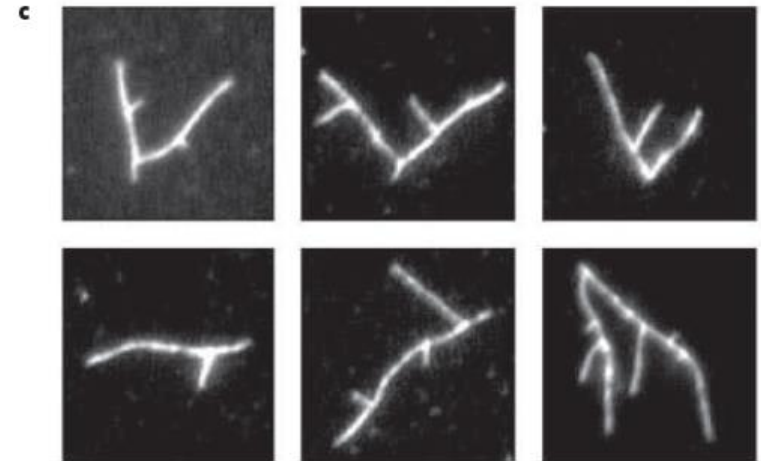
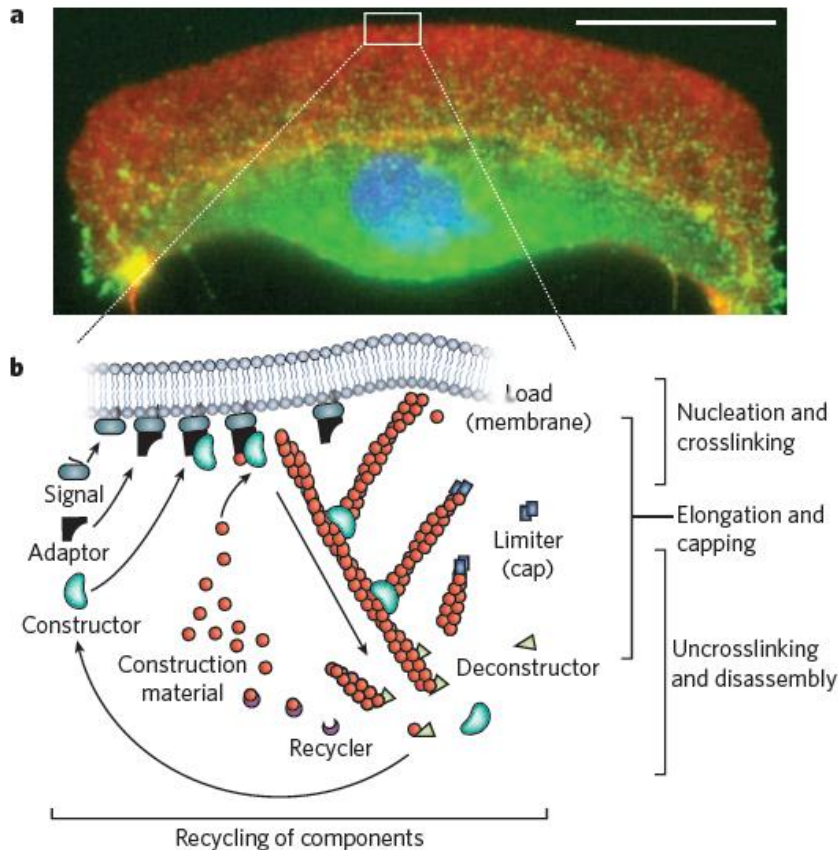
DONALD E. INGBER



Citoesqueleto

Composição do Citoesqueleto

- Actina

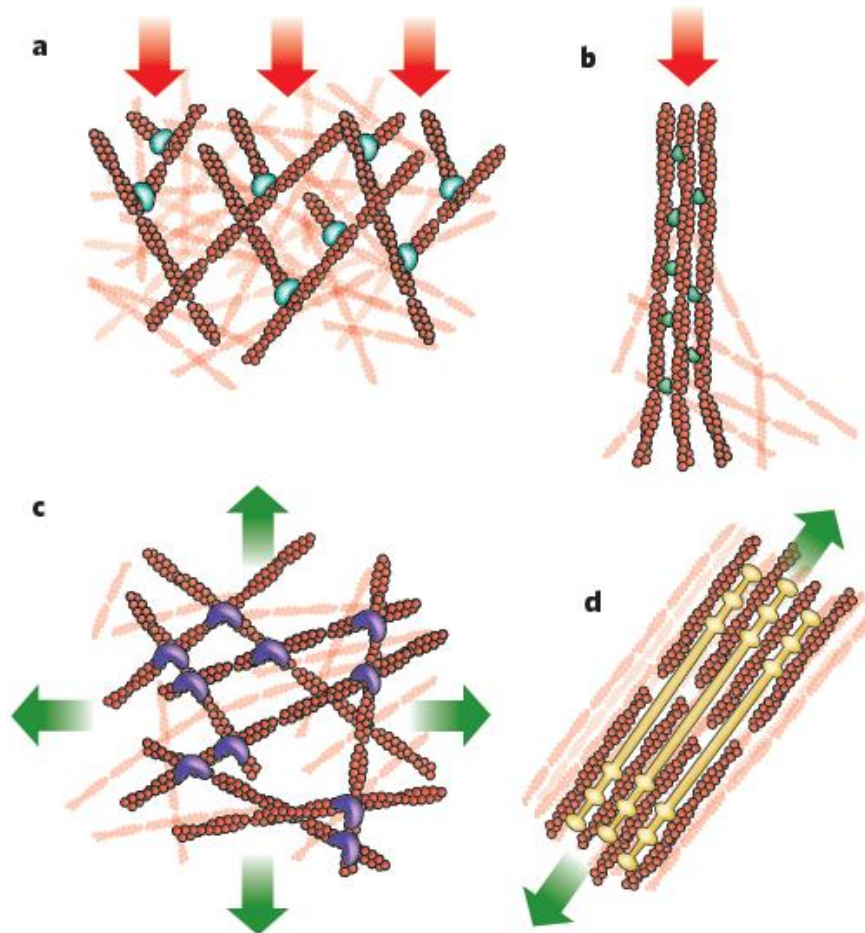


Fletcher and Mullins (2010)

Citoesqueleto

Composição do Citoesqueleto

- Actina



Fletcher and Mullins (2010)

Citoesqueleto

Composição do Citoesqueleto

- Filamentos Intermediários – mais flexível
 - Resiste à tensão
 - Pode se ligar tanto à actina como aos microtúbulos
 - Utilizado em células para resistirem à tensão cisalhante

Citoesqueleto

Citoesqueleto

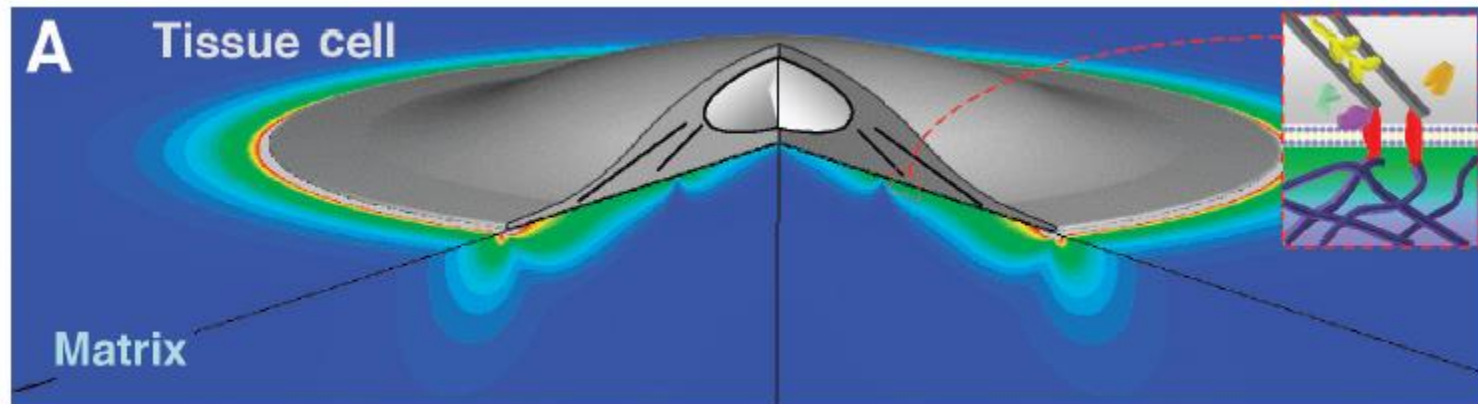
- A tensão provocada em uma célula pode provocar alteração em processos celulares, alterando desde a polimerização de um filamento até uma inteira reorganização

Citoesqueleto

Citoesqueleto - Função

Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate

Dennis E. Discher,^{1*} Paul Janmey,¹ Yu-li Wang²



Key roles in molecular pathways are played by adhesion complexes and the actin-myosin cytoskeleton, whose contractile forces are transmitted through transcellular structures. The feedback of local matrix stiffness on cell state likely has important implications for development, differentiation, disease, and regeneration.

Citoesqueleto

Citoesqueleto - Função

Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification

Adam J. Engler,^{1,2} Shamik Sen,^{1,2} H. Lee Sweeney,¹ and Dennis E. Discher^{1,2,3,4,*}

Matrix Control of Stem Cell Fate

Sharona Even-Ram,¹ Vira Artym,^{1,2} and Kenneth M. Yamada^{1,*}

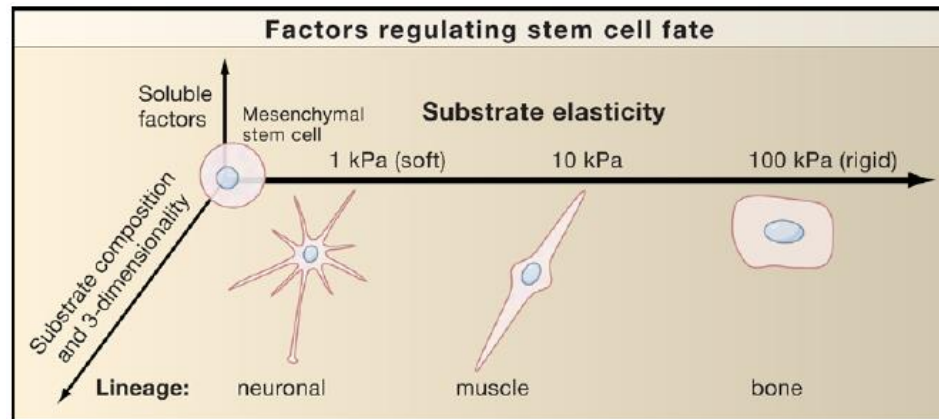


Figure 1. Controlling Stem Cell Fate

Citoesqueleto

Citoesqueleto – Função

Tensional homeostasis and the malignant phenotype

Matthew J. Paszek,^{1,2,6} Nastaran Zahir,^{1,2,6} Kandice R. Johnson,^{1,2} Johnathon N. Lakins,²
Gabriela I. Rozenberg,² Amit Gefen,³ Cynthia A. Reinhart-King,¹ Susan S. Margulies,¹ Micah Dembo,⁴
David Boettiger,⁵ Daniel A. Hammer,¹ and Valerie M. Weaver^{2,*}

When the ‘normal’ mechanical properties of tissue are disrupted, the effects can be considerable. In epithelial cell layers, altered stiffness of the supporting tissue disrupts morphogenesis and drives the epithelial cells towards a malignant phenotype.

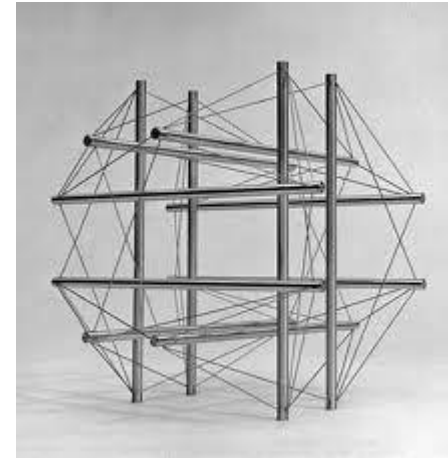
Citoesqueleto

Citoesqueleto – Função

- Alguns autores consideram que há uma “memória” mecânica das células, que seria passado após as divisões celulares e não relacionada ao material genético

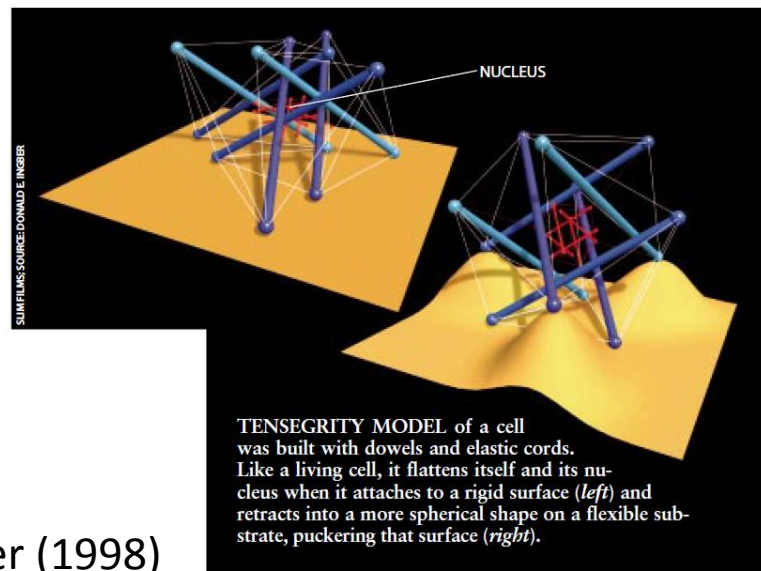
Citoesqueleto

- Modelo Celular
 - Arquitetura em “*tensegrity*”
 - Sistema que se ajusta mecanicamente devido à sua composição
 - Forças compressivas e tensionais são ajustadas dentro da própria estrutura



Citoesqueleto

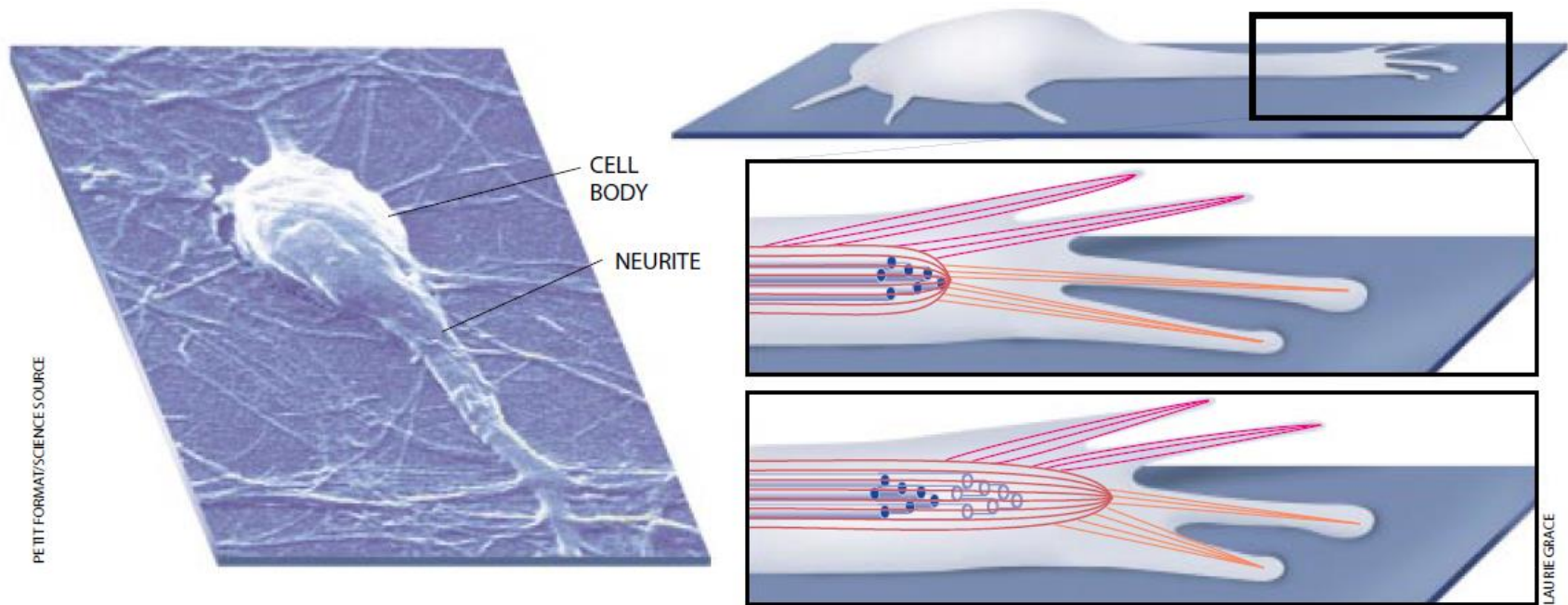
- Modelo Celular
 - “*Tensegrity*”
 - Protensão – a estrutura está constantemente com seus componentes comprimidos ou tensionados
 - Após a aplicação de força externa, a estrutura mantém a estabilidade



Ingber (1998)

Citoesqueleto

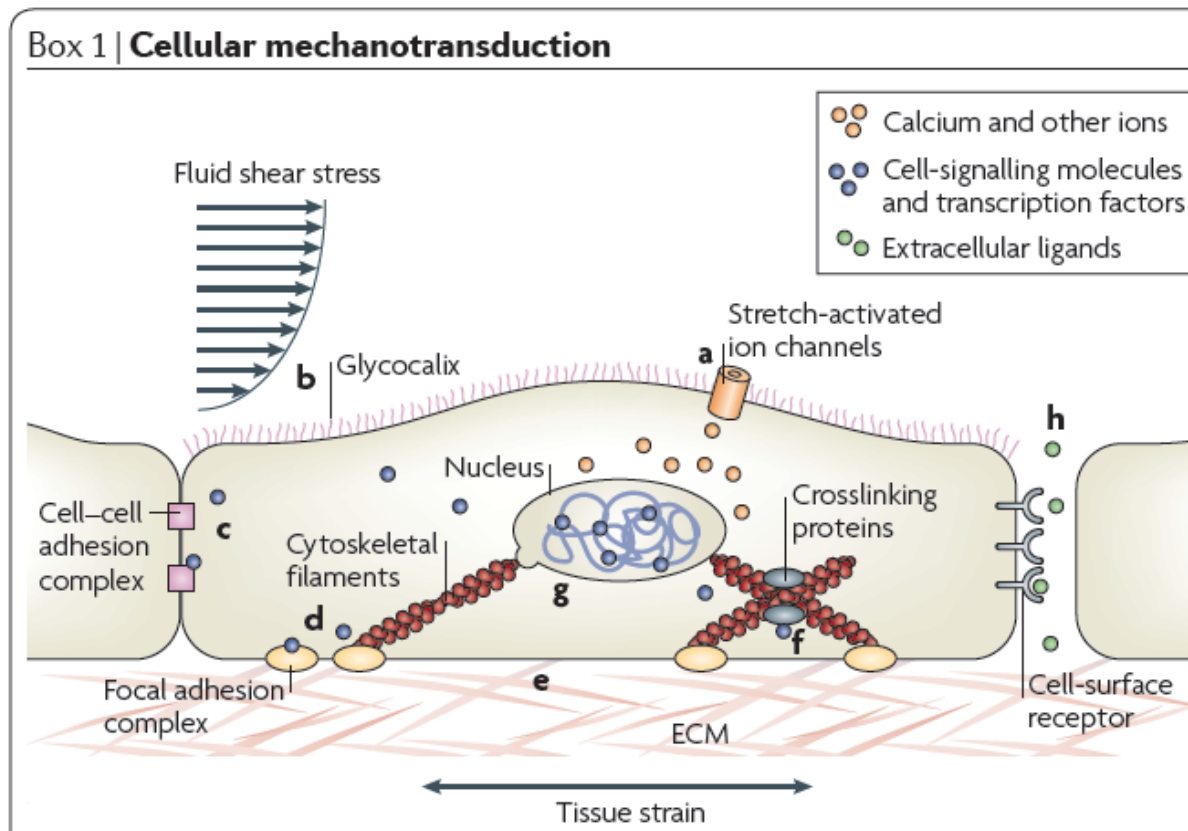
- Modelo Celular
 - “Tensegrity”



Ingber (1998)

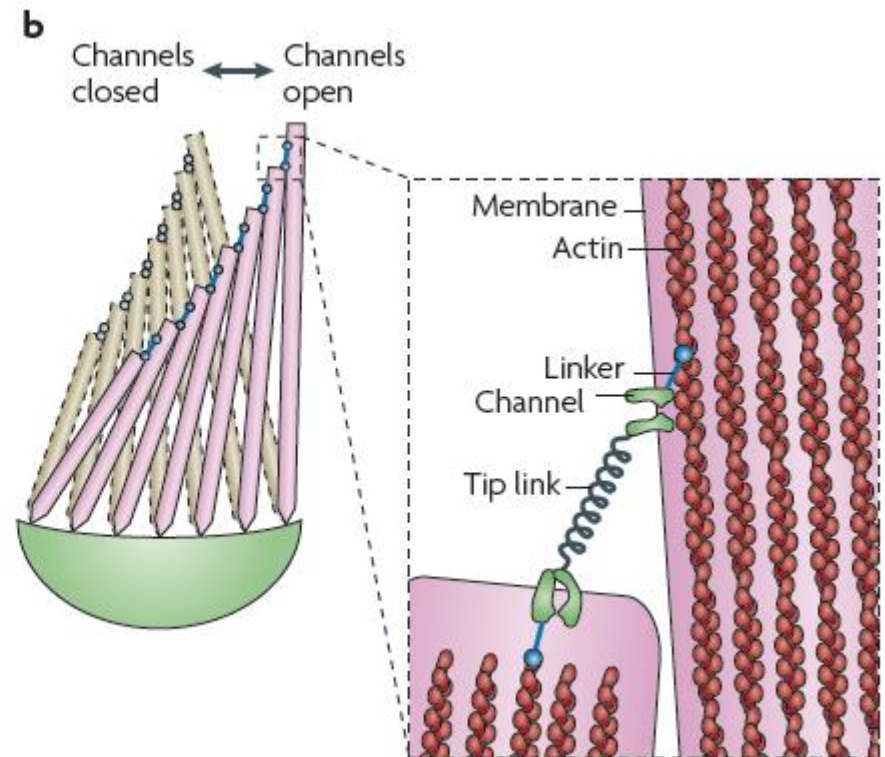
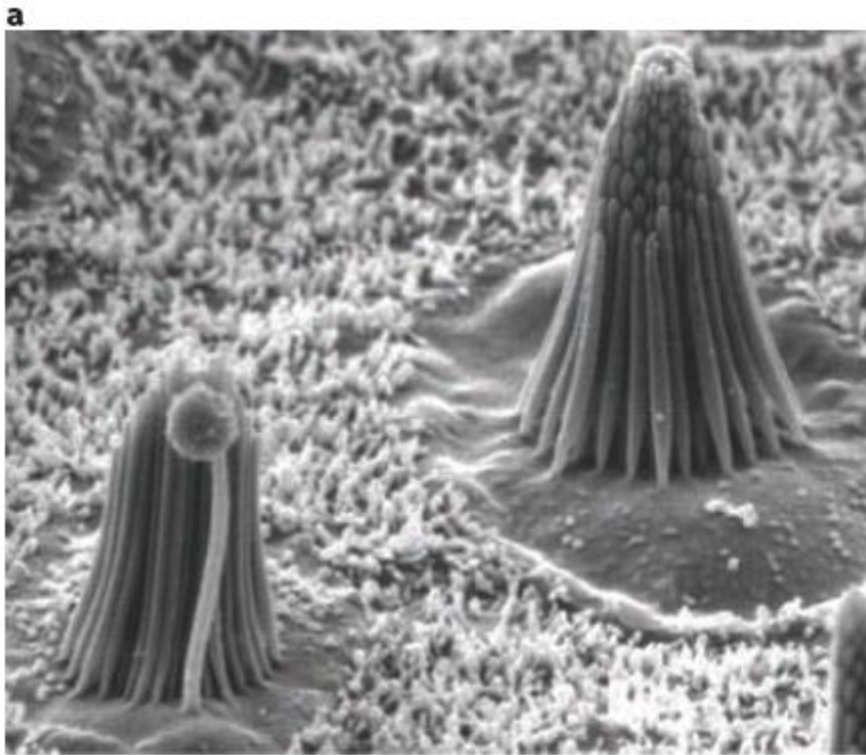
Citoesqueleto

- Mecanotransdução
 - Sinais externos influenciam na expressão gênica celular



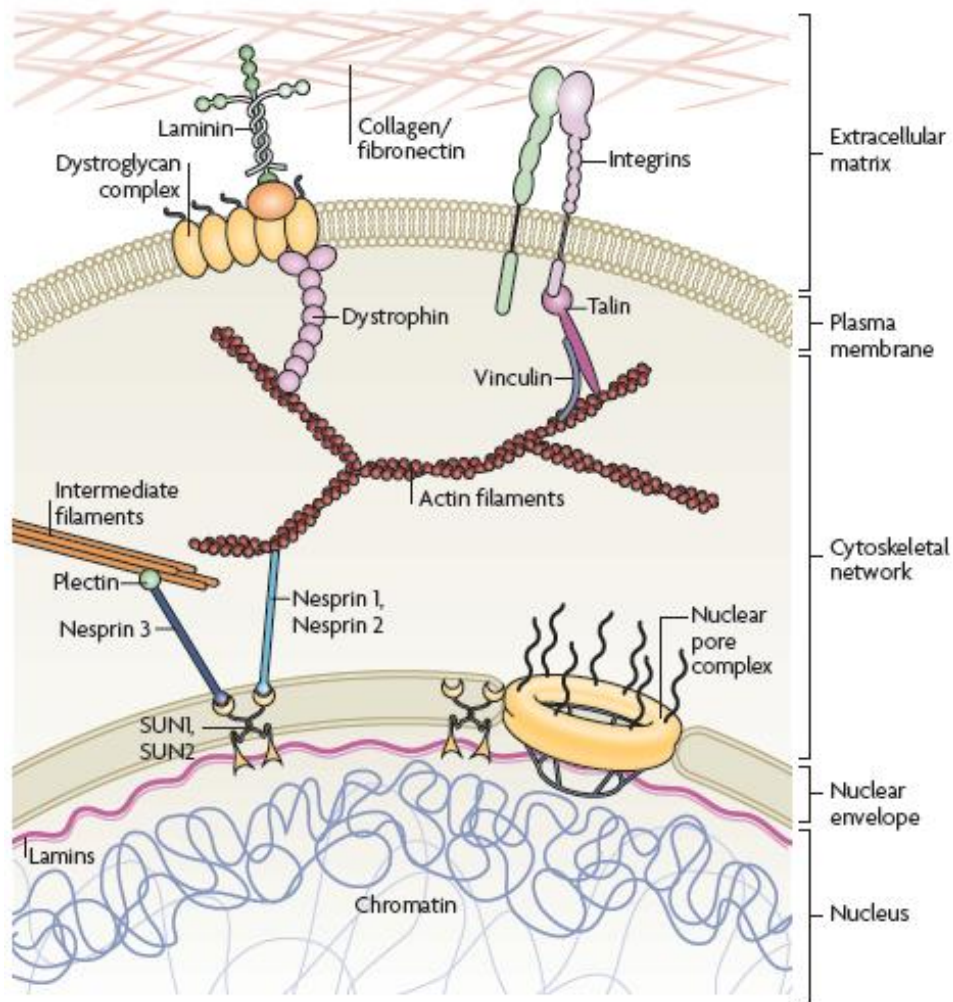
Citoesqueleto

- Mecanotransdução
 - Envio de sinais ao cérebro



Citoesqueleto

- Mecanotransdução



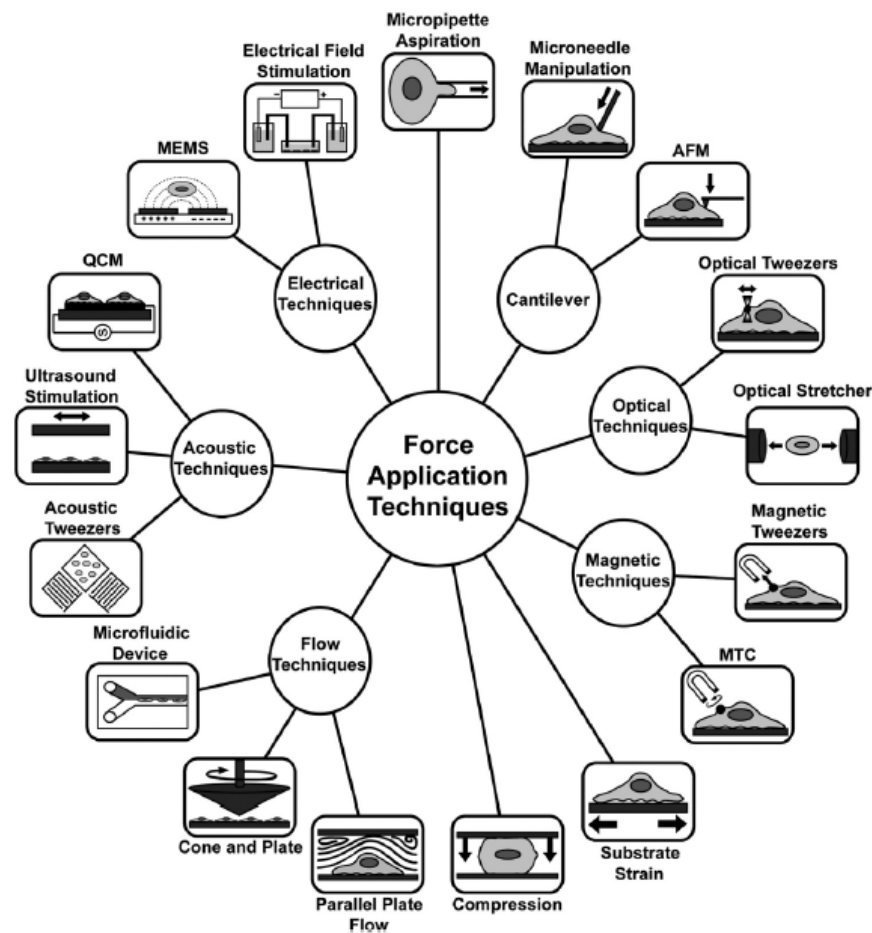
Jaalouk and Lammerding (2009)

Mecânica Celular

- Formas de Avaliação
 - Técnicas de Aplicação de Força – mede-se a resposta da célula após deformação ou aplicação de força
 - Técnicas de Detecção de Força – detecção de força das células durante seu desenvolvimento

Mecânica Celular

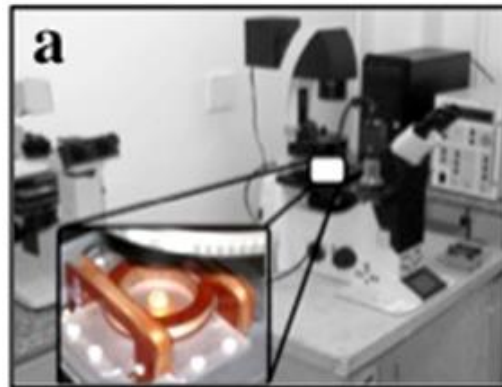
- Técnicas de Aplicação de Força



OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Técnica utilizada para quantificar as alterações nas propriedades elásticas e viscosas do esqueleto celular

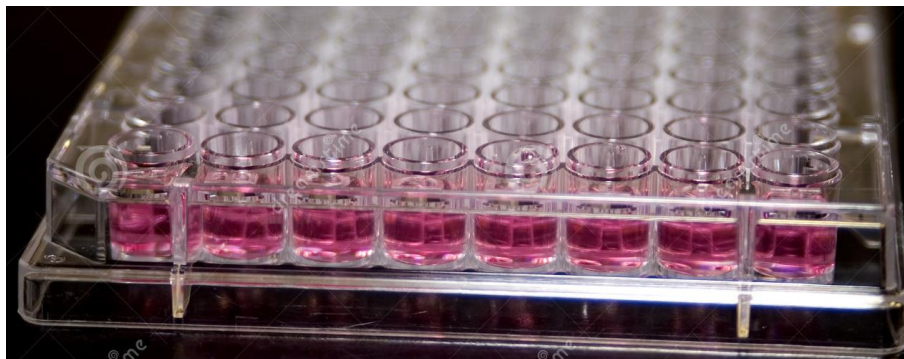
- Sistema de aquisição e processamento de imagens
- Microscópio invertido
- Gerador de campo magnético oscilatório



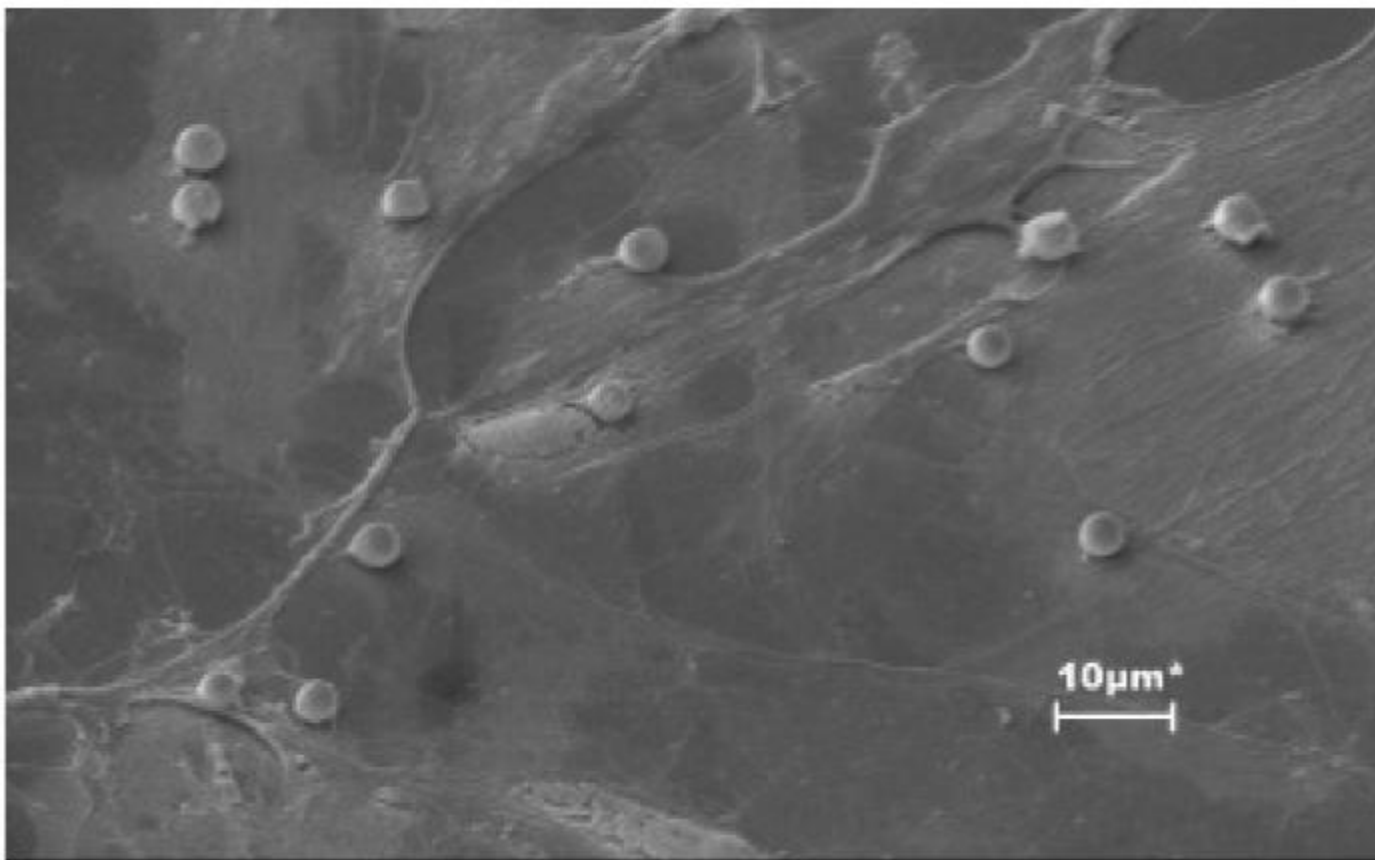
OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Metodologia

- Preparação das células em microplacas
- Microesferas (4,5 μm diâmetro) ferromagnéticas
- Recobertas com peptídeo (RGD) – facilita a fixação das microesferas à membrana celular
- Integração ao citoesqueleto

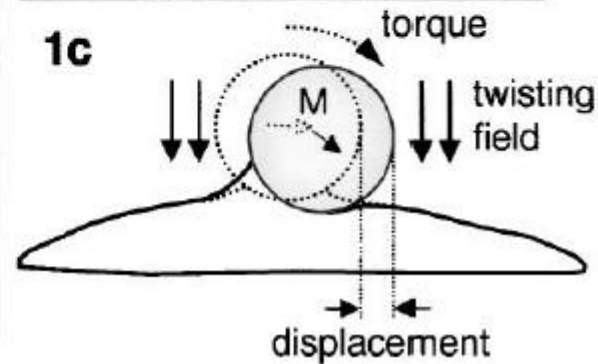
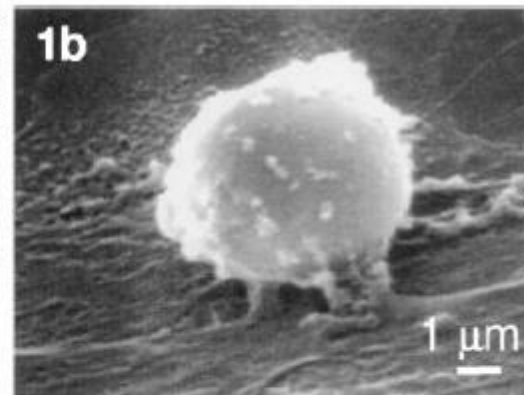
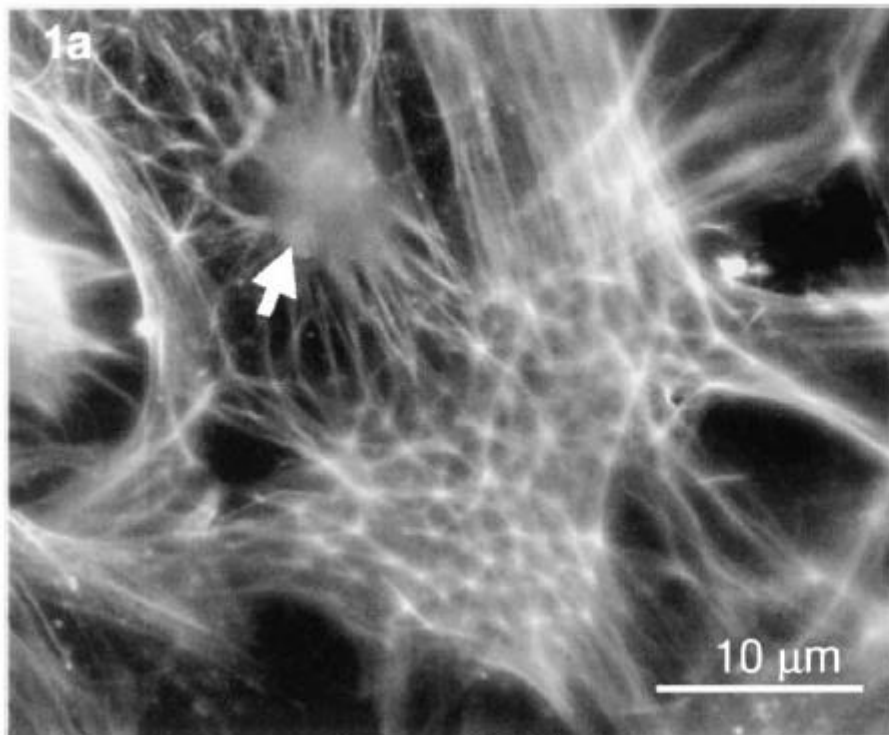


OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação



Lenormand et al. (2008)

OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação



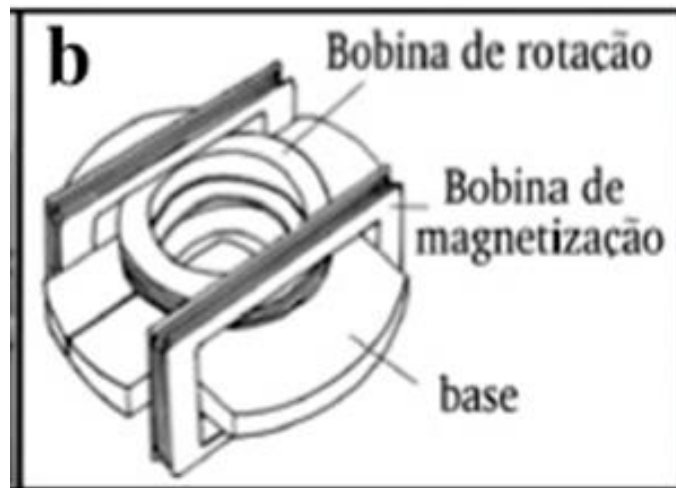
Fabry et al. (2001a)

OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Aderidas as esferas à membrana...

1º Passo

- Um sistema de magnetização controlado por computador magnetiza horizontalmente as microesferas



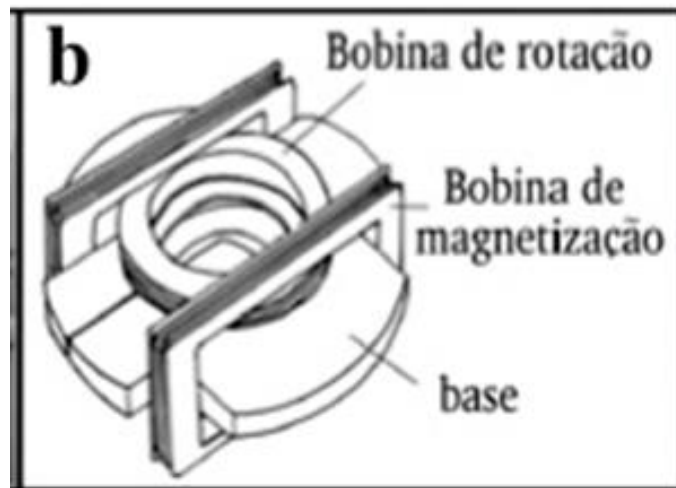
Fabry et al. (2001b)

OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

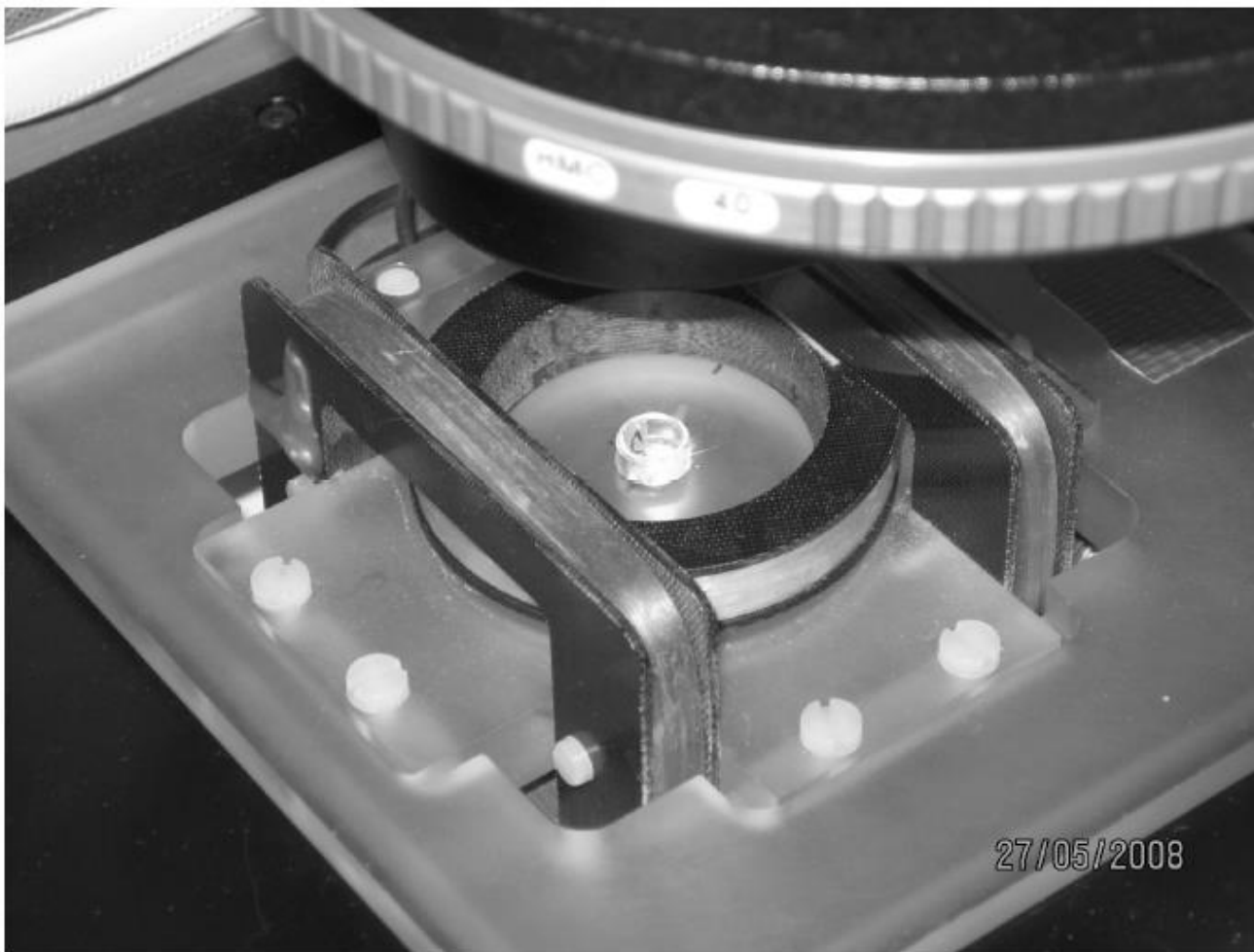
Aderidas as esferas à membrana...

2º Passo

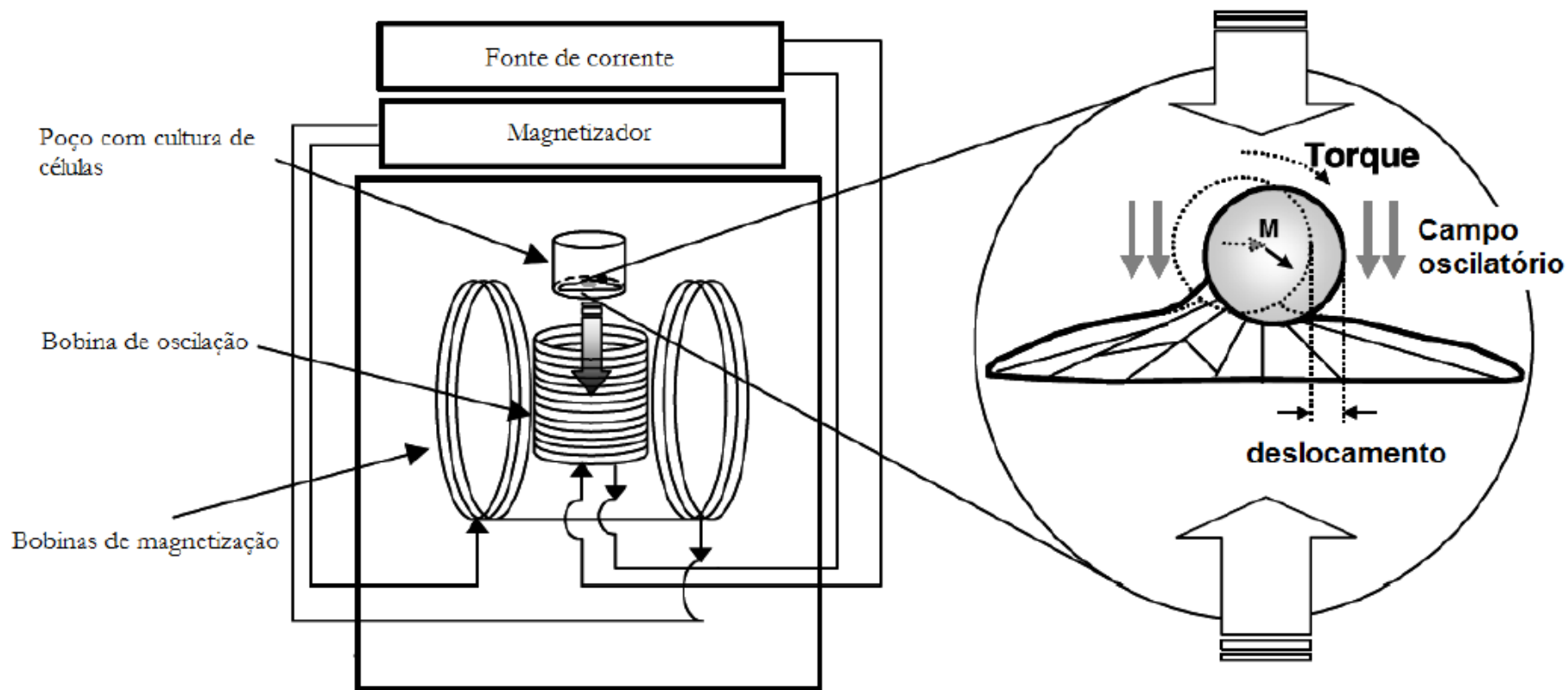
- Aplicação de um campo magnético vertical homogêneo de forma senoidal



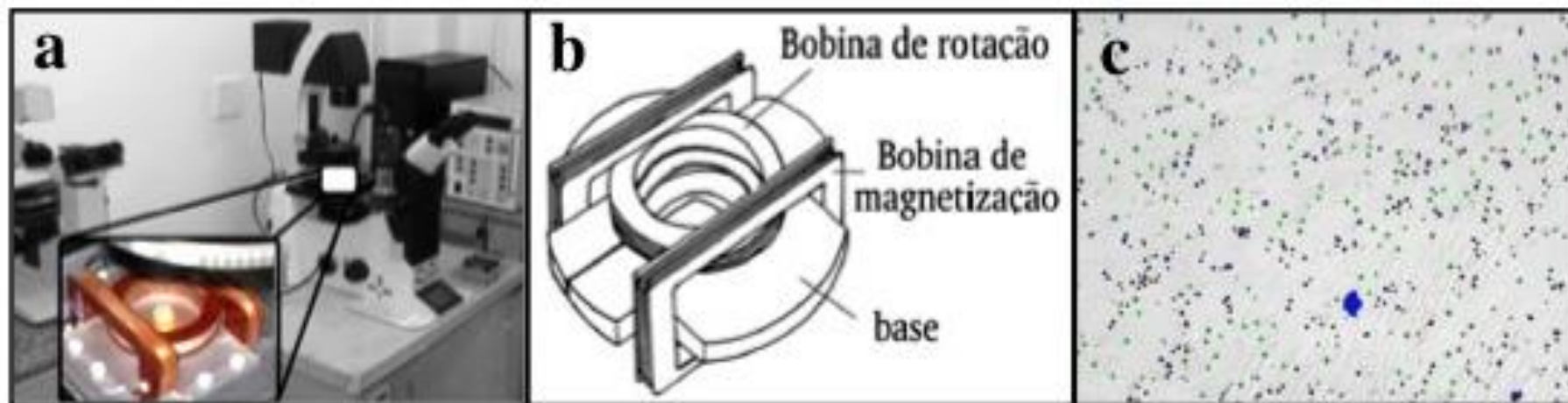
OMTC



OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação



Fabry et al. (2001b)



Fabry et al. (2001b)

MainWindow
OMTC-Linux - LabM2 (Physics Institute - USP) - Version 1.2 (20110921)

/home/OMTC/Desktop/OMTCdata/ Change Dir Save Project

Data OKAY /home/OMTC/Desktop/OMTCdata/Marcia/fabio.mcs Open Project Save As Reload Reset

Advance **Identify Beads** Magnetic Field LogBook Enter New Project Name New Project

of Beads 275 # of Good Beads 0 Width 000 Height 600

Calc. Threshold 170 Load Image Stop CCD

Detect Threshold 140 Continuo FPS

Window Size 11 Show Hits 20.1

Bead Diameter 9 Save ShowHits

Bead Distance 10 Find Beads 0%

Image Basename
teste_menos_02

Bead: 1 **Frequency setup**

- Image/Frequency
- Time/Frequency
- Images/Time

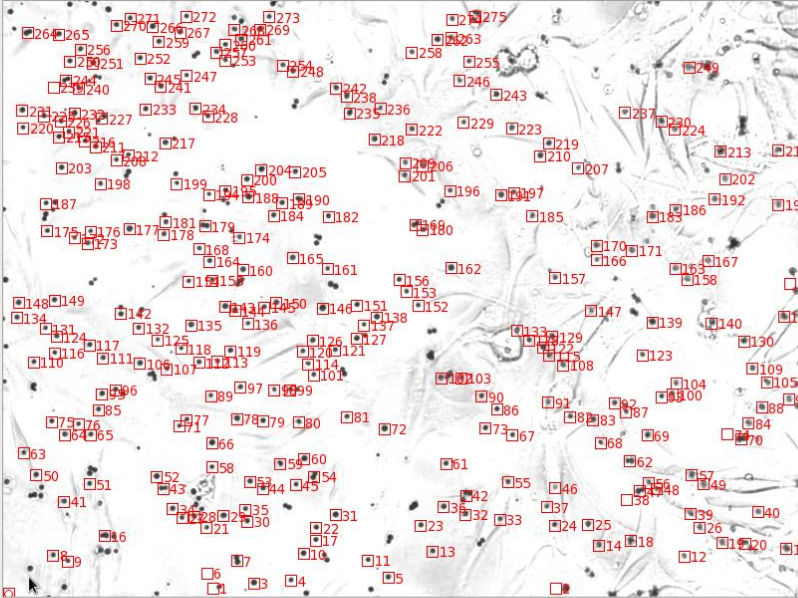
First 0 Last 1000

Frequency 10.00 Time 100.00

Save Images each: 15

Current Frame 1000 Build Log Track Beads

Convert Initial to BMP Stop



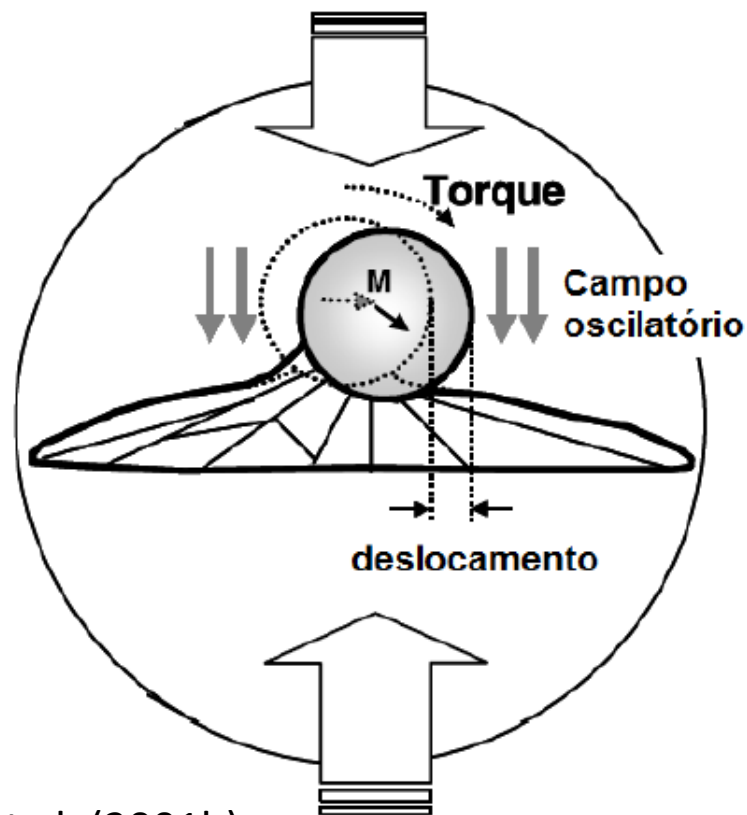
No frames were dropped.

OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

- Campo magnético → Torque → Movimento da microesfera

$$T^*(\omega)$$

$$d^*(\omega)$$



OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Cálculo do Módulo Complexo de Cisalhamento

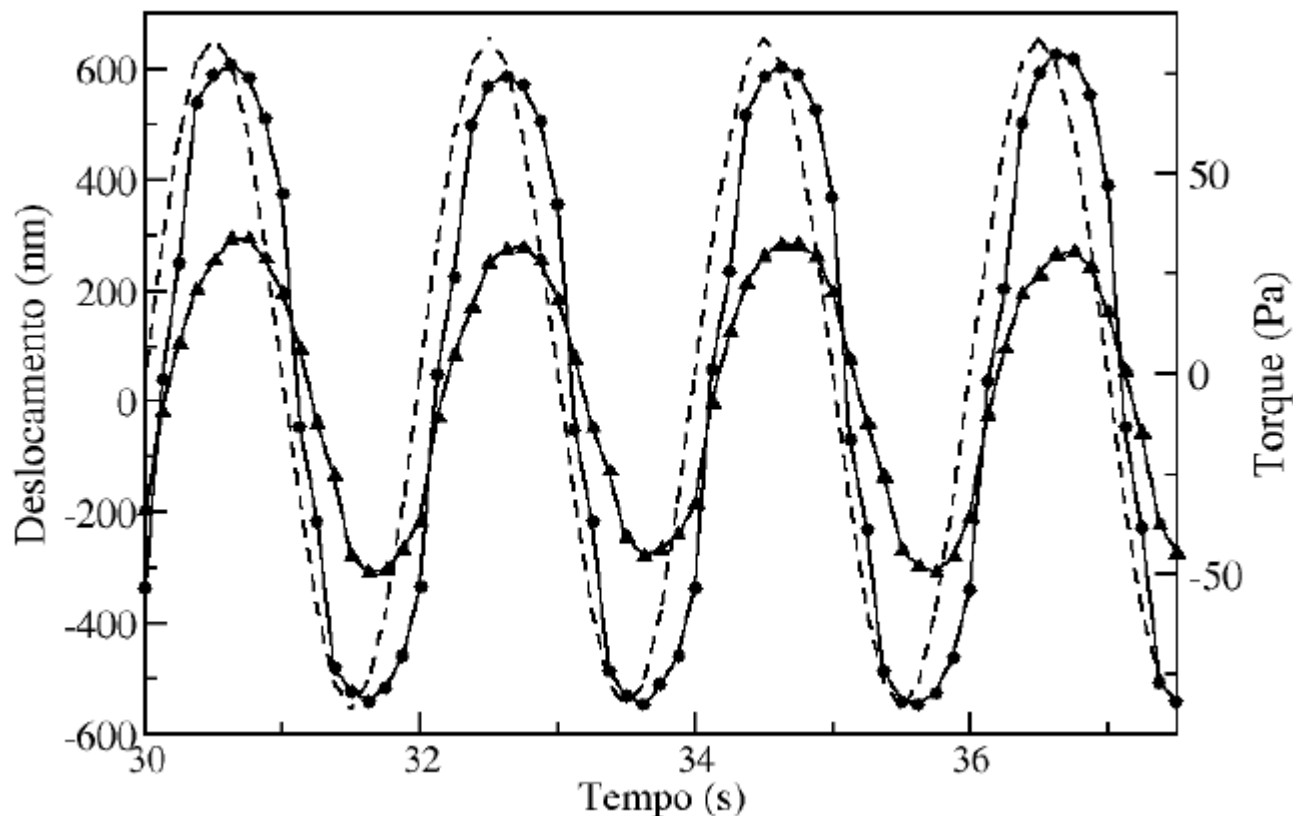
Transformada de Fourier do Torque e do Deslocamento

$$G^*(\omega) = \frac{T^*(\omega)}{d^*(\omega)}$$

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + jG''(\omega)$$

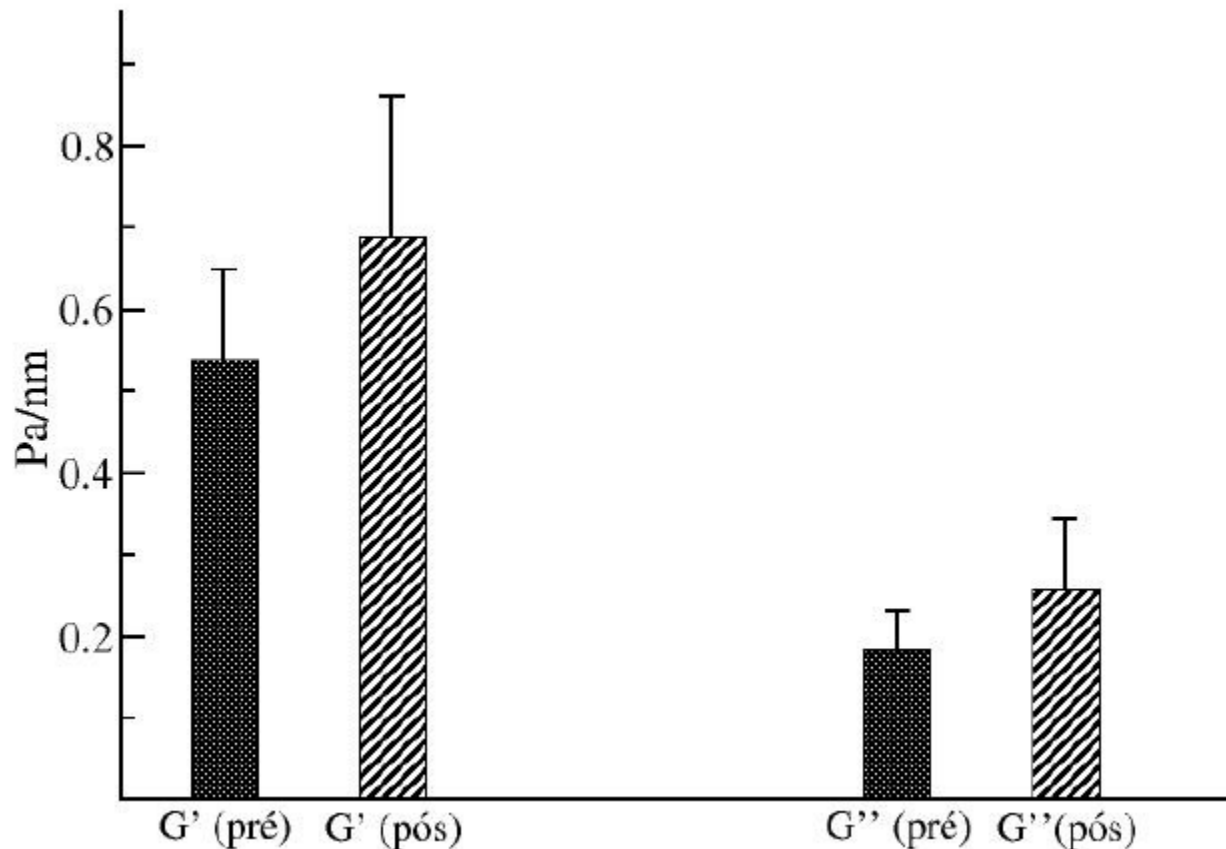
OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Análise dos Resultados – Movimento e Torque na Esfera



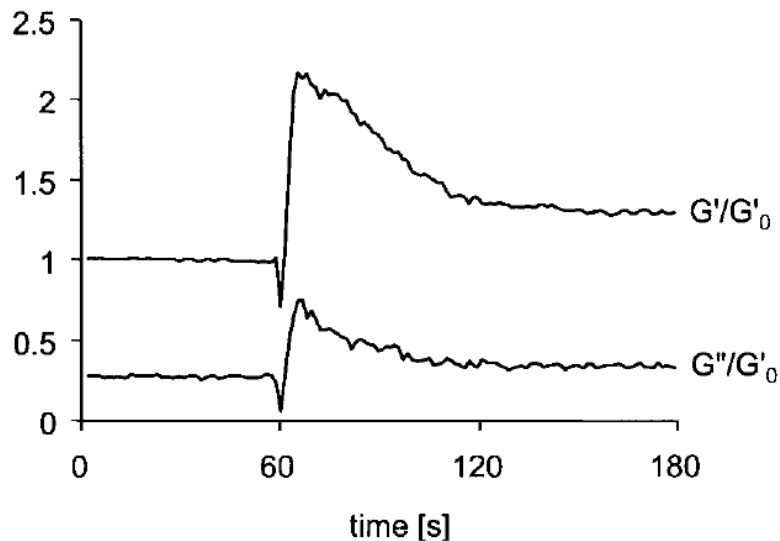
OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Análise dos Resultados – Módulos de Armazenamento e Perda



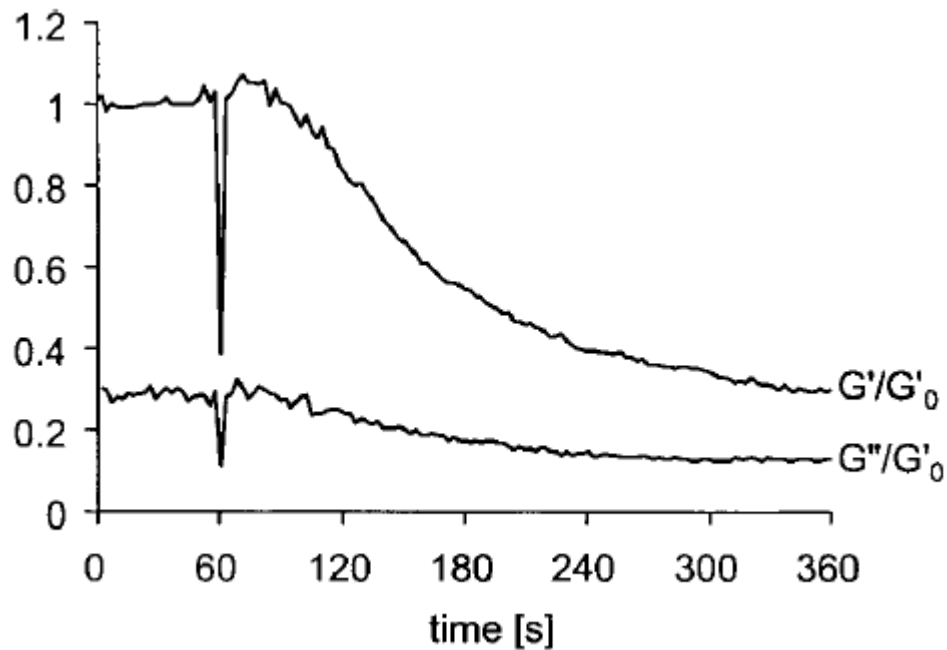
OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Aplicação de Constritor Muscular



OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Aplicação de Relaxante Muscular



OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Célula é Sólida ou Fluida?

Amortecimento estrutural

$$\tilde{G} = G_0 \left(\frac{\omega}{\Phi_0} \right)^{x-1} (1 + j\bar{\eta}) \Gamma(2 - x) \cos \frac{\pi}{2} (x - 1) + j\omega \mu$$

$$\bar{\eta} = \tan(x - 1)\pi/2$$

G_0 e Φ_0 Fatores de escala

G_0 e μ Dependem da geometria célula-esfera

μ Termo relacionado à viscosidade Newtoniana

OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

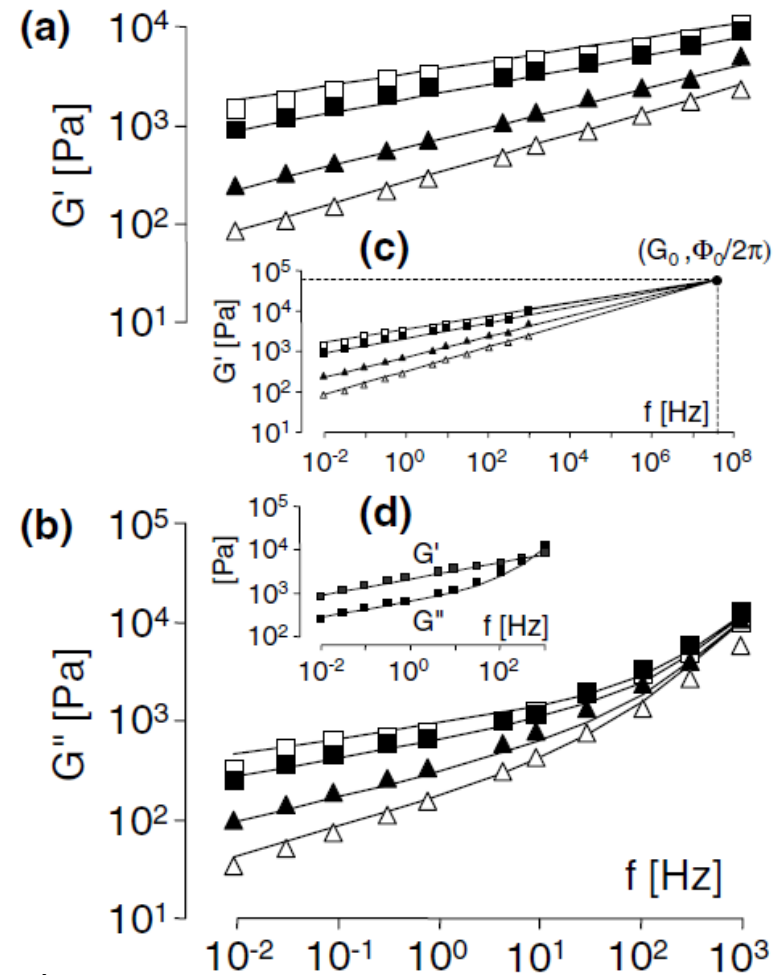
Outra forma de se estudar:

Amortecimento estrutural

Comportamento com lei de potência de $(x-1)$

$x=1$ comportamento de sólido

$x=2$ comportamento de fluido



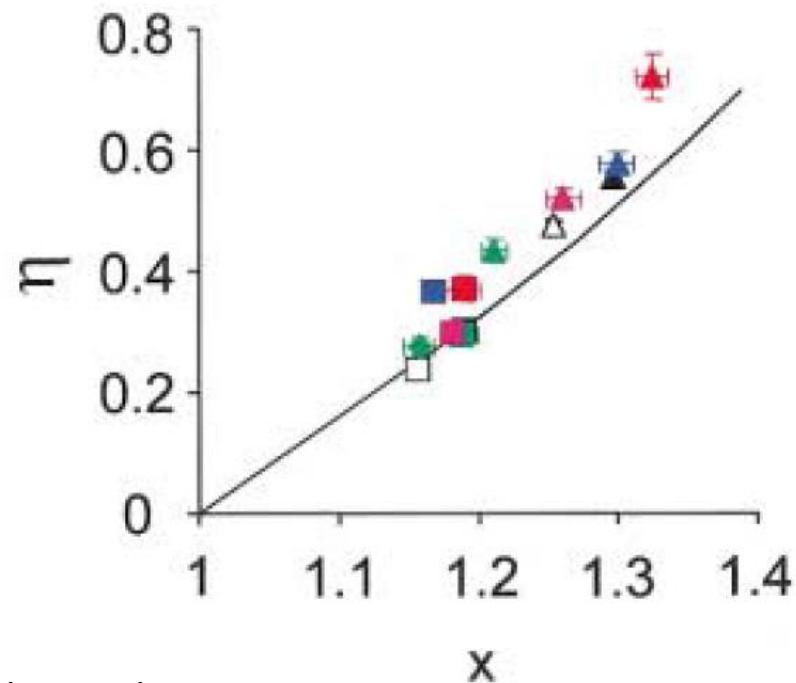
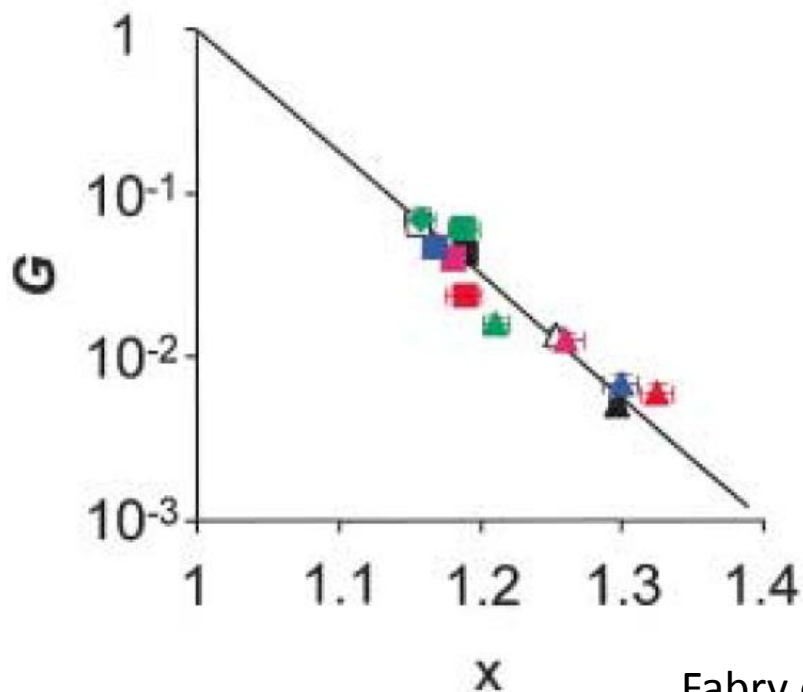
OMTC

OMTC – Citometria Magnético Ótica de Oscilação

Células – Comportamento de material vítreo mole

Dependência por Lei de potência fraca

Tangente de perda independente de frequência



Fabry et al. (2001a)

Referências Bibliográficas

- Fabry, B. et al. Scaling the Microrheology of Living Cells. *Physical Review Letters*, v. 87, n. 14, 2001a.
- Fabry, B. et al. Selected Contribution: Time course and heterogeneity of contractile responses in cultured human airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol*, v. 91, p. 986-994, 2001b.
- Fischer, M. et al. Rapid Actin-Based Plasticity in Dendritic Spines. *Neuron*, v. 20, p. 847-854, 1998.
- Fletcher, D. A.; Mullins, R. D. Cell Mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, v. 463, p. 485-492, 2010.
- Fung, Y. C. **Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues**. 2nd ed. New York: Springer, 1993. 568p.

Referências Bibliográficas

- Ingber, D. E. The Architecture of Life. *Scientific American*, p. 48-57, Jan 1998.
- Jaalouk, D. E.; Lammerding, J. Mechanotransduction gone awry. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, v. 10, p. 63-73, 2009.
- Lenormand, G. et al. The Cytoskeleton of the Living Cell as an Out-of-Equilibrium System. In : Pollack, G. H.; Chin, W. C. (Eds.) **Phase Transitions in Cell Biology**. Springer, 2008, p. 111-141.
- Rodriguez, M. L.; McGarry, P. J.; Sniadecki, N. J. Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches. *Applied Mechanics Reviews*, v. 65, 2013.