



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Departamento de Física

Erick Rafael Dias Rates

**Evolução Patológica das Camadas Epitelial e  
Endotelial com Ceratopatia Bolhosa por AFM**

São Luís - MA

2023

Erick Rafael Dias Rates

# **Evolução Patológica das Camadas Epitelial e Endotelial com Ceratopatia Bolhosa por AFM**

Monografia apresentada como requisito para  
conclusão do curso de graduação em Física  
- Licenciatura da Universidade Federal do  
Maranhão.

Departamento de Física  
Universidade Federal do Maranhão

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Magalhães Rebelo Alencar

São Luís - MA

2023

Erick Rafael Dias Rates

## **Evolução Patológica das Camadas Epitelial e Endotelial com Ceratopatia Bolhosa por AFM**

Monografia apresentada como requisito para  
conclusão do curso de graduação em Física  
- Licenciatura da Universidade Federal do  
Maranhão.

Trabalho de Conclusão de Curso. São Luís - MA, 27 de Julho de 2023:

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Magalhães Rebelo  
Alencar**  
Orientadora  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Elaine de Paula Fiod Costa**  
Examinador Interno  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof. Me. Charles Duarte Almeida**  
Examinador Externo  
Universidade Federal do Maranhão

São Luís - MA  
2023

*À minha maravilhosa mãe, ao meu exemplo pai,  
à minha amiga irmã, a minha companheira fiel Maggie.*



# Agradecimentos

Agradecer a Deus pela oportunidade de vida e compreensão de sua grande obra chamada natureza.

A minha família, que nunca me deixou faltar amor, carinho, refúgio, as coisas mais importantes.

À professora Dra. Luciana, pela orientação nesta monografia. Sou imensamente grato pela sua ajuda, orientação e ensino que me oferecete. Obrigado por tudo o que me destes e me proporcionou. Obrigado pela maravilhosa experiência, conversa, risadas e pela expectativa de futuro.

À minha fiel companheira, Maggie, que sempre foi meu apoio emocional e nunca me deixou sozinho no mundo.

A meu pai, Evilson, por ter ser meu maior exemplo, inspiração e motivação.

Aos meus companheiros do laboratório LBN, por cuidarem de mim, por me ensinarem e por terem paciência comigo.

Aos meus amigos que a UFMA me ofereceu, Socorro, Álefe, Bia, Deyvison, Thiago, Thays, Jhonnatan, Góis e Bárbara.

Aos meus amigos do ensino médio, que mesmo após tantos anos, ainda se reúnem e me fazem feliz como sempre.

Agradeço a todos. Obrigado a cada pessoa que me ensinou qualquer coisa durante toda essa longa e difícil caminhada.

*“A crítica válida é um favor ao cientista”*

(Carl Sagan)

# Resumo

A córnea é um tecido ocular fundamental para o sentido da visão. Ela é responsável por dois terço da refração da luz, fundamental para o processo visual, além de fornecer proteção a danos mecânicos. Sendo transparente, avascular e inervado, a córnea consiste em cinco camadas principais: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. Cada camada constitui um papel fundamental para a funcionalidade e manutenção do tecido ocular, fornecendo propriedades ultraestruturais e biomecânicas únicas. A ceratopatia bolhosa (CB) é uma disfunção endotelial que leva ao edema da córnea, perda da acuidade visual, bolhas epiteliais, dor intensa, entre outros sintomas. As propriedades biofísicas da córnea são passíveis de mudanças quanto as suas propriedades biofísicas promovidas pela ceratopatia. Neste contexto, a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) em ar foi utilizada para investigar a superfície epitelial anterior e endotelial posterior, saudável e com CB, utilizando uma ponta triangular de silício com constante de mola nominal de 0.4 N/m. Dados de rugosidade, calculados por ajuste polinomial de terceira ordem, adesão e módulo de Young foram obtidos para servir de comparação e identificação das alterações morfológicas e biomecânicas possivelmente associadas à patologia, como crateras na camada epitelial e exposição de uma camada fibrótica devido à perda da parede celular endotelial. Tais resultados podem fornecer novos marcadores das propriedades físicas do tecido ocular na tentativa de entender a fisiologia da córnea quando portadora da patologia.

**Palavras-chave:** Córnea, Ceratopatia Bolhosa, Força Atômica.

# Abstract

The cornea is a fundamental ocular tissue for the sense of sight. It is responsible for two thirds of the refraction of light, fundamental to the visual process, in addition to providing protection from mechanical damage. Being transparent, avascular and innervated, the cornea consists of five main layers: epithelium, Bowman's layer, stroma, Descemet's membrane and endothelium. Each layer plays a key role in the functionality and maintenance of ocular tissue, providing unique ultrastructural and biomechanical properties. Bullous keratopathy (BK) is an endothelial dysfunction that leads to corneal edema, loss of visual acuity, epithelial blisters, severe pain, among other symptoms. The biophysical properties of the cornea are subject to changes in terms of their biophysical properties promoted by keratopathy. In this context, the technique of Atomic Force Microscopy (AFM) in air was used to investigate the anterior epithelial and posterior endothelial surface, healthy and with BK, using a triangular silicon tip with a nominal spring constant of 0.4 N/m. Roughness data, calculated by third-order polynomial adjustment, adhesion, and Young's modulus were obtained to serve as a comparison and identification of morphological and biomechanical changes possibly associated with the pathology, such as craters in the epithelial layer and exposure of a fibrotic layer due to loss of endothelial cell wall. Such results can provide new markers of the physical properties of the ocular tissue in an attempt to understand the physiology of the cornea when it bears the pathology.

**Keywords:** Cornea, Bullous Keratopathy, Atomic Force.

# Lista de ilustrações

Figura 1 – Anatomia da Córnea em suas diferentes camadas seguindo a ordem da mais externa para mais interna: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. . . . .	17
Figura 2 – Representação dos três tipos de células epiteliais: planas poligonais (superficiais), alares ou caliciformes e basais. . . . .	19
Figura 3 – Imagem por AFM. A topografia é composta por uma rede de fibras e poros. . . . .	20
Figura 4 – Imagem da monocamada endotelial de galinhas por microscopia especular. . . . .	21
Figura 5 – Esquema representativa sobre a fisiologia do bombeamento ativo de $\text{Na}^+/\text{K}^+$ da camada endotelial controlando a hidratação da córnea pelo humor aquoso . . . . .	22
Figura 6 – Córnea portadora de CB. Setas pretas indicam bolhas formadas na camada epitelial. . . . .	24
Figura 7 – Principais componentes do Microscópio de Força Atômica. . . . .	27
Figura 8 – Modos de Operação por AFM: modo contato, modo tapping e modo não contato. Todos eles operam em regimes de forças atrativas e/ou repulsivas seguindo sua natureza física e distância entre ponta-amostra . . . . .	39
Figura 9 – Esquema de uma típica curva de força por deflexão/deslocamento, oriunda em uma amostra macia. . . . .	40
Figura 10 – Raios incididos são refletidos devido às irregularidades na superfície do material. . . . .	43
Figura 11 – Parâmetro Rugosidade Média $Ra$ . . . . .	44
Figura 12 – Diferentes irregularidades podem dar valores iguais de Rugosidade Média. . . . .	44
Figura 13 – Amostra de Córnea adquiridas em parceria com o Bando de Olhos da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA. . . . .	46
Figura 14 – Microscópio de Força Atômica Multimode 8 - Bruker . . . . .	47
Figura 15 – Mapas topográficos $5\mu\text{m}^2$ da membrana celular endotelial controle (A) e patológica (C). Maiores detalhes podem ser visualizados no zoom de $1\mu\text{m}^2$ (B-C) destacado nos mapas topográficos de cada grupo. . . . .	50
Figura 16 – Mapas topográficos de $10\mu\text{m}^2$ bidimensionais (A) e tridimensionais (C) mostram os feixes de colágeno da matriz extracelular formada pelas lesões. O colágeno pode ficar ainda mais evidente em varredoras de $5\mu\text{m}^2$ 2D (B) e 3D (D). Estruturas globulares podem ser destacadas em grandes (setas azuis) e pequenas (setas vermelhas) . . . . .	51
Figura 17 – Camada fibrótica nas camadas mais internas da córnea. O tecido ocular desenvolve fibrose em resposta a lesões. . . . .	52

Figura 18 – Dados quantitativos de rugosidade da superfície endotelial posterior. Podemos comparar a rugosidade (A) entre controle, patológico e camada de fibrose deixada pelas lesões na monocamada endotelial até deixarem vazios preenchidos pela fibrose. Podemos verificar o avanço da mudança da topografia avaliando a rugosidade comparando os mapas topográficos controle (B), patológico (D) e fibras (D). O asterisco indica que os grupos possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$ . . . . .	53
Figura 19 – Dados quantitativos de volume (A) e área (B) da superfície endotelial. O asterisco indica que os grupos possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$ . . . . .	54
Figura 20 – Gráficos de Rugosidade (A-C) comparando a superfície controle (B) e doente (D) da superfície endotelial posterior. No gráfico controle, há presença de uniformidade nos picos presentes mostrando boa distribuição das estruturas. Mas no gráfico patológico há perda dessas informações mostrando a progressão da doença como disfunção endotelial . . . . .	56
Figura 21 – Dados quantitativos do Módulo de Young da superfície endotelial posterior (A). Podemos comparar os grupos controle (B), patológico (C) e fibrose (D) evidenciando maiores resistências a deformações das células endoteliais da córnea com o avanço da patologia. Todos os dados possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$ . . . . .	57
Figura 22 – Dados quantitativos das forças de Adesão no endotélio. Podemos comparar (A) os grupos controle, patológico e fibrose e observar a diminuição das forças adesivas devido à falta de íons característicos da monocamada endotelial, principalmente na camada de fibrose (B). As forças adesivas possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$ . . . . .	58
Figura 23 – Mapas topográficos $5 \mu\text{m}^2$ da superfície epitelial controle bidimensional (A) e tridimensional (B) em comparação com patológico bidimensional (C) e tridimensional (D). Devido à instabilidade da camada epitelial, estruturas semelhantes a crateras são frequentemente observadas em varreduras de $1 \mu\text{m}^2$ na superfície epitelial (E-F). . . . .	59
Figura 24 – Dados quantitativos de rugosidade da camada epitelial. Podemos comparar a rugosidade (A) entre os dois grupos: controle e patológico. O avanço da patologia gera estruturas semelhantes a crateras (B) em mapas topográficos de $5 \mu\text{m}^2$ , indicando a instabilidade do epitélio, como indica a seta branca. Dados de rugosidade possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$ . . . . .	60

Figura 25 – Gráficos de Rugosidade (A-C) comparando a superfície epitelial controle (B) e doente (D). No gráfico controle, ocorre uniformidade nos picos presentes mostrando presença de nanovilosidades, diferindo do patológico . . . . .	62
Figura 26 – Dados quantitativos do módulo de Young do epitélio. Podemos comparar (A) controle e patológico observando o aumento do módulo de elasticidade. O mapa do módulo de elasticidade da superfície do epitélio mostra visualmente o aumento na resistência em resposta ao edema estromal. Dados possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$ . . . . .	63
Figura 27 – Comparação (A) entre as forças adesivas entre o epitélio controle e patológico observando o aumento no acúmulo de cargas na superfície doente. A seta branca na Figura (B) em mapas de adesão patológicos de $5 \mu\text{m}^2$ indica que feridas epiteliais apresentam uma concentração de íons. Algo natural no processo de cicatrização do epitélio. Dados possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para $p < 0,05$ . . . . .	64

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Anatomia e fisiologia da Córnea</b>	<b>16</b>
2.1.1	Epitélio	18
2.1.2	Endotélio	20
<b>2.2</b>	<b>Ceratopatia Bolhosa</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Microscopia de Força Atômica</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Forças Nanométricas</b>	<b>27</b>
2.4.1	Forças de van der Waals	28
2.4.2	Potencial de Lennard-Jones	30
2.4.3	Forças Elétricas	31
2.4.4	Forças Capilares	33
2.4.5	Adesão	34
2.4.6	Forças de Dupla Camada	36
<b>2.5</b>	<b>Modos de Operação do AFM</b>	<b>37</b>
2.5.1	Espectroscopia de Força	39
2.5.2	PeakForce Quantitative NanoMechanics	41
<b>2.6</b>	<b>Dados Quantitativos a partir dos mapas topográficos.</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Aquisição das amostras</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparação das amostras</b>	<b>46</b>
<b>3.3</b>	<b>Experimentos de Microscopia de Força Atômica</b>	<b>47</b>
3.3.1	Parâmetros de varredura	47
3.3.2	Análises Ultraestruturais	48
3.3.3	Análises Nano mecânicas	48
3.3.4	Análises Estatísticas	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Avaliação Ultraestrutural do Endotélio</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação das Propriedades Nano mecânicas do Endotélio.</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação Ultraestrutural do Epitélio.</b>	<b>58</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação das Propriedades Nano mecânicas do Epitélio.</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES DE PERSPECTIVAS</b>	<b>66</b>



**REFERÊNCIAS** ..... **68**

# 1 Introdução

Não é de hoje que há a necessidade e curiosidade de exploração e compreensão da natureza que nos cerca. O corpo humano mostra-se como um interessante tema de estudos devido aos seus mais variados sistemas e funcionalidades, unindo os mais diversos tipos de conhecimentos tais como biológicos e físicos. Nossos sentidos estão diretamente atrelados a fenômenos físicos. A visão é resultado de processos neurais fotoquímicos e de respostas psicológicas (FEYNMAN; LEIGHTON; SANDS, 1965). O olho humano é o órgão sensório possuindo estruturas complexas capazes de alta resolução, extremamente sensíveis à luz, detectando fótons individuais localizando cores, formas, movimentos e o espaço (OKUNO; CALDAS; CHOW, 1986)(NEWMAN, 2010), e ajusta o foco em objetos de até 10 cm em olhos jovens. O globo ocular é formado por três camadas: a mais interna compõem a retina e o nervo óptico, logo em seguida tem a camada média que consiste na íris e a coroide. Já a externa é consiste majoritariamente da esclera, parte branca dos olhos, cobrindo 85% do globo ocular, mas com a porção frontal sendo um tecido transparente chamado de córnea.

A córnea é a janela do olho humano para o mundo exterior, sendo essencial para a formação de imagem óptica apresentando diversas características especiais como formato de projeção de cúpula em forma esférica no globo ocular, transparência do tecido, proteção contra artificios maliciosos, incompressibilidade e comportamento elástico não linear e viscoelástico além de ser um tecido avascular (LOMBARDO et al., 2012). Sendo a superfície mais refratária do globo ocular, com índice de refração de 1.37 (FEYNMAN; LEIGHTON; SANDS, 1965), a luz entra nos olhos pela córnea e a imagem é formada na retina. A córnea é dividida em várias camadas como uma cebola, considerando a transparência do tecido, sendo cinco camadas principais (DELMONTE; KIM, 2011)(SRIDHAR, 2018): epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio. O bom comportamento das camadas da córnea geram a manutenção do tecido, por meio de suas características fisiológicas tais como estímulos mecânicos e elétricos, que podem desencadear respostas celulares específicas na córnea (ZHAO et al., 2012)(STRAEHLA et al., 2010). As tensões mecânicas provocadas na córnea são relevantes, uma vez que como barreira protetora, a mesma precisa resistir a deformações provocadas pelo ambiente externo (coçar o olho, por exemplo). Estímulos elétricos são recorrentes na córnea devido o transporte de íons que geram fluxo de corrente e campos elétricos sendo responsáveis pela permeabilidade seletiva entre as camadas da córnea (ZHAO et al., 2012). Esses processos garantem a renovação da barreira protetora do epitélio e hidratação do estroma (quem mantém a córnea transparente) através do processo de bombeamento e vazamento.

As microestruturas e biomecânica das camadas da córnea são importantes para as macrocaracterísticas do tecido. Com isso as patologias, como a Ceratopatia Bolhosa (CB)

podem modificar tais estruturas e afetar a fisiologia da córnea. A CB é, principalmente, fruto da disfunção endotelial ou de danos resultantes na córnea como extração da catarata ou rejeição do enxerto da córnea (ZHAO et al., 2013). O estroma torna-se edematoso e espesso, ocorrendo a percolação de líquido em camadas mais externas gerando vesículas intraepiteliais e subepiteliais, ou simplesmente bolhas (LYDATAKI et al., 2004a). Sintomas como baixa acuidade visual, dor intensa, inflamação ocular, diminuição da transparência do tecido ocular e sensação de corpo estranho, lacrimejamento também podem ser associados a esta patologia (GONÇALVES et al., 2008b). Al-Aqaba et al. afirmam que cerca de 60% dos casos de CB são provenientes de tratamento médico, sendo as mais comuns: CB Pseudofácica, CB Afácica e Distrofia de Fuchs (AL-AQABA et al., 2011). Samuel Chan e cols. assentam que dos 224 casos de transplantes de córnea em Toronto, 15% são devidos a CB entre 2014 e 2016 (CHAN; YUCEL; GUPTA, 2018). Na Europa, o transplante de córnea chega a um número de 1,594 dos 12,913 casos de CB, um total de 12% (DUNKER et al., 2021). Na Espanha, 20,5% dos 9.457 casos de ceratoplastia são decorrentes de CB (SABATER-CRUZ et al., 2021). No Brasil, a CB é a primeira indicação de transplantes entre pacientes de 71 e 80 anos, além de ser a principal indicação para pacientes em fila de espera para transplante de córnea em Sergipe (SANTHIAGO et al., 2009). Sendo de importante impacto social, uma melhor compreensão das mudanças provocadas pela patologia podem levar ao desenvolvimento de instrumentos cirúrgicos, medicamentos e melhorias na cirurgia da córnea.

Em meados do século XX, a criação do Microscópio de Varredura por Tunelamento (STM - *Scanning Tunneling Microscope*) proporcionou diversas técnicas de microscópios com princípios físicos que não utilizam a luz para investigação do mundo microscópico: os Microscópios de Varredura por sonda (SPM - *Scanning Probe Microscope*). Dentre eles, destaca-se a microscopia de força atômica (AFM- *Atomic Force Microscope*) que compõem de um cantiléver com superfície refletora, uma ponta, uma cerâmica piezo elétrica para movimentação relativa entre sonda e amostra, um diodo de laser e um espelho fotodetector. Usando princípios de interação entre átomos, a atração e repulsão entre os átomos da sonda e amostra, ao fazer aproximação e retração entre eles, deflexiona o cantiléver que reflete o sinal do laser e então medido pelo fotodetector para gerar mapas topográficos de qualquer natureza (NEVES; VILELA; ANDRADE, 1998). Um dos avanços possibilitados pela técnica AFM foi a avaliação de sistemas biológicos (MORRIS A. PATRICK GUNNING, 2009). Além de produzir imagens topográficas, o AFM também é capaz investigar as propriedades mecânicas e outros atributos fundamentais para muitas amostras, tais como aderência e elasticidade locais, interações de forças magnéticas e eletrostáticas.

Devido ao tamanho de seus constituintes, como fibras de colágeno e nano vilosidades (RATES et al., 2022), a utilização do AFM para o estudo do tecido ocular tem mostrado resultados promissores (RATES et al., 2022) (LAST et al., 2010)(LYDATAKI et al., 2004b). Fisicamente falando, a córnea é um sistema bastante rico em princípios mecânicos

e elétricos. Tais princípios parecem ditar o funcionamento do tecido ocular. Propriedades ultraestruturais e físicas podem ser exploradas e comparadas entre tecido saudável e patológico, colaborando com uma margem de referência para a comunidade científica. A mudança provocada pela CB pode alterar processos elétricos e mecânicos das camadas da córnea, evidenciando os sintomas característicos da patologia. Isto é possível graças ao AFM que explora, com alta sensibilidade e resolução, as propriedades físicas de amostras biológicas. A análise minuciosa destas propriedades são o foco deste trabalho, mais precisamente das camadas epitelial e endotelial. Tais dados físicos coletados neste trabalho podem ajudar na melhor elaboração de tratamentos mais eficazes para a patologia CB.

## 2 Revisão Bibliográfica

Neste capítulo trataremos sobre conceitos importantes para compreensão das funcionalidades da córnea com uma revisão da literatura no que se diz respeito as camadas epitelial e endotelial, da patologia CB, assim como da AFM. Tais conceitos serão de bom uso para resultados aqui encontrados.

### 2.1 Anatomia e fisiologia da Córnea

A córnea é um tecido ocular avascular, transparente e característico de um material biológico mole apresentando incompressibilidade, viscoelasticidade e comportamento não linear (LOMBARDO et al., 2012)(LYDATAKI et al., 2004a). Situando-se no segmento anterior do olho, atua como uma interface entre o meio externo e o globo ocular sendo, por sua vez, a porta de entrada para a visão. A córnea funciona como uma lente fixa contribuindo fundamentalmente para a refração intraocular (LYDATAKI et al., 2004a). O tecido possui índice de refração de 1.37-1.38 (SRIDHAR, 2018) (HELENE; HELENE, 2011). Apesar de apresentar um valor de índice de refração diferente comparados com os meios no qual a está imersa (ar e humor aquoso).

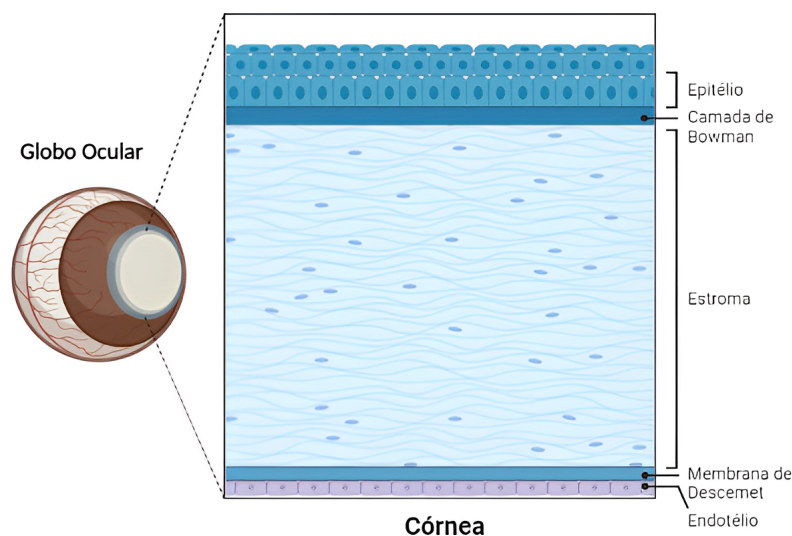
Referente as dimensões da córnea, possui uma forma horizontal oval com a superfície anterior em formato elíptico. Possui diâmetro médio de 9-11 mm verticalmente e 11-12 mm horizontalmente (HELENE; HELENE, 2011) (SRIDHAR, 2018)(SNELL; LEMP, 2013). Sendo convexa e esférica, possui curvatura anterior de 7.8 mm e posterior de 6.5 mm apresentando um caráter não uniforme. Assim como o raio de curvatura, a espessura também não segue homogeneidade com valores diferentes da região central, 551-565  $\mu\text{m}$ , e na região periférica, 612-640  $\mu\text{m}$  (FEIZI et al., 2014) (DELMONTE; KIM, 2011)(SNELL; LEMP, 2013). Provavelmente, a alteração na espessura do tecido em diferentes áreas se dá pelo aumento da quantidade de colágeno no estroma periférico. Devido ao colágeno, a rigidez da córnea parece ser particularmente importante na manutenção da curvatura da córnea. Não somente isso, mas também aparenta ser a principal resistência mecânica contra tensões de cisalhamento presentes (RATES et al., 2022), assim como pode indicar uma grande densidade de ceratócitos<sup>1</sup> presentes no estroma. As diferenças presentes nas dimensões da córnea, devido ao fato dela não ser uma lente esférica, faz com que a focalização da luz ocorra de maneira que a superfície curvada “dobra” a luz que incide em diferentes partes, recebendo-a em distintas partes do campo de visão, produzindo sua focalização na retina (OKUNO; CALDAS; CHOW, 1986)(FEYNMAN; LEIGHTON; SANDS, 1965). Além disso, o ajuste do foco para objetos próximos e distantes ocorre pelo

<sup>1</sup> primeira linha de defesa contra danos celulares

processo de acomodação com a alteração se formato do cristalino, outra característica estrutural óptica que também participa da refração dos raios de luz, além da córnea (NEWMAN, 2010).

A córnea possui componentes celulares e acelulares. Em estudos presentes na literatura utilizando-se da Microscopia de Varredura Eletrônica, podemos citar a presença de três tipos principais de células: epiteliais, ceratócitos e endoteliais (LYDATAKI et al., 2004a). As células epiteliais são originadas do ectoderma epidérmico. Já os ceratócitos e as células endoteliais são da crista neural. Por sua vez, componentes acelulares incluem colágeno e glicosaminoglicanos. Histologicamente, a córnea é dividida em diversas camadas que variam para cada espécie. Em felinos e animais domésticos, a córnea apresenta quatro camadas: epitélio, estroma, membrana de Descemet e endotélio (GOULD; MCLELLAN et al., 2014)(GOZZO, 2009). Contudo, em humanos, aves e alguns mamíferos, a córnea apresenta uma camada, acelular, entre o epitélio e o estroma: membrana de Bowman (MARTINS et al., 2017)(WILSON; HONG, 2000). A Figura 1 ilustra as camadas da córnea de um humano saudável.

Figura 1 – Anatomia da Córnea em suas diferentes camadas seguindo a ordem da mais externa para mais interna: epitélio, camada de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio.



Fonte: Próprio Autor

Recentemente, Harminder Dua descobriu uma camada extra acelular presente anteriormente a membrana de Descemet denominada de camada de Dua com  $15 \mu\text{m}$ , sendo alvo de inúmeras pesquisas (DUA et al., 2023). A estrutura de cada uma dessas camadas, membranas e componentes (celulares e acelulares) é vital para a manutenção das propriedades biomecânicas do tecido e exercer suas funções fisiológicas.

Nas subseções a seguir, será posto de uma melhor forma as mais diversas camadas da córnea apresentando suas características fisiológicas e histológicas únicas para melhor

compreensão do sistema aqui estudado.

### 2.1.1 Epitélio

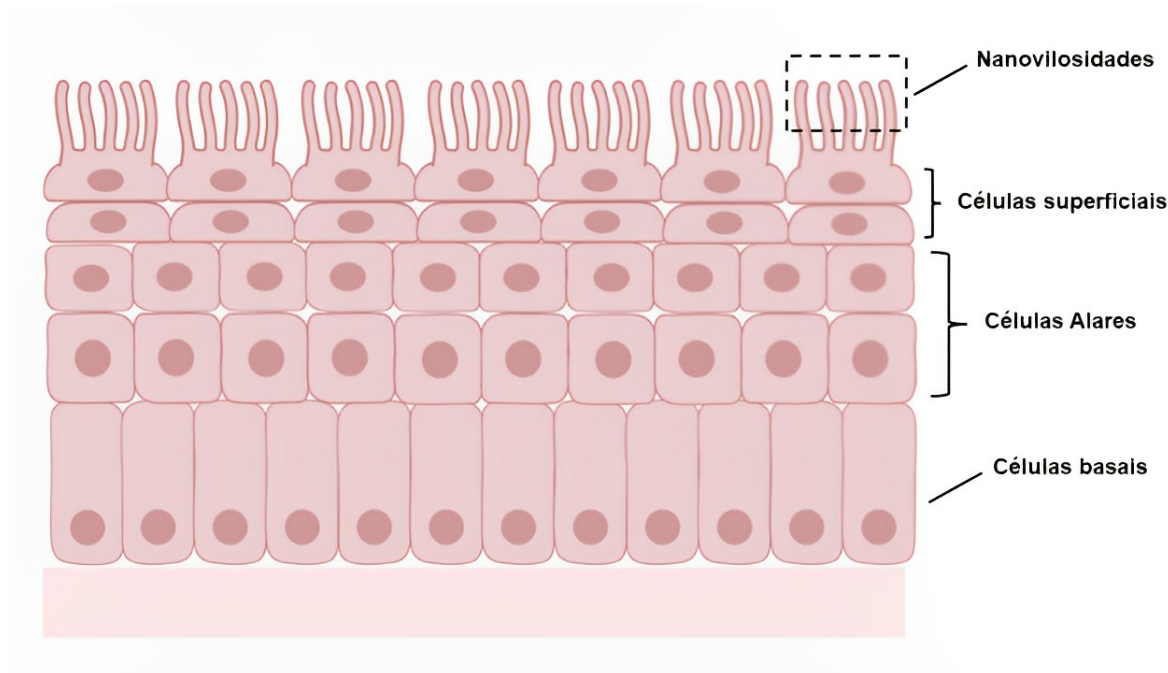
O epitélio é a camada mais externa da córnea, a primeira barreira contra o ambiente externo. Embriologicamente, esta camada é formada através do ectoderma superficial, entre a quinta/sexta semana de gestação, começando com apenas uma a duas camadas de células inicialmente (MARTINS et al., 2017)(GOULD; MCLELLAN et al., 2014). Sendo estratificado, escamoso e não queratinizado, possui característica de uniformidade de limbo a limbo (SRIDHAR, 2018)(DELMONTE; KIM, 2011)(MIESFELD; BROWN, 2019).

Consistindo em 50  $\mu\text{m}$  de espessura, equivalente a 10-12% da espessura da córnea (GOEDERT, 2019)(LEDUR, 2004), possui cerca de 5-6 camadas de três células(SRIDHAR, 2018)(MIESFELD; BROWN, 2019)(EHLERS; HJORTDAL, 2005): planas superficiais, alares ou calciformes e basais como podemos observar na Figura 2. As interações dessas células epiteliais são agudamente vultosas, uma vez que as funções inatas do epitélio dependem dessa organização. As células superficiais são achatadas, com diâmetro de 40 – 60  $\mu\text{m}$  e 2-6  $\mu\text{m}$  de espessura, compreendendo entre 2-3 camadas de células poligonais planas (DELMONTE; KIM, 2011)(LEDUR, 2004)(EHLERS; HJORTDAL, 2005). Uma característica importante dessas células é sua relação em contato direto com as mucinas transmembrana (MUC1, MUC16) presentes no filme lacrimal, estabelecendo uma simbiose, armazenando grânulos de glicogênio interagindo intimamente com glicocálices nas projeções semelhantes a nanovilosidades e nanocristas permitindo a propagação hidrofílica do filme lacrimal a cada piscar de pálpebras (RATES et al., 2022)(GOEDERT, 2019)(FORRESTER et al., 2021)(EHLERS; HJORTDAL, 2005). Isso permite o epitélio ser liso e claro o suficiente para uma boa refração da luz incidente nos olhos, além de fornecer nutrição(EGHRARI; RIAZUDDIN; GOTTSCH, 2015). A seguir, as células alares ou calciformes consistem em 2-3 camadas de células. Essas células são menos planas em comparação as superficiais, possuindo junções intercelulares laterais apertadas semelhantes criando uma membrana semipermeável impedindo que fluidos, toxinas e microorganismos passem para camadas mais internas. (DELMONTE; KIM, 2011)(SRIDHAR, 2018). Por fim, as células basais possuem um formato cuboide-colunar, medindo 20  $\mu\text{m}$  de espessura e 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro (GOEDERT, 2019). Estas células são extremamente importantes, por serem particularmente ricas em tonofibrilas e filamentos de actina, além de serem as únicas das três células capazes de realizar mitose celular, sendo a sua diferenciação a fonte das células alares e superficiais (DELMONTE; KIM, 2011). Com uma densidade celular de 6000 células/ $\text{mm}^2$ , as células basais repousam sobre uma lâmina basal fina, na qual possuem uma forte adesão por hemidesmossomos que permite o não desprendimento do epitélio às camadas internas (FORRESTER et al., 2021)(GOEDERT, 2019)(DELMONTE; KIM, 2011). É de suma importância tal fixação, pois anormalidades podem resultar em



erosões e defeitos epiteliais que não cicatrizam, comprometendo a reestrutura da camada, uma vez que a revilitação deixa a ligação epitélio/membrana basal mais instável e fraca (DELMONTE; KIM, 2011).

Figura 2 – Representação dos três tipos de células epiteliais: planas poligonais (superficiais), alares ou caliciformes e basais.



Fonte: Próprio Autor

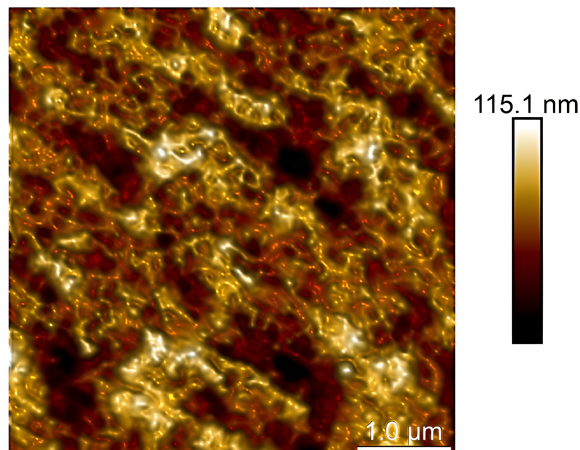
Os três tipos de células (superficial, alares e basais) são ligadas umas, as outras por desmossomos, comunicando-se mediante junções comunicantes, permitindo seletivamente a passagem de pequenas moléculas. Assim como qualquer outro tecido epitelial, o epitélio corneano possui funções de “limpeza” renovando suas células por meio de células-tronco e atividade mitótica das células basais, além de atuar como uma barreira contra o mundo exterior (EHLERS; HJORTDAL, 2005). Junções aderentes e apertadas, além de outras moléculas, estabelecem a ligação célula-célula criando uma barreira de proteção.

As células basais são ligadas à membrana basal por hemidesmossomos. A membrana basal é presente em diversos tecidos e órgãos sendo ela uma matriz extracelular altamente especializada, fina e complexa, apresentando uma superfície bem porosa, como indica a Figura 3. Essa matriz ajuda não somente em separar o epitélio das camadas mais internas anatomicamente, mas também auxilia na ancoragem de células adjacentes, no fornecimento de andaimes durante o desenvolvimento embrionário, migração, diferenciação e manutenção do fenótipo diferenciado de células endoteliais e epiteliais (WILSON; TORRICELLI; MARINO, 2020)(TORRICELLI et al., 2013).

A matriz extracelular do epitélio é provavelmente diferente em composição a outras membranas basais de tecidos. Isso se deve as diversas mudanças que ocorrem durante o



Figura 3 – Imagem por AFM. A topografia é composta por uma rede de fibras e poros.



Fonte: Layer-by-Layer Investigation of Ultrastructures and Biomechanics of Human Cornea (RATES et al., 2022)

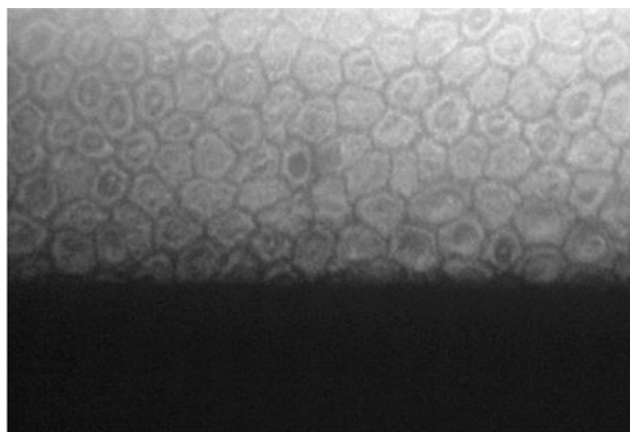
desenvolvimento da mesma (WILSON; TORRICELLI; MARINO, 2020)(KHALILGHARIBI; MAO, 2021). São quatro unidades primários da membrana basal: colágeno, lamininas, proteoglicanos de sulfato de heparano e nidogenos (WILSON; TORRICELLI; MARINO, 2020). O colágeno possui importantes funções, tais como: colágeno tipo VII que cuida da ancoragem de fibrilas, colágeno tipo XV e tipo XVIII que funcionam como moléculas ativas na cicatrização de feridas corneanas e avascularidade da córnea e colágeno tipo XVII que possui a funcionalidade de atuar como molécula de adesão presentes nos hemidesmossomos (WILSON; TORRICELLI; MARINO, 2020). As lamininas são as glicoproteínas não colágenas mais abundantes da membrana basal, sendo cadeias compostas das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que se agrupam ou em forma de cruz, ou em formato de Y, ou de bastonetes com um braço longo e no máximo três braços curtos (KHALILGHARIBI; MAO, 2021). Laminias são importantes para o desenvolvimento da matriz extracelular, pois são o principal agente de montagem e organização inicial da membrana, uma vez que a sua automontagem em formas semelhantes a folhas não precisam da contribuição de outros constituintes da membrana basal (WILSON; TORRICELLI; MARINO, 2020). Por fim, os nidogenos e proteoglicanos. Este último sendo o perlecan o mais abundante, são componentes importantes para a matriz extracelular, já o primeiro consiste em uma proteína complexa com multidomínios importantes para o metabolismo, proliferação e adesão de componentes da membrana basal.

### 2.1.2 Endotélio

A camada endotelial é a mais interna da córnea. Composta de uma única camada de células endoteliais, a mesma é extremamente importante para manter a córnea transparente e hidratada (PATEL; BOURNE, 2009a)(BOGERD et al., 2018). O endotélio origina-se de

células mesenquimais derivadas da crista neural presentes na periferia presumível da córnea que migram e proliferam até formar a monocamada endotelial (JOYCE, 2012)(JOYCE, 2005). Estudos utilizando modelo animal mostram que as células endoteliais são em sua maioria hexagonais formando um layout aleatório de células assimétricas com diâmetro de 18 a 22  $\mu\text{m}$  (ALBUQUERQUE; PIGATTO; FREITAS, 2015)(LYDATAKI et al., 2003a), como mostra a Figura 4, e pleomórficas em minoria (ALBUQUERQUE; PIGATTO; FREITAS, 2015)(JOYCE, 2005) formando uma monocamada não homogênea (PATEL; BOURNE, 2009b). Uma análise utilizando a Microscopia Eletrônica de Transmissão mostra que a proliferação das células endoteliais acaba após a formação de contatos celulares (JOYCE, 2012).

Figura 4 – Imagem da monocamada endotelial de galinhas por microscopia especular.

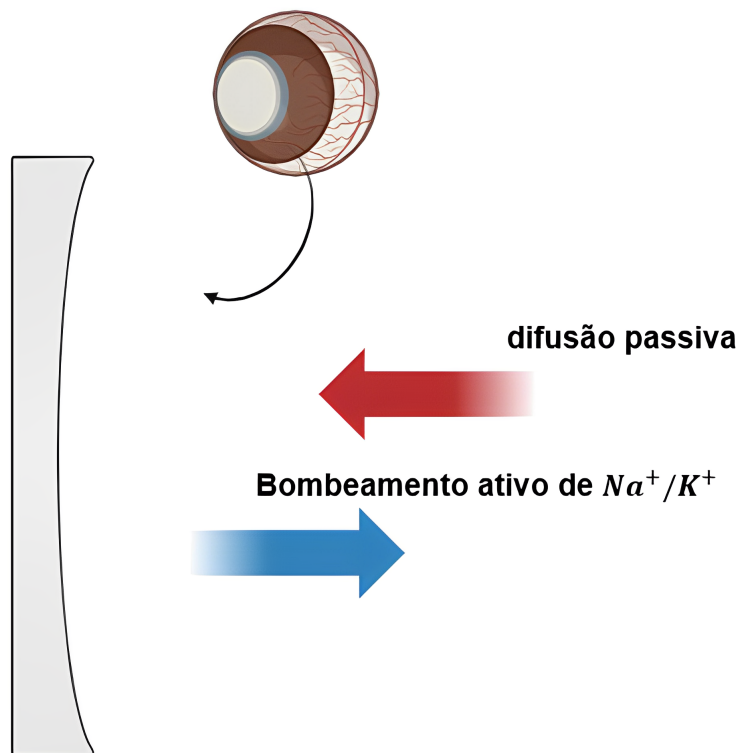


Fonte: Análise do endotélio corneano em olhos de galinhas por microscopia especular de contato.

A densidade de células endoteliais, ao nascer, tem um pico de 6.000 células/ $\text{mm}^2$  diminuindo gradualmente com a idade com redução anual de 0.3-0.6% ao ano (BOGERD et al., 2018)(JOYCE, 2012). Diferente da camada endotelial de outros tecidos, o endotélio da córnea não possui capacidade de realizar mitose in vivo com uma taxa suficiente para suprir a perda de outras células por apoptose (BOGERD et al., 2018)(JOYCE, 2012)(PATEL; BOURNE, 2009b)(MERGLER; PLEYER, 2007)(JOYCE, 2005). Existem diversos mecanismos que impedem as células endoteliais de realizarem mitose. Uma delas é a inibição por contato que ocorre entre as células endoteliais que regula positivamente a expressão p27kip1, um inibidor de quinase dependente de ciclina que impede a transição das fases de reprodução celular (BOGERD et al., 2018). Além disso, fatores de crescimento, como os fatores de fibroblastos ácido e básico (FGF), os semelhantes à insulina I e II, TGF- $\beta$  e TGF- $\beta$ 2, fazem com que as células endoteliais sejam incapazes de realizar espontaneamente a mitose celular (BOGERD et al., 2018)(JOYCE, 2012). Não o bastante, a exposição crônica da córnea a luz ultravioleta do sol resulta em acúmulo das espécies reativas de oxigênio que envelhece por estresse as células endoteliais (JOYCE, 2012)(BOGERD et

al., 2018).

Figura 5 – Esquema representativa sobre a fisiologia do bombeamento ativo de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  da camada endotelial controlando a hidratação da córnea pelo humor aquoso



Fonte: Próprio Autor

Apesar de sofrer com a falta de reprodutividade das células, o endotélio possui a habilidade de manter a monocamada devido à disseminação e migração das células vizinhas para cobrir a área da ferida “esticando” as mesmas mudando sua forma hexagonal para uma pleomórfica (JOYCE, 2012). Este fato mostra que as células endoteliais precisam possuir módulo de elasticidade bom o suficiente para possuir a característica de deformação alterando sua forma padrão. Fisiologicamente, a monocamada de células possui um papel fundamental na desidratação da córnea. Para entendermos esse mecanismo, o esquema da Figura 5 foi montado mostrando a hipótese de bombeamento e vazamento (BOGERD et al., 2018)(JOYCE, 2012)(MERGLER; PLEYER, 2007). Primeiramente temos a camada endotelial atrás da córnea côncava em contato com o humor aquoso. Graças a um cinturão incompleto de junções estreitas entre as células endoteliais, a difusão passiva do humor aquoso consegue “escapar” para o estroma fornecendo nutrientes (BOGERD et al., 2018). Para manter esse controle, o endotélio possui um bombeamento iônico ativo na direção oposta a pressão intraocular do humor aquoso, mas ainda deixando vazar o suficiente para a hidratação necessária (MERGLER; PLEYER, 2007). Com isso, a monocamada endotelial, portadora de bombas de Sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), possuem características elétricas importantes apresentando um processo que criam gradientes osmóticos locais que puxam o

fluido do humor aquoso de volta para a parte posterior do endotélio atingindo um equilíbrio necessário para a transparência da córnea (BOGERD et al., 2018)(MERGLER; PLEYER, 2007). Tal processo foi evidenciado por Fischbarg como eletromose, caracterizando o transporte fluidos por íons (MERGLER; PLEYER, 2007).

Para a córnea manter esse papel de bombeamento evidenciando a transparência do tecido, precisa-se de uma densidade de células endoteliais acima de 400 – 500 células/mm<sup>2</sup> (BOGERD et al., 2018). Caso a densidade fique abaixo deste nível crítico, comprometendo assim o fornecimento das bombas iônicas, o tecido ocular fica edemático e ocorre diminuição da acuidade visual (PATEL; BOURNE, 2009a)(JOYCE, 2012). Patologias características de disfunção endotelial, tal qual a CB, compromete a função de barreira endotelial gerando diversas complicações na córnea.

## 2.2 Ceratopatia Bolhosa

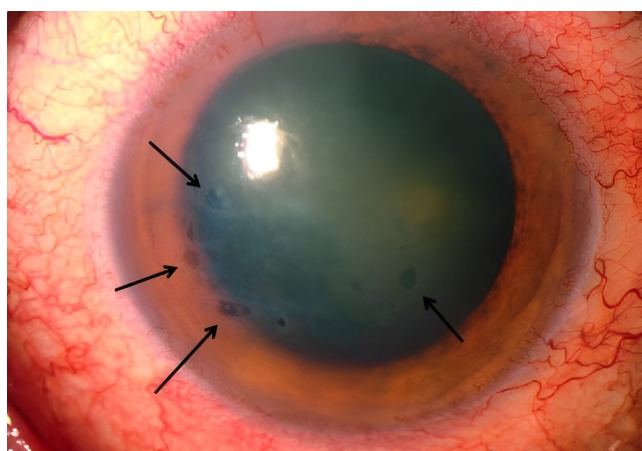
A CB é um distúrbio progressivo que ocorre quando a densidade de células endoteliais chega a um nível crítico <700 células/mm<sup>2</sup>, chegando a sintomas como dor, lacrimejamento, edema corneano, perda da acuidade visual e sensação de estranheza no corpo (GONÇALVES et al., 2008a)(LJUBIMOV et al., 1996a)(LIU et al., 2012a). No que se diz respeito a sua etiopatogênese, existem fatores internos e externos. Os externos mais comuns e reportados na literatura giram em torno de traumas cirúrgicos após tratamento de catarata, glaucoma, fixação escleral de lente intra-ocular (LIO), implantes de lentes de câmara anterior, dentre outros (GONÇALVES et al., 2008a). A CB pode ocorrer em torno de 1-2% dos pacientes que realizam a cirurgia de catarata, representando 2-4 milhões de pacientes no mundo (GONÇALVES et al., 2008a). Internamente, o mais comum é a disfunção endotelial que ocorre em outras patologias, tais como a Distrofia de Fuchs e a Diabetes Mellitus, acarretando CB (GONÇALVES et al., 2008a).

Apesar de existir tratamentos para cuidar dos sintomas aqui apresentados utilizando-se de anti-inflamatórios, corticoides, lubrificantes e lentes terapêuticas, os melhores resultados acabam, por sua vez, sendo posteriormente intervenção cirurgia como a ceratoplastia endotelial (GONÇALVES et al., 2008a)(LIU et al., 2012a). Porém, há uma série de complicações que vão desde a rejeição do transplante da ceratoplastia até o acesso à cirurgia, podendo levar até mesmo dois anos ou mais (GONÇALVES et al., 2008a)(MORISHIGE; SONODA, 2013). Apesar do transplante de córnea ser um dos mais frequentes e bem-sucedidos, a falha do transplante de córnea leva a descompensação endotelial chegando a uma rejeição imunológica, sendo a única saída o retransplante (PRICE et al., 2021).

Em termos histológicos a CB afeta: o epitélio, causando bolhas em sua superfície (como mostra as setas pretas na Figura 6) e na região subepitelial, levando a exfoliação

da camada e desprendimento com a camada de Bowman (GLASGOW; GASYMOV; CASEY, 2009a)(LJUBIMOV et al., 1996a); estroma, afetado pelo acúmulo de líquidos devido aos seus proteoglicanos que absorvem o líquido oriundo do humor aquoso (DIAS et al., 2015)(MORISHIGE; SONODA, 2013); Membrana de Descemet, onde Yuen et al. mostraram que 13 dos 22 casos de CB apresentaram uma quarta camada extra característica fibrótica (YUEN et al., 2005); endotélio, apresentando perda da monocamada endotelial aumentando a pressão intraocular e perda dos sítios iônicos  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (LIU et al., 2012a)(JEANG; MARGO; ESPANA, 2021)(GONÇALVES et al., 2008a).

Figura 6 – Córnea portadora de CB. Setas pretas indicam bolhas formadas na camada epitelial.



Fonte:msdmanuals.com

Jean et al. relatam que a CB surge em resposta a lesões que levam a cicatrização, ou seja, fibrose, ocorrendo o aumento de expressões de TGFBIP, tenascina-C, fibrilina e fibronectina presentes em processos de fibrose (JEANG; MARGO; ESPANA, 2021). Sendo assim, o estresse mecânico nos ceratócitos causado pelo acúmulo de líquido no estroma tenta aliviar a tensão, visando preservar o estroma, contraindo o colágeno produzindo e depositando tenascina, por exemplo (GONÇALVES et al., 2008a).

Com isso fica bastante evidente que o problema causado pela patologia muda ultraestruturalmente as diversas camadas da córnea. Camada extra fibrótica, exfoliação epitelial, perda da monocamada endotelial, edema corneano devido ao inchaço e espaçamento das fibras de colágeno do estroma, dentre outros, mostram como ocorre uma grande variedade de mudanças nas componentes que organizam o tecido ocular. Sendo assim, é de grande interesse investigar tais mudanças com uma boa ferramenta, tal qual a AFM, para evidenciar ainda mais essas diferenças entre tecido saudável e patológico.

## 2.3 Microscopia de Força Atômica

O uso de ferramentas, como os microscópios, revolucionaram nossa percepção indo além dos sentidos sensoriais explorando minuciosamente a natureza. O uso de microscópios vem impactando o mundo acadêmico, sendo a força motriz para novos desenvolvimentos científicos (WILSON et al., 2002). Os mais comuns acabam sendo os microscópicos ópticos que logo atingiram seu limite físico da difração, encontrando obstáculos de tamanho comparáveis ao comprimento de onda da luz visível (380 – 750 nm). Assim, efeitos de difração e interferência tornam-se importantes e detalhes menores da estrutura da amostra não podem ser desvendados (BRAGA; RICCI, 2008). Surge assim a necessidade de técnicas para superar tal limite encontrado.

Havia a ideia de usar sondas pequenas, de pontas afiadas, interagindo com a superfície de amostras no contexto de estudar melhor uma fonte de radiação eletromagnética em aproximação de determinada amostra (WILSON et al., 2002). Mesmo que o objetivo inicial não tenha sido um sucesso, a utilização de uma sonda em nanoescala atômica interagindo com a amostra, enquanto a interação é medida e controlada, causando deformações mecânicas semelhantes a molas pelas forças atômicas, ganhou destaque pela sua ampla aplicabilidade em diversas áreas (BRAGA; RICCI, 2008)(WILSON et al., 2002).

A criação dos microscópios de varredura por sonda (SPM) emergiu nos anos 80, evoluindo desde então. É bastante comum utilizar-se dessas ferramentas em pesquisas no mundo (REIFENBERGER, 2016). Seus princípios são verdadeiramente simples: uma sonda de ponta afiada aproximando-se, cerca de 1 nanômetro, acima da amostra. Com isso, ocorre interação local ponta-amostra. Com a capacidade de controlar a distância ponta-amostra, pode-se obter localmente informações precisas, coletando sinais sensíveis que ditam a separação ponta-amostra, mapeando o amostra e criando até mesmo representações tridimensionais(REIFENBERGER, 2016)(RUGAR; HANSMA, 1990). Esta possibilidade de gerar imagens em níveis atômicos era obscura até meados dos anos 1981 – 1982 por G. Binnig e H. Rohrer através do Microscópio de Tunelamento por varredura (STM) como resposta a um problema na tecnologia de semicondutores (WILSON et al., 2002)(GIESSIBL, 2003). Este aparelho permitiu a investigação de superfícies, garantindo o prêmio nobel aos dois cientistas (GIESSIBL, 2003)(REIFENBERGER, 2016). O STM é um instrumento híbrido de eletrônico-mecânico do que se diz respeito a separação ponta-amostra enquanto ocorre a interação vista na forma de corrente de tunelamento de elétrons ponta-amostra(WILSON et al., 2002). Efeito de tunelamento este que foi desenvolvido devido às noções de mecânica quântica que estavam sendo difundidas na época. Para tal, uma partícula que, classicamente, antes era vista como impossível superar barreiras de potencial caso não tenha energia cinética o suficiente, agora pode ter uma probabilidade não nula de passar para a região proibida ocorrendo o tunelamento (WILSON et al., 2002).

Devido à passagem de corrente, substratos condutores mostraram uma limitação



na aplicabilidade desta técnica. Então, Bining et al., em 1986, observaram que sondas podem demonstrar interações de van der Waals de longo alcance (WILSON et al., 2002). Graças às forças onipresentes de superfície surge uma nova microscopia por sonda: A AFM (AFM). Com tal ferramenta é possível a análise em nanoescala sem o envolvimento de feixes de elétrons, trazendo a possibilidade de avaliar materiais isolantes (WILSON et al., 2002)(BELLITTO, 2012a). As forças de interação podem variar de 10 pN a 10  $\mu$ N para separações pequenas. Graças às forças de longo alcance, a resolução vertical do AFM é tipicamente menor que um nanômetro, enquanto a resolução lateral depende do raio da ponta e rugosidade da amostra, sendo, geralmente, maior que a do STM (REIFENBERGER, 2016).

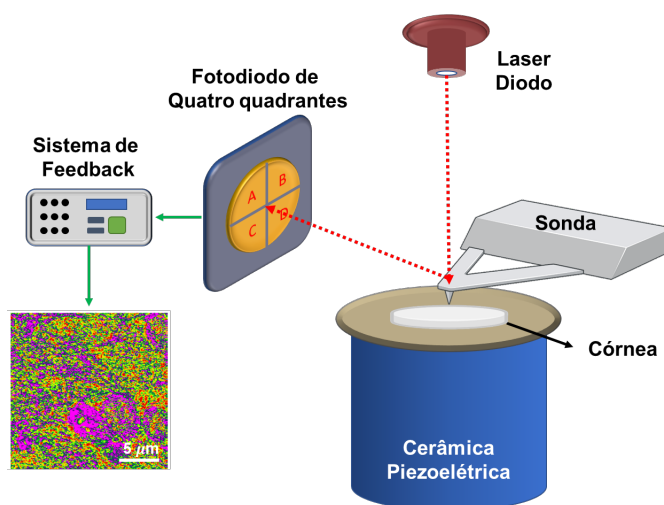
Normalmente, a operação do AFM depende de uma ponta fixada em um cantiléver que sofre pequenas deflexões monitoradas. Os cantilevers possuem constantes de mola  $K_c$  (N/m) deflexionando-se após certa distância  $z$  da amostra devido às forças de interação entre átomos ponta-amostra (LEKKA, 2017). Pequenas deflexões seguem a lei de Hooke prevendo uma força restauradora  $F_R$  ascendente:

$$F_R = K_c z. \quad (2.1)$$

Os principais componentes, Figura 7, do AFM consistem em praticamente: uma sonda sensível (cantiléver + ponta), scanner piezoelétrico, laser diodo, fotodetector e um computador para o sistema de feedback que regula e armazena dados do sistema gerando mapas topográficos e tridimensionais, além de extrair dados quantitativos da amostra em questão. Em suma, o AFM opera com a sonda aproximando-se da superfície da amostra até que ocorra interação de dipolos elétricos induzidos, ou já existentes. Com isso, forças elétricas atrativas ocorreram entre os átomos da ponta e amostra seguindo o padrão das forças de van der Waals. A atração possui um limite devido à alta aproximação (contato) da ponta com a amostra. Isso se deve ao princípio de exclusão de Pauli que impede dois elétrons de ocupar o mesmo estado quântico ao mesmo tempo (KITTEL; MCEUEN, 2018). Assim, para evitar a superposição da nuvem de elétrons dos átomos ponta-amostra, surge uma força repulsiva visando a separação ponta-amostra. Logo, a sonda acompanha os altos e baixos da topografia da amostra deflexionando-se devido às interações atrativas e repulsivas valendo a equação 2.1. Essas deformações na sonda farão o laser diodo, que incide na parte superior da sonda, alterar o ângulo do laser refletido. Essas variações de sinais são captadas pelo fotodetector de 4 células independentes, gerando uma diferença de potencial, via efeito fotovoltaico. Por fim, o feedback alimentado pela variação de sinal mantém a altura ou força constante da superfície. Com isso, assim que ocorre um aumento de força (ou altura), o controle de feedback faz com que o piezoelétrico afaste a sonda da superfície. O mesmo vale para a diminuição da força registrada aproximando a sonda da superfície. Esses dados do feedback são enviados e processados por algum software gerando

a mapas da amostra (BRAGA; RICCI, 2008)(BELLITTO, 2012a).

Figura 7 – Principais componentes do Microscópio de Força Atômica.



Fonte: Próprio Autor

Graças à sua habilidade de investigar estruturas biológicas em condições fisiológicas, o AFM consegue ser aplicável em diversos sistemas tais como células, vírus, membrana plasmática e até mesmo DNA. Isso graças à facilidade em preparação de amostra oferecida pelo equipamento, além de fornecer não somente mapas topográficos mas também propriedades viscoelásticas, adesivas, rugosidade, magnéticas e elétricas devido ao regime de forças atuantes entre a ponta e amostra (LEKKA, 2017)(HERRMANN et al., 1997). Pesquisadores comumente desenvolvem técnicas para solucionar problemas biológicos utilizando-se da AFM devido à valorização que são os dados obtidos por meio deste instrumento. Mas para entender como os dados são extraídos do regime de forças atuantes no sistema, é preciso analisar as forças em nanoescala.

## 2.4 Forças Nanométricas

Para entendermos de forma mais aprofundada o AFM, precisamos conhecer as forças que atuam quando dois corpos estão a uma distância extremamente pequena. Sabemos que as informações necessárias para a formação de uma imagem via AFM são devido ao “feeling” entre a sonda e a superfície da amostra. O experimento AFM depende das forças atuantes, regime atrativo e repulsivo, em diferentes modos de operação, uma vez que a natureza e magnitude dessas forças dependem do quão próximo à sonda está da superfície da amostra.

Como o próprio nome sugere, o microscópio opta por estudar as interações entre átomos da sonda com a superfície da amostra, gerando forças de natureza de van der Waals, elétrica, capilares, dentre outras.



### 2.4.1 Forças de van der Waals

Desde o início dos anos 1800, diversas pessoas voltaram a sua atenção para o comportamento de fluidos (FRENCH, 2000). O nome forças de van der Waals apareceu pela primeira vez em 1873 em decorrência direta da equação de van der Waals para gases proposta na termodinâmica, introduzindo forças de longo alcance como resultado oriundo da interação entre dipolos e quadripolar entre moléculas que compõem gases, líquidos e sólidos. Sendo um dos tipos de força que mantém a matéria unida, porém de intensidade mais baixa, van der Waals apresentou correções em sua equação para gases perfeitos: redução no volume para as moléculas ficarem apenas em um determinado volume e aumenta a pressão no volume do gás (MARGENAU, 1939). Com as moléculas ocupando um volume menor, a distância entre elas ficam cada vez menores, surgindo forças atrativas tanto em fluidos quanto em sólidos. Com isso, a força de van der Waals implícita na equação do gás de van der Waals difere das forças que mantém átomos na própria molécula, como as que mantém os átomos de hidrogênio e oxigênio para formar a molécula da água. As forças de van der Waals são responsáveis pela coesão de líquidos e sólidos, por exemplo (MARGENAU, 1939).

A força de van der Waals se resume a interações de Coulomb entre átomos que possuem dipolos permanentes ou de átomos neutros carregados localmente devido às flutuações quânticas (SEO; JHE, 2007). Sendo assim, temos que ter noção de que a força de van der Waals é o aditivo de três partes: força Keesom  $F_K$ , a força Debye  $F_D$  e a força London  $F_L$ , como mostra a equação 2.2. com cada força correspondendo a três origens distintas: dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido, respectivamente (REIFENBERGER, 2016).

$$F_{vdW} = F_K + F_D + F_L. \quad (2.2)$$

As forças de Keesom, ou efeito de orientação, são quando dois dipolos permanentes interagem devido ao campo elétrico do dipolo. A orientação é importante para esse efeito, uma vez que se os dipolos estão paralelos, a força será atrativa, mas se forem antiparalelos, será repulsiva. Sendo atrativa ou repulsiva, essa interação perde efeito quando ocorre aumento da temperatura, pois movimentos dos dipolos permanentes ficam desordenados (REIFENBERGER, 2016)(MARGENAU, 1939). O potencial de interação de Keesom pode ser dado na forma de:

$$U_K(z) = -\frac{C_K}{z^6} = -\frac{u_1^2 u_2^2}{3(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2 k_b T} \frac{1}{z^6}, \quad (2.3)$$

onde  $u_1^2$  e  $u_2^2$  são os momentos de dipolo das moléculas ou átomos,  $\epsilon$  é a constante de permissibilidade elétrica do meio,  $K_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura.

As forças de Debye, ou efeito de indução, ocorre quando um dipolo permanente interage com uma molécula, ou átomo, apolar exibindo momentos de dipolo induzido. Isso ocorre devido a polarizabilidade intrínseca das nuvens eletrônicas que constituem as ligações entre os átomos, respondendo ao campo eletromagnético aplicado. Assim, um único dipolo permanente com campo eletromagnético induz um momento dipolar na nuvem eletrônica de outro átomo apolar (REIFENBERGER, 2016)(MARGENAU, 1939). O potencial de interação de Debye pode ser dado na forma de:

$$U_D(z) = -\frac{C_D}{z^6} = -\frac{u_1^2\alpha_{02} + u_2^2\alpha_{01}}{(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2} \frac{1}{z^6}, \quad (2.4)$$

onde  $\alpha_{01}$  e  $\alpha_{02}$  são as polarizabilidades eletrônicas da molécula ou átomo.

Já as forças de London, ou forças de dispersão, constituem na maior contribuição para as forças de van der Waals sendo até mesmo cem vezes maior que as forças de Keeson e Debye. London propôs que as ligações interatômicas podem induzir momentos de dipolo locais em ligações interatômicas próximas. Utilizando-se da física quântica, London introduziu o conceito de que até mesmo no seu estado fundamental e no zero absoluto, o elétron ainda produz um certo movimento que corresponde as flutuações da nuvem eletrônica. Esse movimento produz ondas eletromagnéticas da forma de fótons virtuais induzindo momentos de dipolo na nuvem eletrônica de átomos vizinhos. Sendo assim, as interações de dipolo induzido com dipolo induzido produzem uma força atrativa aditiva para todas as ligações interatômicas em átomos e/ou moléculas. Essa, sim, é uma contribuinte universal, já que está presente em todos os átomos e moléculas.

$$U_L(z) = -\frac{C_L}{z^6} = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_{02}\alpha_{01}}{(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2} \frac{h\nu_1\nu_2}{\nu_1 + \nu_2} \frac{1}{z^6}, \quad (2.5)$$

em que,  $h\nu_1$  e  $h\nu_2$  são os primeiros potenciais de ionização das moléculas e  $h$  é a constante de Planck. Sendo assim, o potencial da interação de van der Waals é dado por,

$$U_{vdW} = \frac{3k_B T}{(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2} \left( \frac{u_1^2}{3k_B T} + \alpha_{01} \right) \left( \frac{u_2^2}{3k_B T} + \alpha_{02} \right) \frac{1}{z^6} - \frac{3}{2} \frac{\alpha_{02}\alpha_{01}}{(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2} \frac{h\nu_1\nu_2}{\nu_1 + \nu_2} \frac{1}{z^6}. \quad (2.6)$$

Na equação 2.6 temos as energias de Keeson e Debye que atua entre moléculas e átomos polares. Essa energia é chamada de fator polar ou entrópica. Já a energia de London atua em todas as moléculas e átomos sendo o fator de dispersão (REIFENBERGER, 2016)(MARGENAU, 1939). É fácil de perceber que o potencial da equação 2.6 possui dependência  $z^{-6}$ . Isso é se de esperar, uma vez que o campo elétrico de um dipolo cai com  $z^{-3}$ , mas essas interações são mais íntimas, precisando com que os átomos estejam ainda mais perto acarretando dependência  $z^{-6}$ . Podemos abreviar a forma do potencial como sendo,

$$U_{vdW} = -\frac{C_{dvW}}{z^6}, \quad (2.7)$$

com  $C_{vdW} = C_K + C_D + C_L$  sendo constante, e  $z$  é a distância entre os átomos ou moléculas. Diferentes formas para as constantes  $C_k$ ,  $C_D$  e  $C_L$  podem ser encontradas na literatura. Isso ocorre devido os pré-fatores considerados, determinando as restrições impostas no início de cada cálculo, algo recorrente em vários textos para todas as três contribuições (REIFENBERGER, 2016).

Usando a definição  $F = -\partial_V/\partial_z$ , a equação 2.6 dará a forma da força que atua entre os átomos. Para o AFM, a geometria da ponta influencia bastante na forma que a força de van der Waals irá ter. Para uma interação entre uma sonda aproximadamente esférica e um substrato plano, Hamaker (REIFENBERGER, 2016) mostrou que a força de van der Waals é dada por,

$$F_{vdW} = -\frac{A_H R}{6z^2}, \quad (2.8)$$

o termo  $A_H$  é conhecido como constante de Hamaker

O sinal negativo da equação 2.8 nos diz que a interação é atrativa. Vale frisar novamente que a forma da força de van der Waals depende criticamente da geometria adotada no sistema sonda-amostra. Sendo assim existem várias aproximações adotadas substituindo todos os pares de átomos por objetos geométricos bem definidos, além de assumir a homogeneidade atômica, algo que não ocorre em superfícies oxidadas ou contaminadas. Com isso em mente, o resultado da equação 2.8 torna-se suspeito em pequenas separações de alguns angstroms. Fora isso, ainda existe a negligência do tempo de propagação do campo elétrico induzido por um dipolo flutuante, assim como ignora os átomos vizinhos na interação. Devido a essas diversas aproximações para uma abordagem mais simples, podem deixar valores da constante de Hamaker com uma ampla variedade de valores medidos (SEO; JHE, 2007).

## 2.4.2 Potencial de Lennard-Jones

Muitos outros potenciais foram propostos para entender a interação entre átomos. Logo após a dedução de London sobre as forças de dispersão entre átomos que decaem com  $z^{-6}$ , em 1925 foi proposta potenciais em pares na forma de  $r^{-\nu} - r^{-\mu}$ . Atualmente, o potencial, cujo tem a alcunha de potencial de Lennard-Jones, é um dos mais amplamente utilizados e simples para modelar com certas precisões as ligações fracas de van der Waals (WANG et al., 2020)(ADAMS, 2001).

Como vimos anteriormente, existem interações atrativas entre átomos com a dependência na distância de  $z^{-6}$ , como mostra a equação 2.6. Porém, a uma certa distância, as distribuições de carga se superpõem modificando a energia eletroestática do sistema

(KITTEL; MCEUEN, 2018). Com a superposição da nuvem eletrônica dos átomos, ocorre o fenômeno chamado de princípio de exclusão de Pauli: dois elétrons não podem ocupar o mesmo estado quântico. Na literatura (WANG et al., 2020)(ADAMS, 2001)(KITTEL; MCEUEN, 2018), a forma do potencial de Lennard-Jones pode ser expressa como:

$$U_{LJ} = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{z} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{z} \right)^6 \right], \quad (2.9)$$

com  $\epsilon$  sendo a profundidade do poço de potencial, onde as forças atrativas e repulsivas se equilibram, e  $\sigma$  é um parâmetro de escala de comprimento que determina a posição do mínimo potencial. O segundo termo da diferença expressa a força atrativa devido aos dipolos temporários causados pelas flutuações da nuvem eletrônica vista nas interações de van der Waals. Já o primeiro termo, é a parte repulsiva devido à sobreposição das nuvens de elétrons. Temos assim, um aumento da energia total do sistema configurando no aumento da contribuição repulsiva a curtas distâncias. Usando a relação força como derivada primeira do potencial, podemos chegar na força entre dois átomos seguindo o potencial de Lennard-Jones:

$$F_{LJ} = 24\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma^6}{z^7} \right) - \left( \frac{2\sigma^{12}}{z^{13}} \right) \right], \quad (2.10)$$

onde a força de sinal positivo e negativo  $F$  representa forças repulsivas e atrativas, respectivamente. A separação de equilíbrio entre dois átomos ocorre quando a força interatômica líquida é zero, ou seja, a força atrativa é igual à força repulsiva. Os parâmetros do potencial de Lennard-Jones são geralmente determinados a partir de dados da fase gasosa, mas são bem confiáveis para modelar o estado sólido dos gases nobres. Além de ser usado para modelar sistemas covalentes e metálicos, porém muito menos precisos. Ou seja, o potencial de Lennard-Jones pode fornecer uma compreensão qualitativa de todos os tipos de ligação se tratando em termos de equilíbrio entre uma repulsão de curto alcance uma atração de longo alcance.

### 2.4.3 Forças Elétricas

Forças elétricas estão presentes nas ligações iônicas, sendo a principal influência física das forças interatômicas que atuam em uma medida realizada pelo AFM. Essa interação, diferente das demais aqui vistas, possui intensidade de longo alcance. Sendo duas cargas pontuais, tal qual  $q_1 = q_2 = e$ , o potencial eletroestático no vácuo é dado por,

$$U_{el} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 z}, \quad (2.11)$$

com  $\epsilon_0$  sendo a permissibilidade elétrica no vácuo e  $z$  a distância entre os elétrons de carga  $e$ . Sendo assim, a força elétrica é dada pela equação,

$$F_{el} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 z^2}. \quad (2.12)$$

Podemos estudar a interação eletroestática em um sistema ponta-amostra sendo a primeira uma esfera e a segunda, uma superfície plana. A força eletroestática é gerada entre uma ponta carregada ou condutora e uma amostra possuindo diferença de potencial  $U$ . Para uma distância  $z$  menor que o raio  $R$  da ponta (SEO; JHE, 2007), temos,

$$F_{R \gg z} = \frac{\pi\epsilon_0 U^2 R}{z}, \quad (2.13)$$

e para o caso com  $z$  sendo maior que  $R$  (HAO; BARO; SAENZ, 1991), teremos,

$$F_{R \ll z} = \pi\epsilon_0 U^2 \frac{R^2}{z^2}. \quad (2.14)$$

Outrora, podemos também nos utilizar da situação em que a geometria da ponta é um cone com extremidade esférica em uma amostra com superfície plana. Para tal, imaginaremos a força sendo calculada substituindo as superfícies condutoras equipotenciais por suas cargas imagem equivalentes. Para ângulos de abertura pequenos ( $\theta \leq \pi/9$ ) do cone, a ponta pode ser aproximada por uma linha carregada de densidade de carga constante  $\lambda$  dada por:

$$\lambda = 4\pi\epsilon_0 V \left[ \ln \left( \frac{1 + \cos \theta}{1 - \cos \theta} \right) \right]^{-1}. \quad (2.15)$$

Isso resulta em uma força dada pela equação:

$$F_k \cong \frac{\lambda_0^2}{4\pi\epsilon_0} \ln \frac{L}{4D}, \quad (2.16)$$

em que  $L$  é o comprimento do cone,  $L \ll r \ll R$ ,  $V$  é o potencial as superfícies condutoras equipotenciais e  $D$  é a distância entre elas.

É importante lembrar que as equações 2.13, 2.14 e 2.16 não consideram a influência de cargas ou corpos carregados vizinhos. A atração eletroestática de longo alcance costuma ser mais forte em relação as demais aqui estudadas. Para fins de comparação, pela equação 2.13 em condições experimentais típicas, com  $U \approx 1V$ ,  $R \approx 100$  nm e  $z = 1$  nm, a força eletrostática é de  $F_{el} \approx 3$  nN (SEO; JHE, 2007). Não satisfeitos com a comparação, faremos uma com a energia térmica  $k_B T$  em temperatura ambiente, sendo  $k_B$  a constante de Boltzman e  $T$  a temperatura em escala absoluta. Em distâncias atômicas de pelo menos 2 raios atômicas,  $r = 2\text{Å}$  e sendo a carga elétrica  $e = 1,6 \cdot 10^{-19}$ , a energia da interação eletroestática é de aproximadamente  $278 K_B T$ . Isso mostra que forças de 3 nN possuem uma energia de aproximadamente  $300 K_B T$ .

### 2.4.4 Forças Capilares

Força Capilar, ou força de menisco, foi estudado pela primeira vez em 1920 por Fisher e Haines (BUTT; KAPPL, 2009). Forças de capilaridade devem ser consideradas ao estudarmos adesão entre partículas ou partículas e superfícies. Um menisco líquido pode ser formado por dois motivos. O primeiro é que duas superfícies sólidas forem hidrofílicas em relação a um vapor presente entre o meio intermediário condensando o vapor para fase líquida. O segundo motivo é a formação de líquidos não voláteis quando existe uma fina película de líquido depositada na superfície, onde as superfícies superpostas fazem com que o líquido seja retirado do filme fino para o menisco.

O estudo dessa força é de suma importância devido ao contato da ponta, que possui um pequeno raio de curvatura, com a superfície da amostra podendo condensar partículas de vapor de água presentes na atmosfera. Sendo assim, a umidade relativa onde o experimento é submetido é de extrema relevância. O vapor de água condensado gera um anel líquido que atrai a ponta de AFM em direção à amostra. Vamos primeiramente pensar no caso em que ocorre adesão de superfícies sem a formação de um anel líquido (menisco). Uma abordagem é dada por Derjaguin-Muller-Toporov (DMT), baseada na energia de superfície. Temos uma força atrativa entre uma partícula aderente lisa e uma placa plana lisa de mesmo material em uma atmosfera seca,

$$F_{DMT} = 4\pi\gamma R, \quad (2.17)$$

onde funciona para partículas menores e duras no seco. Para partículas maiores e moles, temos o método Johnson-Kendall-Roberts (JKR) com a equação,

$$F_{JKR} = 3\pi\gamma R, \quad (2.18)$$

onde  $\gamma$  é a energia de superfície e  $R$  é o raio da partícula aderindo a um substrato plano. Uma das grandes dificuldades nestes modelos presentes na literatura consiste em estimar corretamente a energia de superfície. A energia é derivada de várias fontes diferentes e nem sempre vão incorporar os verdadeiros mecanismos fundamentais de adesão que compõem o sistema, pois a distância entre as superfícies e o contato nem sempre são bem definidas graças à rugosidade particular de cada sistema e até mesmo deformações plásticas (BUTT; KAPPL, 2009). Apesar dessa dificuldade, é seguro afirmar (RABINOVICH et al., 2002) que boa parte da contribuição da energia de superfície é dada pela atração de van der Waals entre as moléculas do líquido e os átomos do sólido, aderindo à superfície fortemente, dando abertura para o que chamamos de forças de adesão.

Adicionando o vapor de água que será condensado para a fase líquida, a energia da superfície será modificada por adsorção. A força capilar consiste em duas componentes principais (RABINOVICH et al., 2002):

$$F_C = F_P + F_S, \quad (2.19)$$

onde  $F_P$  é oriunda do diferencial de pressão através do menisco, e  $F_S$  surge da tensão superficial que atua ao longo do menisco. Usando coordenadas cartesianas, a equação 2.19 pode ser expressa como (RABINOVICH et al., 2002):

$$F_C = \pi x^2 \Delta P + 2\pi \gamma_L x \sin(\theta_1 + \alpha), \quad (2.20)$$

em que  $\gamma_L$  é a tensão superficial do líquido,  $x$  é a distância horizontal de interseção entre o menisco e a partícula aderente,  $\theta_1$  é o ângulo de contato do líquido da partícula,  $\alpha$  é o ângulo entre o eixo das ordenadas e o raio até a interseção da partícula com o menisco líquido.  $\Delta P$  é o que chamamos de diferença de pressão dada pela equação de Laplace,

$$\Delta P = \gamma_L \left( \frac{1}{r} - \frac{1}{x} \right), \quad (2.21)$$

sendo  $r$  o raio do menisco formado.

#### 2.4.5 Adesão

A adesão entre dois corpos é extremamente relevante para estudos via AFM aplicado em sistemas biológicos. Em amostras macias, como moléculas de DNA, possuem comportamento viscoelástico formando um comportamento não linear. Isso acontece, pois durante os experimentos de AFM ocorre um contato entre ponta e superfície da amostra na qual chamamos de indentação. A equação 2.1 funciona bem para amostras infinitamente mais rígidas que a ponta apresentando comportamento linear. Porém, para amostras biológicas o comportamento segue uma proporção dada por (COHEN; LIGHTBODY; BRAY, 1997),

$$F \propto \delta^n, \quad (2.22)$$

com  $\delta$  sendo a indentação e  $n$  o expoente associado a geometria do indentador. Como a indentação ocorre no quando a ponta entra em contato com a superfície da amostra, temos simplesmente um problema de contato entre superfícies.

O primeiro a abordar esse tipo de problema foi o Hertz (REIFENBERGER, 2016). Essa teoria é razoavelmente aplicada quando forças de van der Waals, forças eletrostáticas e químicas são desprezíveis em comparação a interação repulsiva elástica. Sendo assim, vem sendo aplicada somente em materiais elásticos, lineares, homogêneos, isotrópicos e sem apresentar forças de superfície atrativas. Assim, a força de atração seguindo o modo de Hertz é dada por,

$$F_{ad}^{Hertz} = 0. \quad (2.23)$$

O raio de contato  $a^{Hertz}$  e a indentação  $\delta^{Hertz}$  são dados por,

$$a^{Hertz} = \left( \frac{R_{tip} F}{K} \right)^{1/3}, \quad (2.24)$$

$$\delta^{Hertz} = \frac{a^{Hertz}}{R_{tip}}, \quad (2.25)$$

com  $R_{tip}$  sendo o raio da ponta,  $F$  sendo a força aplicada no contato (carga normal),  $K$  é uma constante que relaciona os módulos de Young da esfera e da superfície considerando a razão de Poisson da esfera e da superfície.

Derjaguin, Muller e Toporov desenvolveram o método DMT para descrever o contato de uma esfera elástica com adesão contra uma superfície plana rígida. Este modelo visa ampliar o modelo hertziano, ao considerar a adesão e a esfera o substrato após o contato. Ou seja, considera a atração entre ponta e superfície da amostra. A força de adesão  $F_{ad}^{DMT}$ , o raio de contato  $a^{DMT}$  e a indentação  $\delta^{DMT}$  são dados em função da força aplicada seguindo as equações abaixo.

$$F_{ad}^{DMT} = 2\pi R_{tip} W_{123}, \quad (2.26)$$

$$a^{DMT} = \left( \frac{R_{tip} [F + F_{ad}^{DMT}]}{K} \right)^{1/3}, \quad (2.27)$$

$$\delta^{DMT} = \frac{a^{DMT}}{R_{tip}}, \quad (2.28)$$

sendo  $W_{123}$  o trabalho de adesão necessário para separar as duas superfícies. Em muitas circunstâncias,  $W_{123}$  possui valores bem baixos, mas em experimentos realizados em AFM, valores em escalas nanométricas possuem grande valor.

Em contraste dos modelos já apresentados, Johnson, Kendall e Roberts apresentaram um modelo (JKR) que prevê um comportamento histerético graças ao estreitamento da amostra. Sendo assim, o modelo abrange apenas forças de atração que ocorrem na área de contato e não forças de longo alcance entre a esfera e a superfície da amostra. A força  $F_{ad}^{JKR}$ , o raio de contato  $a^{JKR}$  e a indentação  $\delta^{JKR}$  são dados considerando a energia total, que está inclusa a energia elástica armazenada, energia mecânica transmitida pela força aplicada e energia superficial. Temos assim,

$$F_{ad}^{JKR} = \frac{3}{2}\pi R_{tip} W_{123}, \quad (2.29)$$

$$a^{JKR} = \left( \frac{R_{tip}}{K} \left[ \sqrt{F_{ad}^{JKR}} + \sqrt{F_{ad}^{JKR} + F} \right]^2 \right)^{1/3}, \quad (2.30)$$



$$\delta^{JKR} = \frac{a^{JKR2}}{R_{tip}} - \frac{4}{3} \sqrt{\frac{F_{ad}^{JKR} a^{JKR}}{R_{tip} K}}. \quad (2.31)$$

Dentre todos os modelos, o JKR é o mais complexo de todos, pois não considera a conversação do sistema e requer um conhecimento prévio do contato entre as superfícies. O método JKR é o melhor aproximado para determinar qualquer força adesiva necessária para descrever superfícies altamente deformáveis, em comparação ao DMT (REIFENBERGER, 2016). Vale mencionar que nenhuma força atrativa de longo alcance foi incluída no modelo JKR. Quando ocorre o contato esfera-substrato, o raio de contato se forma e uma força adesiva surge a partir da interação de curto alcance entre as partículas da ponta e o substrato. A força adesiva puxa a ponta em direção ao substrato e produz uma deformação sem a necessidade inicial de uma força aplicada. Mas ao aplicar essa força, a deformação e raio de curvatura aumentam. Quando a força aplicada retorna ao valor zero, devido a não conservação, o comportamento do modelo JKR difere do inicial. O raio de contato diminui durante a retirada da ponta até que o raio de contato crítico seja alcançado quando a ponta repentinamente se solta do substrato.

Sendo assim, a força de adesão pode ser definida como a força máxima necessária para romper o contato entre a ponta e o substrato durante a retração da ponta. Conhecendo os modelos de Hertz, DMT e JKR que consideram forças atrativas de longo e/ou curto alcance, podemos definir que as forças de adesão são um combinada das forças de van der Waals  $F_{vdW}$ , forças elétricas  $F_{el}$ , forças de capilaridade  $F_{cap}$  e forças de ligações químicas  $F_{qui}$ :

$$F_{ad} = F_{vdW} + F_{el} + F_{cap} + F_{qui}. \quad (2.32)$$

É importante ressaltar que as forças químicas podem contribuir abundantemente nas forças adesivas. Isso se deve as dopagens que podem ser realizadas em sondas funcionalizadas criando um tipo de sistema receptor-ligante com o substrato.

## 2.4.6 Forças de Dupla Camada

Forças eletrostáticas de dupla camada em um eletrólito aquoso são importantes na física e biologia. A geração de gradientes de cargas superficiais no eletrólito, chamado de dupla camada elétrica (EDL), ocorrem quando superfícies se aproximam o suficiente para ocorrer sobreposição das EDL das respectivas superfícies. É interessante ver a importância das EDL na biologia, pois seu estudo leva a conclusões em processos celulares, tais como adesão celular, estabilidade da estrutura proteica, condensação do DNA e interações membrana-proteína, DNA-proteína e proteína-proteína (SOTRES; BARÓ, 2010)

O estudo das EDL pela AFM faz com que a área de interação seja extremamente reduzida, com isso pode-se verificar a densidade de cargas na superfície local na interação

ponta-amostra (RAITERI; GRATAROLA; BUTT, 1996)(SOTRES; BARÓ, 2010). Em um experimento de AFM, a abordagem mais comum é a solução da equação de Poisson-Boltzmann para o potencial eletrostático, uma equação não linear de segunda ordem. Essa equação não pode ser resolvida analiticamente, mas com aproximações pode-se obter uma expressão. Uma delas é a energia de interação EDL por unidade de área de dois semi-espacos paralelos planos,

$$W_{EDL}(r) = \frac{2\sigma_1\sigma_2\lambda_r}{\varepsilon\varepsilon_0} e^{-\frac{r}{\lambda_r}}, \quad (2.33)$$

sendo  $\varepsilon$  a constante dielétrica do meio,  $\varepsilon_0$  a permissibilidade do vácuo,  $\sigma_1$  e  $\sigma_2$  são densidade de cargas superficiais,  $D$  é a separação e  $\lambda_D$  é o comprimento de decaimento de Debye definido como:

$$\lambda_D = \left( \frac{\varepsilon\varepsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i c_i z_i^2} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2.34)$$

com  $k_B T$  é a energia térmica,  $c_i$  e  $z_i$  são os valores de concentração e valência do  $i$ -ésimo, tipo de íon presente na solução. A energia de interação dada pela equação 2.33 pode ser relacionada por uma força, usando a aproximação de Derjaguin (SOTRES; BARÓ, 2010),

$$F(r) = \left[ \frac{2\pi R_1 R_2}{R_1 + R_2} \right] W(r), \quad (2.35)$$

em que  $R_1$  e  $R_2$  são os raios de curvatura das respectivas superfícies. Caso um dos raios for muito maior que o outro, podemos aproximar ainda mais sobre o formato,

$$F(r) = 2\pi R W(r). \quad (2.36)$$

Na maioria dos experimentos de AFM, a amostra é considerada plana e homogênea quando comparada com a ponta (uma esfera de raio  $R_t$ ). Portanto, a força EDL entre uma ponta de AFM e uma superfície plana separada por uma distância  $r$  com densidades de carga superficial  $\sigma_t$  e  $\sigma_s$ , respectivamente, pode ser expressa como (SOTRES; BARÓ, 2010):

$$F_{EDL}(r) = \frac{4\pi R_t \sigma_t \sigma_s \lambda_r}{\varepsilon\varepsilon_0} e^{-\frac{D}{\lambda_r}}. \quad (2.37)$$

## 2.5 Modos de Operação do AFM

Pudemos contemplar várias forças de diversas naturezas que atuam no experimento do AFM. Por se tratar de forças em regimes atrativos e repulsivos, o microscópio opera em diversos modos de operação/varredura. Os mais citados são: modo contato, modo

tapping e modo não contato como mostra a figura 8. É interessante entender os modos de operação, pois os mesmos, além de gerarem imagens topográficas, podem investigar informações físicas da natureza das forças ali atuantes.

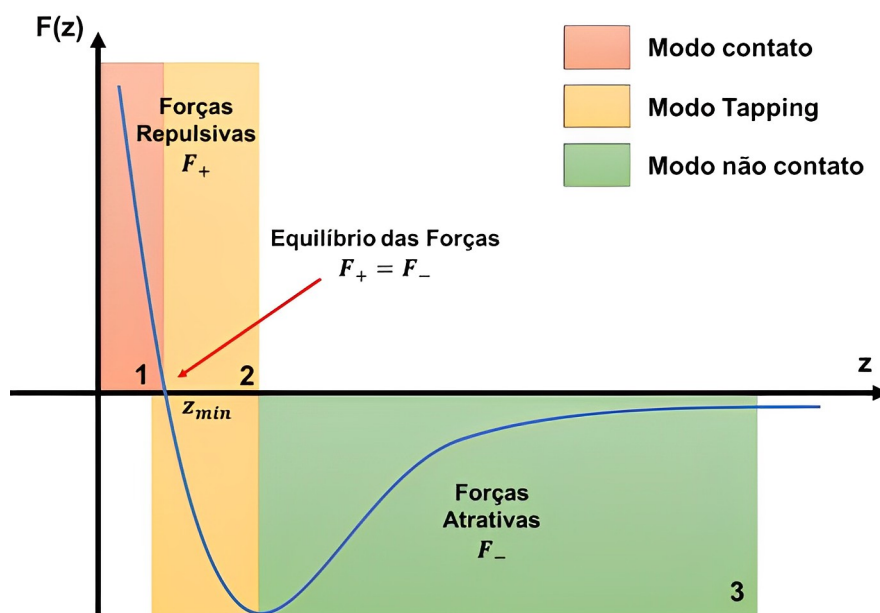
O modo contato atua no regime repulsivo indicada pela região 1 na figura 8. Quando a constante de mola for menor que a superfície, o mesmo irá se curvar para cima devido às forças repulsivas ali dominantes, variando o sinal do laser incidido no fotodetector sem deformar a amostra. A imagem topográfica é formada mantendo as forças entre a sonda e a amostra constantes, e, conseqüentemente, uma deflexão constante. Para amostras biológicas, o ideal é a utilização de cantilevers bem flexíveis (ALENCAR, 2007). Esse modo possui a vantagem de operar de forma rápida, abrindo a possibilidade da análise de fricção, mas possui desvantagens podendo danificar amostras moles (BELLITTO, 2012b).

Modo tapping ou intermitente atua na região 2 da figura 8. Ele é semelhante ao modo contato, porém o cantilever faz contato intermitente com a superfície da amostra oscilando a uma frequência próxima de sua frequência de ressonância enquanto é efetuado a varredura (ALENCAR, 2007). Assim, ponta entra em contato levemente na superfície da amostra. Uma das vantagens deste modo de operação é a redução drástica das forças laterais devido à fração pequena de tempo de contato, auxiliando a visualização de amostras que não aderem muito ao substrato. O atrito desprezível deste modo de operação acaba sendo importante para materiais biológicos. há dois tipos de mecanismo do modo tapping (BELLITTO, 2012b):

- Imagem de Amplitude: faz com que o de feedback ajusta o piezo na direção z para que a amplitude da oscilação do cantilever permaneça aproximadamente constante. As tensões necessárias para manter a amplitude constante podem ser compiladas em uma imagem (sinal de erro), e esta imagem pode muitas vezes fornecer alto contraste entre as características da superfície.
- Imagem de fase: foca na diferença de fase entre as oscilações acionadas do cantilever e as oscilações medidas, que pode ser oriunda a diferentes propriedades do material. Por exemplo, a quantidade relativa de atraso de fase entre o cantilever oscilando livremente e o sinal detectado pode fornecer informações qualitativas sobre as diferenças na composição química, adesão e propriedades de atrito.

Por fim, o modo não contato que ocorre quando a ponta se aproxima da superfície da amostra, conforme a região 3 da figura 8 indica. Devido às forças atrativas de van der Waals, a ponta não toca a superfície da amostra oscilando com frequência  $\nu = \omega/(2\pi)$ . Por conta das oscilações, o cantilever pode ser moldado como um oscilador harmônico (CAPPELLA; DIETLER, 1999). Esse modo possui a vantagem nas forças muito baixas sofridas na amostra e um aumento de vida útil de pontas. Mas possui desvantagens de

Figura 8 – Modos de Operação por AFM: modo contato, modo tapping e modo não contato. Todos eles operam em regimes de forças atrativas e/ou repulsivas seguindo sua natureza física e distância entre ponta-amostra



Fonte: Próprio Autor

possuir resoluções geralmente baixas, apresentando camadas de contaminação na superfície da amostra prejudicando a oscilação do cantilever.

Os diferentes modos de operação abrem um leque de possibilidades de caracterização de amostras. Dependendo do seu interesse, pode-se estudar amostras duras no modo contato, materiais biológicos moles no modo tapping ou com certa adesão superficial fraca e estudo de superfícies macias no modo sem contato. Assim, fica claro que as curvas de força obtidas pelo AFM evidenciam propriedades físicas da amostra devido à origem das forças atuantes em cada regime.

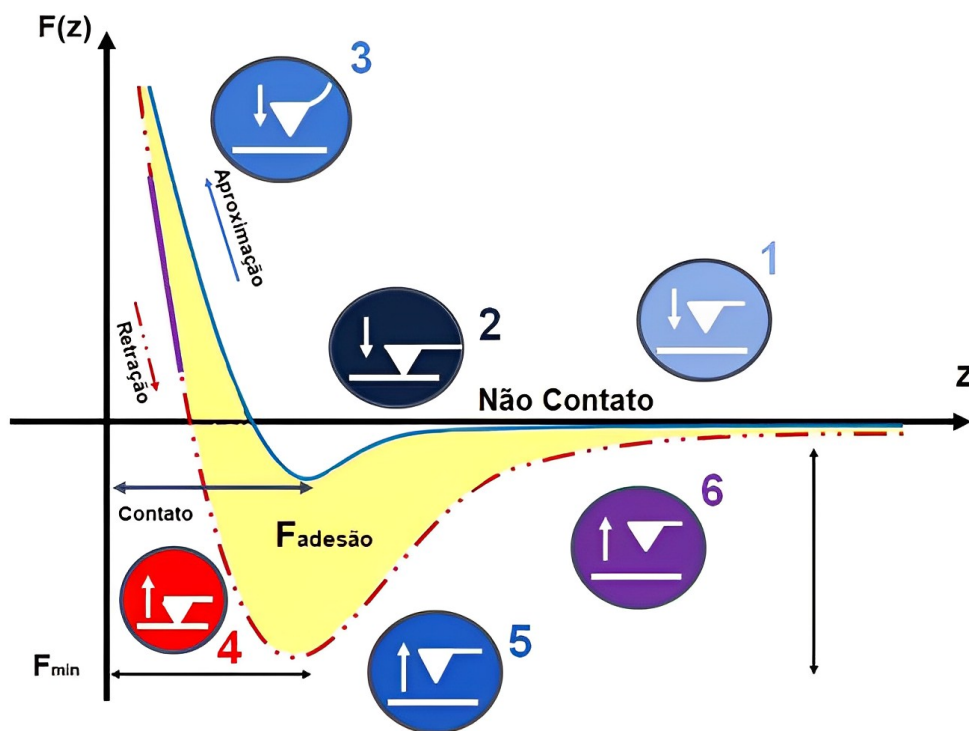
### 2.5.1 Espectroscopia de Força

Analisar as propriedades da amostra por AFM, requer o modo de espectroscopia de força nas curvas de força por deslocamento  $F(z)$ . Sendo assim, tais propriedades da amostra são derivadas das mudanças de deflexão sentidas no cantilever. Em uma única curva, figura 9, temos a interação da ponta com a superfície da amostra a cada ponto do gráfico. A curva de força consiste em duas partes: aproximação da ponta à superfície da amostra (linha azul da figura 9) e a retração (linha vermelha tracejada). A forma da curva de força depende das propriedades físicas e químicas de duas superfícies de interação.

Conforme a ponta se aproxima da superfície da amostra, forças van der Waals de curto alcance atraem a ponta devido ao fato do gradiente da força de atração ser maior

que a constante da mola do cantilever (região 1 da região 9). O contato ocorre após o **jump contact**: salto para o contato (região 2). Após o contato, ainda há uma diminuição da distância ponta-amostra sobrepondo as nuvens eletrônicas das duas superfícies, originando uma repulsão oriunda da mecânica quântica (região 3). Após atingir um máximo de força, ocorre a retração da curva de força diminuindo a distância e as forças repulsivas. A ponta não se separa imediatamente da superfície da amostra no mesmo ponto em que começou a tocar, deflexionando a ponta (região 4). O não desprendimento é causado por forças adesivas. Após uma força mínima na curva de retração, a força elástica do cantilever excede o gradiente de forças adesivas, separando a ponta da superfície da amostra (região 5). Por fim, a separação resulta em flutuações (oscilações) do cantilever em torno do seu ponto de equilíbrio (região 6).

Figura 9 – Esquema de uma típica curva de força por deflexão/deslocamento, oriunda em uma amostra macia.



Fonte: Próprio Autor

A curva de força representada na figura 9 é característica de materiais viscoelásticos. A aproximação e retração das curvas de forças formam uma histerese entre elas. A histerese no ciclo de aproximação/retração da curva de força é gerada pelo trabalho realizado, dada uma força resultante entre a força elástica e viscosa ( $F_r = F_{el} + F_v$ ) atuante no cantilever, perdido por um atrito interno do próprio material. O ajuste das Utilizando-se do modelo de Hertz, o módulo elástico da amostra pode ser obtido ajustando as curvas de força em dado intervalo de deflexão. Usando o modelo de Hertz para um indentador em formato de cone (ponta AFM), a força é dada por (ALENCAR, 2010),

$$F(\delta) = \frac{2}{\pi} \frac{E}{1 - \nu^2} \tan\theta \delta^2, \quad (2.38)$$

sendo  $E$  o módulo de Young,  $\nu$  é a razão de Poisson do material e  $\theta$  representa o ângulo de abertura da ponta cônica e  $\delta$  a indentação provocada pela sonda de AFM na superfície da amostra. A força na equação 2.38 faz jus aos estudos de propriedades viscoelásticas da amostra, uma vez que o contato da ponta provoca uma indentação na amostra deformando-a levemente. É vale ressaltar que o módulo de Young possui papel fundamental para o estudo das propriedades elásticas, uma vez que seu valor baixo significa mais facilidade em indentar (deformar) a amostra e seu alto valor oferece uma resistência a deformação (FEYNMAN; LEIGHTON; SANDS, 1965).

Forças de adesão são obtidas durante a retração do cantilever, principalmente na região 4 para a região 5. O cantilever, "preso" a superfície da amostra, é solto após a deflexão negativa dele gerar uma força elástica o suficiente para superar o gradiente de forças adesivas atuantes no sistema. A força adesiva máxima é denotada pelo  $F_{min}$  na figura 9. Assim como pode-se obter a adesividade pelo trabalho realizado pelas forças adesivas, utilizando-se da área da curva de deflexão/deslocamento em uma porção negativa de deflexão.

Na abordagem de Oliver e Pharr (OLIVER; PHARR, 2004), a deformação causada na retração da curva de força retorna ao seu estado inicial apenas para a parte elástica da amostra, enquanto a parte plástica permanece inalterada. É interessante esta abordagem, pois as indentações feitas na superfície da amostra podem deformar plasticamente o material devido às pressões altas aplicadas na amostra. Visto isso, a abordagem considera apenas o processo de carga de alívio força sobre a superfície. Para este método, um parâmetro importante consiste na dureza  $S$  da superfície dada por,

$$S = \frac{dF}{dz}, \quad (2.39)$$

onde a derivada  $dF/dz$  é a derivada primeira da força aplicada na superfície em relação a distância. Tal propriedade pode ser analisada a cada ponto da superfície da amostra gerando um mapa de dureza do material.

## 2.5.2 PeakForce Quantitative NanoMechanics

PeakForce Quantitative NanoMechanics (PFQNM) (KWAŚNIEWSKA et al., 2021) é um modo de operação relativamente novo que facilita a aquisição de dados topográficos da superfície e parâmetros mecânicos como adesão, dissipação de energia e deformação com mesma resolução espacial. O experimento PFQNM pode ser utilizado para testes de nanoindentações. Funcionando em uma ampla variedade de sondas, é possível realizar uma

correlação dos parâmetros de altura do AFM com parâmetros nanomecânicos facilitando as relações topográficas com propriedades físicas.

Neste modo, as sondas oscilam a uma frequência (0.5 - 2 kHz) muito abaixo da ressonância do cantilever com picos de amplitudes, acarretando periodicidade no contato com a amostra em um curto período de tempo e uma força oscilatória é exercida na superfície da amostra (TRTIK; KAUFMANN; VOLZ, 2012). A cada “toque” da sonda com superfície da amostra é coletada uma curva de força vs distância. A real novidade da técnica consiste em controlar um “pico de força” que é aplicada a cada ponto na superfície da amostra, sendo mantida constante graças ao sistema de feedback durante a varredura.

## 2.6 Dados Quantitativos a partir dos mapas topográficos.

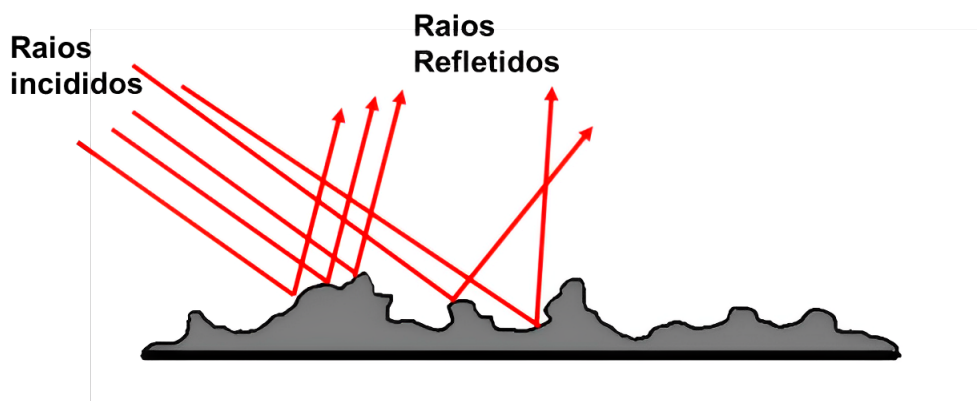
É evidente que as características topográficas de uma amostra diz muito sobre ela. Na córnea estas propriedades são amplamente estudadas visando as diferenças de rugosidade em cada camada do tecido ocular (JUMELLE et al., 2017). A maneira como estruturas das camadas da córnea estão distribuídas ao longo de suas respectivas superfícies dizem muito sobre elas. O epitélio precisa ser uniforme para manter suas funções nativas utilizando-se das nanovilosidades (RATES et al., 2022)(LOMBARDO et al., 2006). Feixes de fibras de colágeno do estroma precisam ter certa organização para manter a córnea transparente, caso contrário, o colágeno contrai-se devido ao acúmulo de líquido desorganizando as fibras. O endotélio, por mais que possua células assimétricas hexagonais, podem ainda mais mudar sua forma devido sua habilidade de pleomorfismo. Sendo ainda mais direto, cada camada possui suas próprias componentes depositadas em suas superfícies, e a rugosidade de cada uma é bem característica, o que pode até nos ajudar a identificar cada camada corneana (LOMBARDO et al., 2006)(LOMBARDO et al., 2012). Fisicamente falando, a rugosidade acaba tendo um papel importantíssimo para a refração da luz que incide nos olhos, uma vez que a rugosidade pode atuar no espalhamento da luz refletida na superfície das camadas do tecido ocular, como mostra a figura abaixo (SILVA et al., 2016).

Sabemos que patologias, tal como a CB detalhada na seção 2.2, modifica bruscamente e progressivamente a superfície das camadas da córnea. Assim uma manifestação microscópica nas estruturas internas da córnea podem levar a efeitos macroscópicos, como os sintomas. Usando a definição de irregularidades na textura da superfície (CRUZ et al., 2016), fica claro a necessidade de estudar mais a fundo a rugosidade das camadas corneanas. Vale mencionar que as irregularidades da superfície de amostras podem estar associadas com diversos fatores, tais como: contaminação, rugosidade topográfica e rugosidade composicional (sendo as duas últimas rândomicas ou periódicas).

Precisamos entender alguns conceitos básicos de superfícies para entendermos a rugosidade de cada superfície. Primeiro a superfície geométrica, que consiste na superfície



Figura 10 – Raios incidentes são refletidos devido às irregularidades na superfície do material.



Fonte: Próprio Autor

ideal, onde não existem irregularidades. Tal definição serve de referência. A superfície real é aquela que limita o corpo em relação a sua superfície geométrica compondo picos e vales. A superfície da figura 10 mostra um exemplo de superfície real. Já a superfície efetiva é aquela medida por alguma técnica aproximando-se da superfície real. Cada superfície aqui definida possui um perfil: geométrico, real e efetivo. Perfil geométrico é a intersecção de um plano perpendicular com a superfície geométrica. Já o perfil real é a intersecção do plano perpendicular com a superfície real. O perfil efeito é aquele que se obtém após medir o perfil real e consegue mostrar os devidos da superfície a partir de uma linha média.

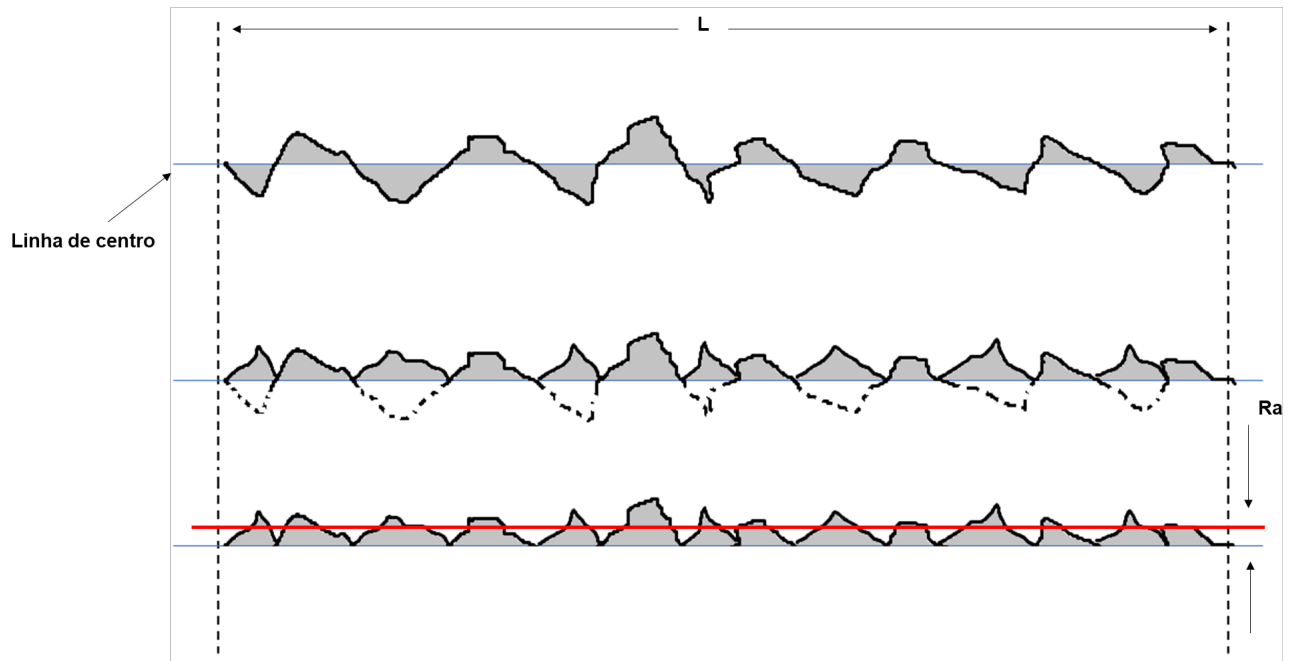
A rugosidade é caracterizada por muito parâmetros, como: altura, espaçamento e híbridos (CRUZ et al., 2016). É mais comum usar parâmetros de altura para calcular rugosidade indicando as diferenças de tamanho entre os picos e os vales presentes no material. Quantificar a rugosidade das superfícies, há a rugosidade média e rugosidade média quadrática nos parâmetros de altura.

A rugosidade média  $Ra$  pode ser definida como a média aritmética dos desvios dos  $n$  valores absolutos de picos e vales do perfil efetivo, no comprimento medido. A rugosidade média pode ser aproximada como uma soma dos valores das alturas  $Z$ , dividido pelo número de alturas tomadas:

$$Ra = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |z_i|, \quad (2.40)$$

sendo  $n$  o número de pontos contidos no espaço selecionado para medir  $Ra$  e  $z_i$  é a distância vertical máxima entre os pontos mais altos e mais baixos na imagem antes do ajuste do plano. A figura 11 mostra como este parâmetro pode ser obtido através da linha central, onde a área de cima da linha seja igual à área de baixo. Não o bastante, a rugosidade média pode ser entendida graficamente como a área abaixo do retângulo pela equação:



Figura 11 – Parâmetro Rugosidade Média  $Ra$ .

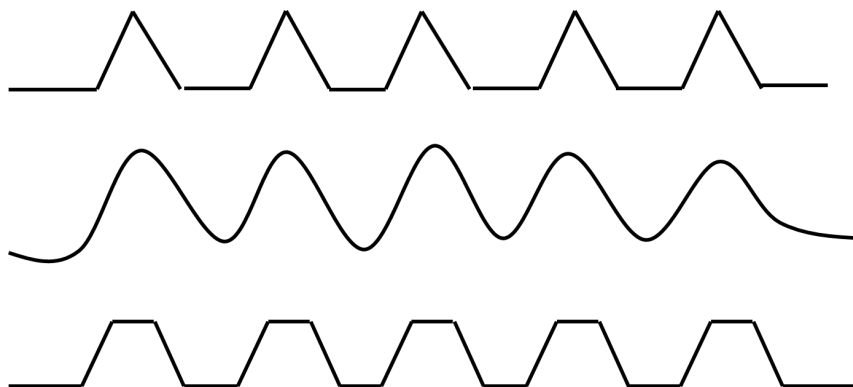
Fonte: Próprio Autor

$$Ra = \frac{1}{L} \int_0^L |z(x)| dx, \quad (2.41)$$

sendo  $L$  a largura da área considerada.

Algumas considerações devem ser feitas sobre a rugosidade média. Ela é um valor absoluto, sendo bem definido e facilmente medido. Mas podem ter uma desvantagem: valores muito distantes da média podem ficar ocultos e com isso defeitos podem ficar escondidos e não considerados em alguma análise. Sendo assim, superfícies diferentes podem conter o mesmo valor de rugosidade média, como mostra a figura 12.

Figura 12 – Diferentes irregularidades podem dar valores iguais de Rugosidade Média.



Fonte: Próprio Autor

Para tornar os dados mais precisos, a rugosidade média quadrática  $RMS$  representa

o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície (SILVA et al., 2016). Este meio é mais sensível às variações das irregularidades em comparação ao  $Ra$ .

Podemos definir matematicamente  $RMS$  como sendo a equação 2.42. Em seguida, apresentaremos os materiais e métodos utilizados para a caracterização das propriedades nomomecânicas e ultraestruturais das camadas epitelial e endotelial pelo uso da AFM.

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L |z^2(x)| dx}. \quad (2.42)$$

## 3 Materiais e Métodos

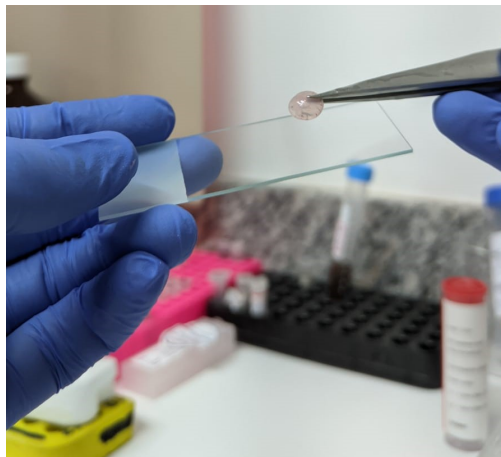
Neste trabalho foram analisadas duas camadas de córneas humanas: epitélio anterior e endotélio posterior. As próximas seções detalharão os grupos e aquisição das amostras, preparação e análise de suas propriedades físicas.

### 3.1 Aquisição das amostras

A pesquisa se concentrou nas alterações das propriedades biofísicas das camadas epitelial e endotelial das córneas humanas, consistindo nos seguintes grupos: grupo epitélio CTRL (Epitélio Controle), grupo epitélio CB (Epitélio com Ceratopatia Bolhosa), grupo endotélio CTRL (Endotélio Controle) e grupo endotélio CB (Endotélio com Ceratopatia Bolhosa)

As amostras de córneas, ver Figura 13, utilizadas nesta pesquisa foram obtidas em parceria com o Banco de Olhos da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA, São Luís, Maranhão, Brasil), com aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa (CAAE nº 16031219.0.0000.5086), e posteriormente preservadas em optisol. Ao todo foram seis amostras de córneas humanas (n=6) para cada grupo analisado.

Figura 13 – Amostra de Córnea adquiridas em parceria com o Bando de Olhos da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA.



### 3.2 Preparação das amostras

Primeiramente as córneas foram preservadas cortadas em quadrantes usando uma lâmina de bisturi nº 15. Cada quadrante foi utilizado para analisar as camadas epitelial e endotelial. Antes de ser analisado no AFM, o tecido foi devidamente fixado ao disco magnético do equipamento com adesivo instantâneo à base de ciano acrilato.

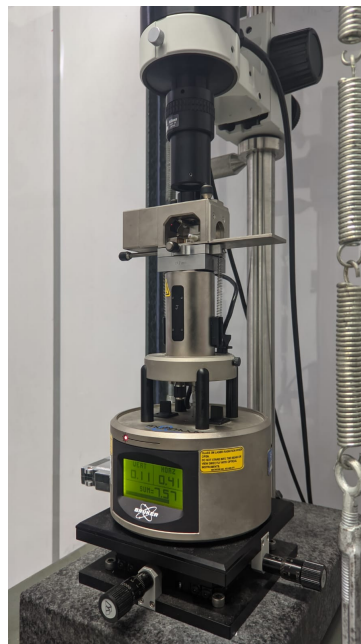
Para análise do epitélio, quadrantes da córnea foram deixadas voltadas para cima acessando a parte anterior da camada. Para análise do endotélio, quadrantes da córnea foram deixadas voltadas para baixo acessando a parte posterior dessa camada. As amostras foram feitas em ar após os quadrantes de tecidos terem secados pelo ar ambiente.

### 3.3 Experimentos de Microscopia de Força Atômica

#### 3.3.1 Parâmetros de varredura

Discos magnéticos contendo quadrantes da córnea foram analisadas no microscópio Multimode 8 (Bruker, Santa Bárbara, CA, EUA), Figura 14, utilizando sondas de silício de raio nominal de 2 nm, com constante de mola nominal de 0.4 N/m; no entanto, a constante de mola real foi calibrada usando o método de ruído térmico (BELIKOV *et al.*, 2014). O modo de varredura aplicado foi o Peak Force Tapping Quantitative Nanomechanics(QNM), adquirindo mapas topográficos juntamente com mapas nanomecânicos da superfície da amostra. Todos os dados foram obtidos em um ambiente de ar (42% de umidade e 23 °C), com taxa de varredura de 0.5 Hz.

Figura 14 – Microscópio de Força Atômica Multimode 8 - Bruker



Com tamanho de varredura entre  $10 \mu m^2$  a  $2 \mu m^2$  e frequência de aquisição de curva de 1 kHz, foram realizadas análises da membrana celular das camadas epitelial e endotelial e notar as diferenças entre controle e patologia. Um total de seis córneas de diferentes indivíduos foram analisados. Para comparações entre dados das propriedades biofísicas entre cada grupo, foram utilizados mapas de tamanho de varredura de  $5 \times 5 \mu m$ .

Para geração dos mapas e análise dos dados quantitativos de rugosidade e propriedades nano mecânicas, foram utilizados os softwares Nanoscope Analyses 2.0 e Gwyddion 2.57.

### 3.3.2 Análises Ultraestruturais

Para os dados AFM, a análise estatística de rugosidade foi baseada na altura de cada píxel da imagem, analisada a partir do mapa de altura. O parâmetro  $R_q$  (rugosidade média quadrática) foi empregado para o cálculo da rugosidade nesta etapa. Para evitar alterações nos valores reais, nenhum pré-tratamento da imagem foi realizado nos mapas antes do cálculo deste parâmetro. Conforme mencionado, o tamanho da varredura foi padronizado.

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i^2}, \quad (3.1)$$

onde  $z$  é a altura de cada píxel e  $N$  é o número total de píxeis (no nosso caso, 65.536), com tamanho de digitalização padronizado para  $5 \times 5 \mu\text{m}$ . Antes da análise da rugosidade, os mapas foram pré-tratados com um ajuste polinomial de terceira ordem (GONG *et al.*, 2016), permitindo que diferenças de altura mais expressivas, especialmente promovidas pela preparação da amostra, fossem minimizadas, resultando em topografia com contribuições mais significativas de estruturas de membrana ou fibras de colágeno dependendo da camada analisada.

Para analisar os diâmetros das estruturas encontradas na superfície epitelial e nas fibras abaixo da membrana de Descemet fibróticas encontradas, foram medidas aproximadamente 150 (80) fibras de colágeno (crateras) de cada camada usando o software Nanoscope Analyses 2.0 com a ferramenta Section Analysis, distância da largura a meia altura de cada fibra.

### 3.3.3 Análises Nano mecânicas

Cada curva obtida durante as medições utilizando o AFM carrega muitas informações de naturezas físicas diferentes sobre a amostra que está sendo analisada. A figura 9 mostra um ciclo de aproximação (linha azul) e retração (linha tracejada vermelha) de uma sonda AFM da superfície de uma amostra. Para cada informação contida nas curvas de forças, é aplicado modelos matemáticos, citados aqui no trabalho, para extraí-las. Dados de dureza da membrana celular epitelial e endotelial foram calculados a partir da região de inclinação destacada em verde na figura 9.

Valores de declividade foram considerados na porção de contato das curvas de aproximação, em intervalos de 30-70% dos valores de deflexão da curva de força após o

ponto de contato da ponta com a amostra. Para os dados de adesão obtidos, foi utilizado a equação 2.29,

$$F_{ad}^{JKR} = \frac{3}{2}\pi R_{tip} W_{123}, \quad (3.2)$$

com valores de forças máximas negativas, que representam a resistência do cantiléver de retrair a partir da superfície a amostra, na curva de retração.

Os dados de área e volume foram calculados a partir dos mapas topográficos de  $5 \mu\text{m}^2$  da membrana celular endotelial, utilizando o software Gwyddion 2.57, selecionando áreas de  $1 \mu\text{m}^2$  percorrendo todo o mapa topográfico.

### 3.3.4 Análises Estatísticas

Usamos a distribuição normal pelo único critério avaliado pela variância one-way (ANOVA) e pós-teste de Turkey, considerando, valores estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$ . As análises estatísticas e gráficos foram feitos pelo software ORIGIN. Para todos os dados, o erro calculado foi o desvio padrão (média  $\pm$  DP).

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos nessa pesquisa seguindo a metodologia aqui exposta, assim como as discussões sobre os mesmos.

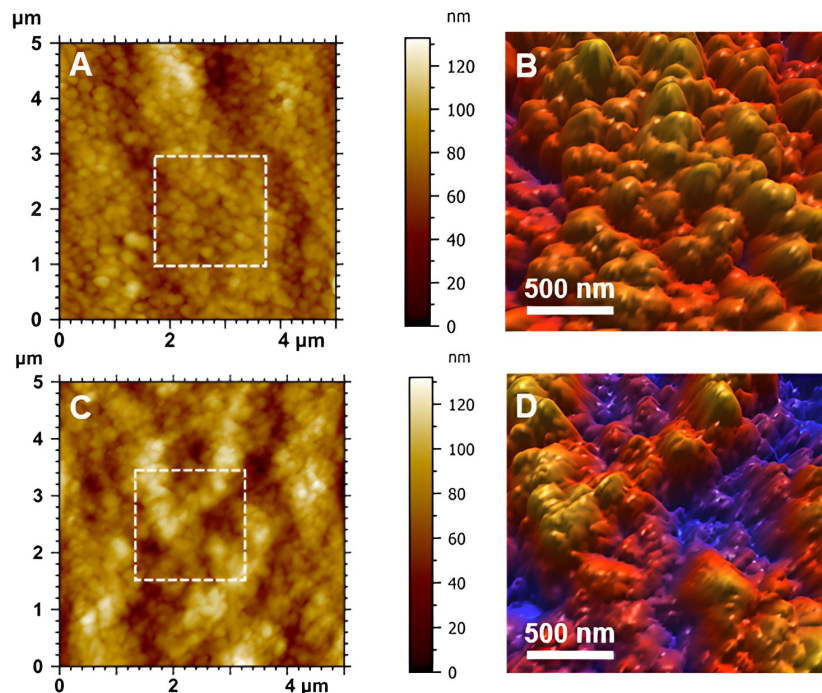
## 4 Resultados e Discussões

Nas seções anteriores discutiu-se a teoria, bem como a descrição experimental com aparatos estatísticos de rugosidade e propriedades nano mecânicas para caracterização das camadas epitélio e endotelial de córneas humanas, assim como as alterações provocadas pela patologia CB. Utilizando-se da metodologia aqui apresentada, nas próximas seções será abordado os resultados obtidos explorando os parâmetros estruturais e nano mecânicos, comparando esses resultados com aqueles obtidos em amostras com alterações patológicas

### 4.1 Avaliação Ultraestrutural do Endotélio

Graças ao poder de resolução do AFM, com sua resolução vertical e horizontal operando no ar, aproximadamente 0.1-0.5 nm e 1-5 nm, respectivamente, dependendo da rigidez da amostra (AMORIM et al., 2022), observações podem ser feitas comparando a membrana celular endotelial controle com as patológicas. Mapas topográficos bidimensionais do endotélio investigados neste trabalho são apresentados na Figura 15.

Figura 15 – Mapas topográficos  $5\mu\text{m}^2\text{m}$  da membrana celular endotelial controle (A) e patológica (C). Maiores detalhes podem ser visualizados no zoom de  $1\mu\text{m}^2$  (B-C) destacado nos mapas topográficos de cada grupo.

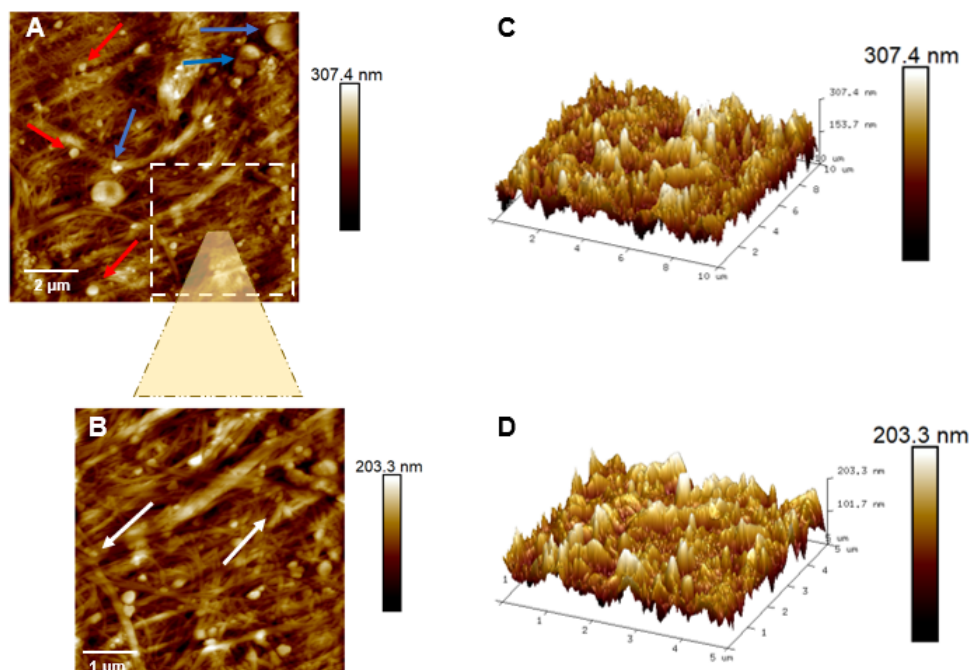


A Figura 15A mostra a membrana celular de uma única célula endotelial saudável. Podemos observar a presença de estruturas globulares (saliências) em sua superfície, algo que foi reportado na literatura como sendo pequenas (300 – 500 nm), médias (500 – 800

nm) e grandes (800 – 1500 nm)(ALBUQUERQUE; PIGATTO; FREITAS, 2015). A Figura 15B amplia as saliências destacadas na membrana celular da Figura 15A pelo quadrado pontilhado branco, mostrando que as estruturas globulares são numerosas e uniformemente distribuídas. Tais estruturas podem conter poços e glicocálices, componentes importantes para deixar o endotélio uniforme devido ao contato com o humor aquoso no endotélio posterior influenciando beneficentemente para a refração da luz na porção posterior da córnea (ALBUQUERQUE; PIGATTO; FREITAS, 2015)(LYDATAKI et al., 2003a). Todavia, a patologia CB surge devido a danos no tecido ocular, provocando morte celular da camada endotelial. Assim o número de células endoteliais decaem a uma taxa anormal. Com esta causa, o efeito são espaços deixados pela apoptose celular fazendo com que as demais células da camada tendem a migrar (esticar-se) para a região de vacância, aumentando sua área superficial, saindo da forma hexagonal assimétrica e adotando formas pleomórficas para manter o endotélio funcional. Esta migração, é possivelmente atribuída aos resultados encontrados na Figura 15D que evidencia a membrana celular endotelial portadora de CB com regiões mais baixas indicando que o número de saliências não permanece o mesmo, ocasionando em mudanças na densidade superficial da membrana endotelial.

A Figura 16 mostra mapas topográficos 2D e 3D da região posterior de córneas que apresentaram fibrose em alguns dos quadrantes separados para análise.

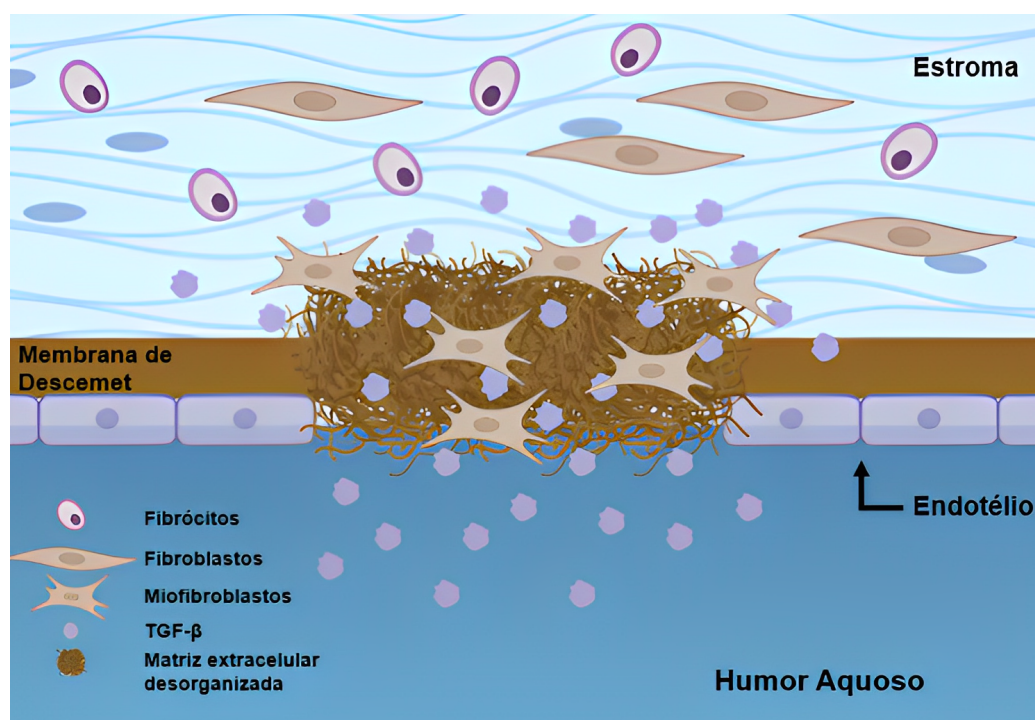
Figura 16 – Mapas topográficos de  $10\mu\text{m}^2$  bidimensionais (A) e tridimensionais (C) mostram os feixes de colágeno da matriz extracelular formada pelas lesões. O colágeno pode ficar ainda mais evidente em varredoras de  $5\mu\text{m}^2$  2D (B) e 3D (D). Estruturas globulares podem ser destacadas em grandes (setas azuis) e pequenas (setas vermelhas)





A sonda do AFM localizou as fibras de colágeno indicando a fibrose devido à progressão da doença e degeneração da monocamada endotelial, apresentando algo semelhante a uma matriz extracelular desorganizada diferenciando-se da membrana de Descemet que apresenta um padrão mais compacto e poroso (MEDEIROS et al., 2019)(OLIVEIRA; WILSON, 2020). É possível observar as fibrilas de colágeno que apresentam um arranjo em feixes 16A. As fibrilas têm um diâmetro médio de  $62,69 \pm 6,25$  nm. Na Figura 16A é possível olhar estruturas globulares pequenas e grandes, setas vermelhas e azuis, respectivamente, na superfície dos mapas topográficos. Fibras de colágeno podem ser bem mais observadas ampliando os mapas, como indica a Figura 16B. O provável é que esse processo seja regulado pelo fator de crescimento pró-fibrótico  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (MEDEIROS et al., 2019). que aumentam sua produção após lesões endotelial diferenciando componentes celulares do estroma em fibras de colágeno. Ljubimo et al. evidenciaram que córneas portadores de CB possuem depósitos de fibrilares da glicoproteína de tenascina entre o estroma posterior e a membrana de Descemet, corroborando com os dados topográficos apresentados na Figura 16(LJUBIMOV et al., 1996b). Um esquema apresentado na Figura 17 pode auxiliar na visualização do processo da formação da camada de fibrose, onde ocorre a diferenciação de fibroblastos, ceratócitos ativados, e fibrócitos derivados da medula óssea em miofibroblastos e fibrose na córnea posterior criando uma matriz extracelular desorganizada(MEDEIROS et al., 2019)(OLIVEIRA; WILSON, 2020)(WILSON, 2019).

Figura 17 – Camada fibrótica nas camadas mais internas da córnea. O tecido ocular desenvolve fibrose em resposta a lesões.

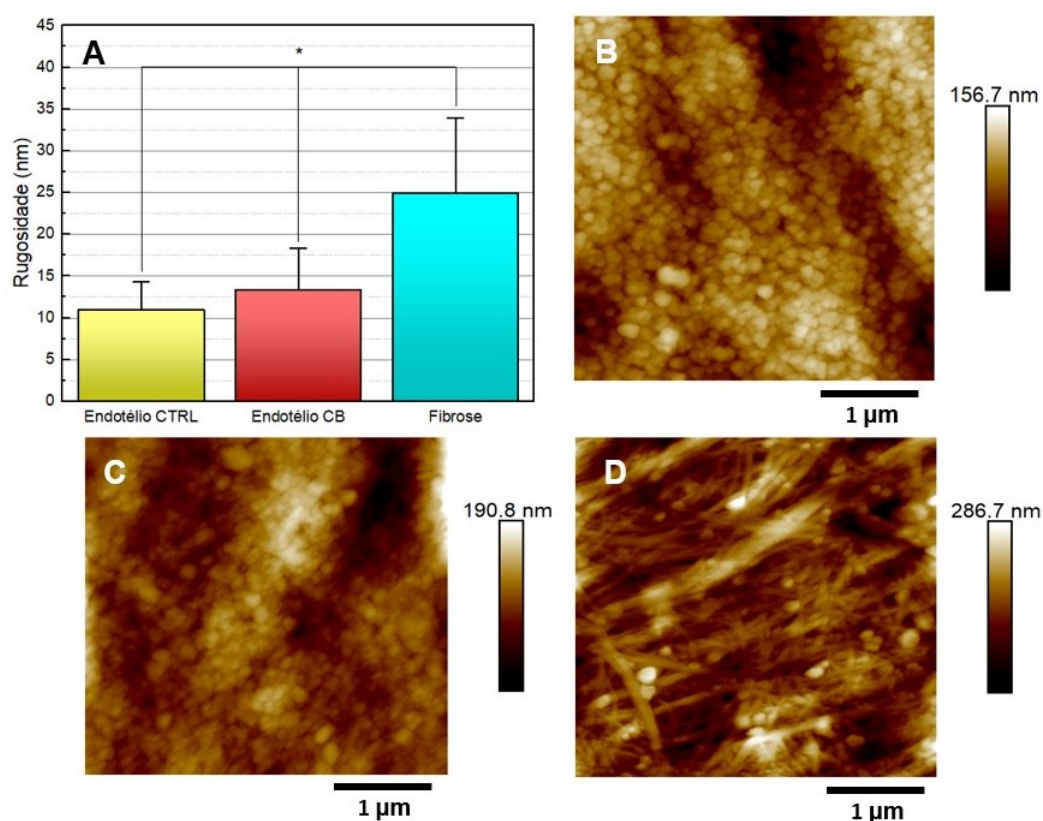


Fonte: Próprio Autor

## 4.2 Avaliação das Propriedades Nano mecânicas do Endotélio.

Devido às mudanças ultraestruturais causadas pela CB, as diferentes camadas da córnea sofrem uma mudança considerável em suas propriedades físicas. A camada endotelial é composta de um único painel de células endoteliais que possuem distribuições uniformes de saliências. A característica da CB é a ocorrência da disfunção endotelial por fatores externos e internos. Com a perda progressiva da monocamada endotelial, as células mudam seu formato aumentando a sua rugosidade, como indica a Figura 18A.

Figura 18 – Dados quantitativos de rugosidade da superfície endotelial posterior. Podemos comparar a rugosidade (A) entre controle, patológico e camada de fibrose deixada pelas lesões na monocamada endotelial até deixarem vazios preenchidos pela fibrose. Podemos verificar o avanço da mudança da topografia avaliando a rugosidade comparando os mapas topográficos controle (B), patológico (D) e fibras (D). O asterisco indica que os grupos possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .

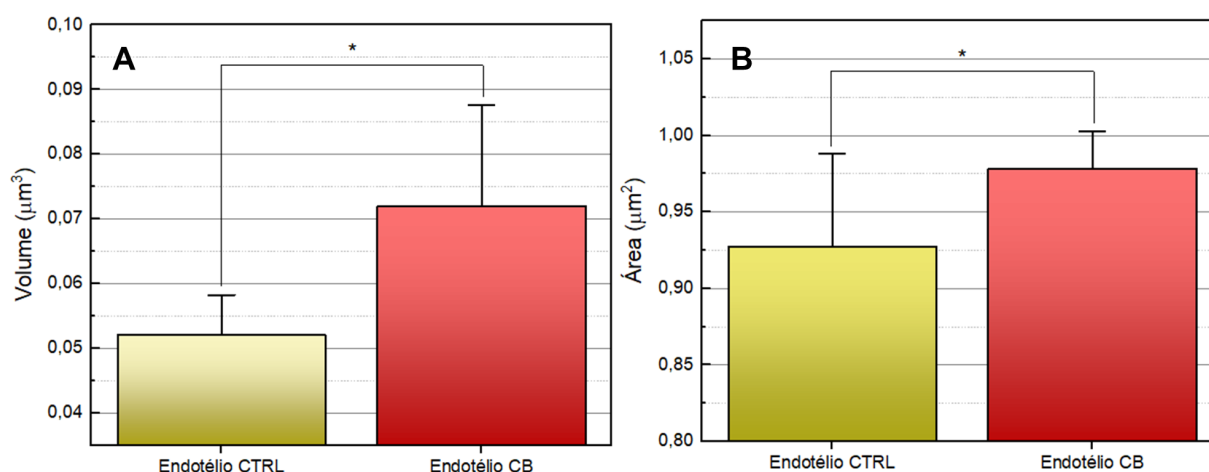


Podemos acompanhar a degradação da camada endotelial posterior com os dados quantitativos de rugosidade relacionando com os dados qualitativos apresentados na seção 4.1. Valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP) de rugosidade foram obtidos através dos mapas topográficos chegando a  $10,99 \pm 2,2$  nm para endotélio CTRL,  $13,35 \pm 3,34$  nm Para endotélio CB e  $24,91 \pm 5,99$  nm para camada de fibrose. As vacâncias causadas pela doença obriga, por natureza celular, as células endoteliais a taparem o vazio esticando-se até preencherem a monocamada, uma vez que existe a dificuldade de mitose. Deixando

suas formas hexagonais para uma pleomórfica, a rugosidade na superfície endotelial tende a aumentar devido a esse prolongamento da membrana celular. Isso fica evidente comparando o grupo controle com o patológico em 18A. Não o bastante, as lesões causadas na córnea devido à CB, causam fibrose na porção anterior da córnea. Essa fibrose existe pelas vacâncias locais no qual a monocamada endotelial não consegue preencher perfeitamente. Pelo arranjo aleatório das fibras de colágeno diferenciadas de componentes celulares do estroma, a rugosidade tende a aumentar ainda mais que a monocamada endotelial com vacâncias em sua superfície doente sem a fibrose. Este resultado pode indicar um avanço da doença em córneas medidas que apresentaram tal característica, como mostra o mapa.

Dados que podem corroborar com o aumento da rugosidade observadas no grupo patológico são dos de volume (Fig 19A) e área (Fig 19B). Valores médios  $\pm$  DP para o volume é de  $0,052 \pm 0,004 \mu\text{m}^3$  para o grupo controle e  $0,072 \pm 0,010 \mu\text{m}^3$  para o grupo patológico. Para a área, temos valores médios com desvios padrões de  $0,927 \pm 0,040 \mu\text{m}^2$  e  $0,978 \pm 0,016 \mu\text{m}^2$ . Podemos observar um aumento tanto do volume quanto da área devido a CB. Para interpretarmos estes dados, precisamos estar cientes, novamente, da adaptação da monocamada endotelial referente a lesões. A F-actina é dos principais componentes do citoesqueleto celular desempenhando um papel importante na manutenção da estrutura da célula. Sendo uma estrutura não permanente, mas dinâmica, a F-actina é composta de monômeros de G-actina que são adicionados e perdidos para deixar o citoesqueleto da célula em equilíbrio e poder se adaptar às tensões celulares (KIM et al., 1992).

Figura 19 – Dados quantitativos de volume (A) e área (B) da superfície endotelial. O asterisco indica que os grupos possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .



Graças à perda gradual da densidade de células endoteliais, o pleomorfismo e o polimegetismo<sup>1</sup> acabam sendo fatores em comum de córneas com envelhecimento, diabetes, traumas cirúrgicos, infecções e uso de lentes de contato (KIM et al., 1992)(BEATO et al.,

<sup>1</sup> variação maior do que o normal no tamanho das células endoteliais

2021)(LAING et al., 1976). Com lesões causadas na córnea pela CB, desencadeada por doenças ou traumas, a F-actina desempenha um papel fundamental na cicatrização das feridas. As fibras de F-actina se redistribuem pelo citoplasma saindo da borda das células indo em direção ao redor do núcleo das células endoteliais, fazendo-a perder seu formato. As alterações podem sugerir um estresse no endotélio, enquanto o mesmo tenta manter sua estrutura resistindo ao inchaço celular com alterações mínimas na F-actina. Essas mesmas alterações morfológicas são as responsáveis pelo aumento do volume e área na membrana celular endotelial aqui evidenciados. Devido à redistribuição da F-actina, a célula altera seu formato aumentando o valor médio da área das células endoteliais e conseqüentemente seu volume (RAO et al., 2000). Tais dados podem indicar um parâmetro de funcionalidade do endotélio, uma vez que o aumento do volume e área estão correlacionados com a perda da densidade de células endoteliais, gerando pleomorfismo e polimegetismo, onde há conexão com a diminuição da incidência de CB afática em olhos japoneses e indianos (MATSUDA; YEE; EDELHAUSER, 1985)(RAO et al., 2000)

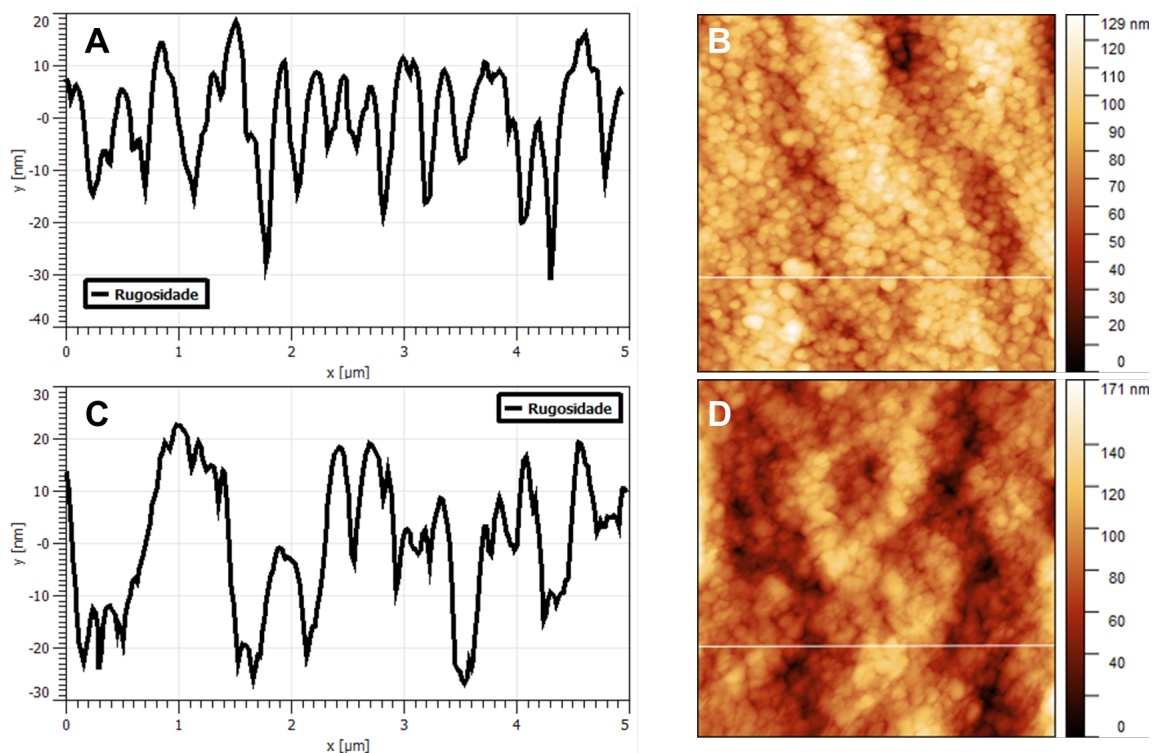
A degradação da superfície endotelial posterior fica ainda mais evidente se voltarmos nossa atenção para o Figura 20. Em 20A podemos ver uma certa uniformidade entre os picos presentes no gráfico gerado pela linha branca na Figura 20B. Este dado pode ser referente a presença dos canais iônicos e glicocálices presentes na superfície endotelial posterior (PATEL; BOURNE, 2009b)(ALBUQUERQUE; PIGATTO; FREITAS, 2015)(LYDATAKI et al., 2003a). Mas devido o avanço da patologia, ao nível celular, podemos ver a degradação dos picos de rugosidade ao olharmos para o gráfico da Figura 20C gerado pela linha no mapa da Figura 20D. Este fato associamos a instabilidade na relação endotélio com humor aquoso, uma vez que há perda de canais iônicos e perda de bombas energéticas importantes para manter o controle de hidratação da córnea, além de mostrar a progressão da CB.

Mudanças topográficas podem gerar diferentes resistências apresentadas pelo tecido ocular. Diferenças no módulo de elasticidade se dá por causas multifatoriais que vão desde a dificuldades na medição do módulo de elasticidade de tecidos biológicos moles, até a citoarquitetura de cada grupo de células (THOMASY et al., 2014). Utilizando-se da AFM, podemos comparar o módulo de Young entre os grupos controle, doente e fibrose, como mostra a Figura 21.

Valores médios  $\pm$  DP de módulo de Young de cada grupo do gráfico da Figura 21A foram obtidos:  $20.03 \pm 11.80$  MPa para endotélio CTRL,  $28.37 \pm 35.86$  MPa para endotélio CB e  $45.90 \pm 20.84$  MPa para fibrose. Uma interpretação do pleomorfismo pode ser exibido pelo gráfico presente na Figura 21A. O módulo de Young mostra o quanto um corpo possui facilidade ou resistência em se deformar (FEYNMAN; LEIGHTON; SANDS, 1965).As células endoteliais precisam possuir um baixo módulo de elasticidade, pois o mesmo possui como definição o quanto um corpo deforma dada determinada tensão (LEIGHTON; SANDS, 1965). Considerando localmente a deformação causada pela



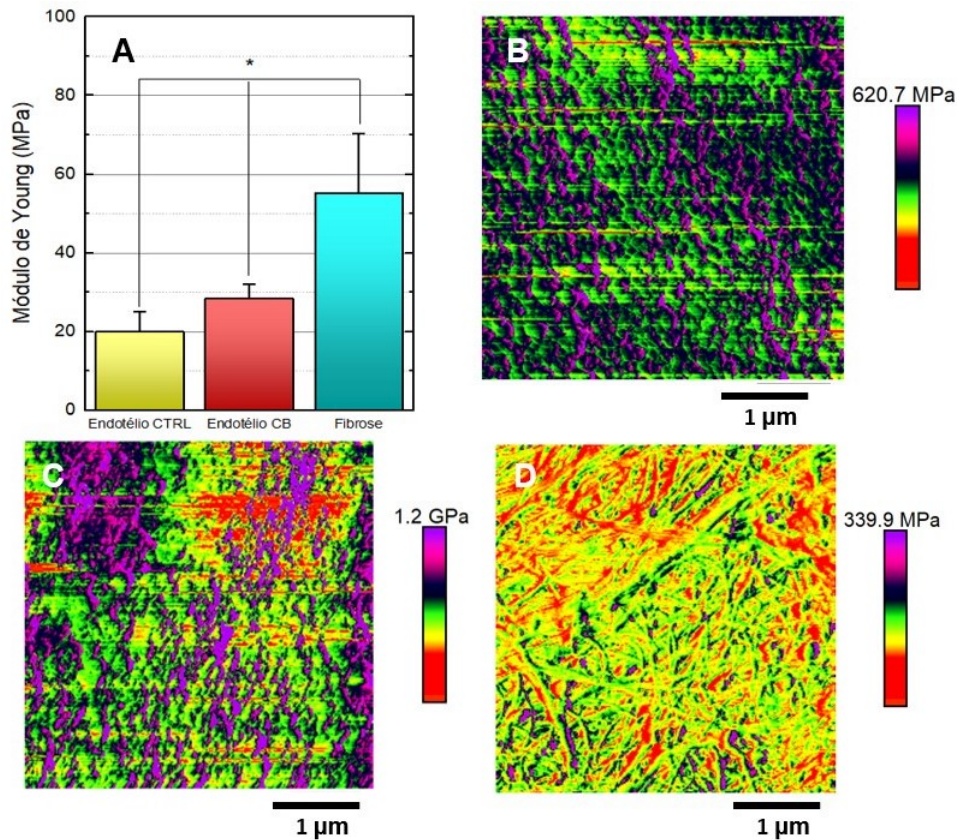
Figura 20 – Gráficos de Rugosidade (A-C) comparando a superfície controle (B) e doente (D) da superfície endotelial posterior. No gráfico controle, há presença de uniformidade nos picos presentes mostrando boa distribuição das estruturas. Mas no gráfico patológico há perda dessas informações mostrando a progressão da doença como disfunção endotelial



ponta do AFM, uma tensão, uma célula endotelial saudável precisa possuir um módulo de elasticidade tal qual que favoreça uma deformação maior. Assim, antes de iniciar a mudança na forma hexagonal, as células endoteliais aparentam possuir menor módulo de Young. Com a presença da patologia e lesões causadas no tecido ocular, as células deformam-se até atingirem seu objeto de tapar vazios na monocamada endotelial. Pelo gráfico presente na Figura 21A, o grupo patológico possui um módulo de elasticidade maior em comparada com o grupo controle. Logo, pelo mesmo raciocínio, com o módulo maior em relação ao controle, as células endoteliais já pleomórficas apresentam uma resistência maior para sofrerem ainda mais deformações. Isso pode exibir um certo limite para o tanto que uma célula endotelial pode esticar para cobrir as vacâncias deixadas pela CB. Possuindo esse limite de deformação, devido ao maior módulo de elasticidade, existem vazios em que monocamada endotelial não consegue cobrir entrando em ação a camada de fibrose para cumprir com esse papel. As fibras de colágeno da fibrose compõem uma matriz extracelular com módulo de elasticidade maior, distanciando-se ainda mais do caráter saudável da monocamada endotelial.

Como as interações entre ponta e amostra ocorrem em condições de umidade mínima, 42%, há uma baixa influência das forças do menisco nas forças adesivas (BUTT; CAPPELLA; KAPPL, 2005). Para materiais biológicos realizados ao ar e em condições

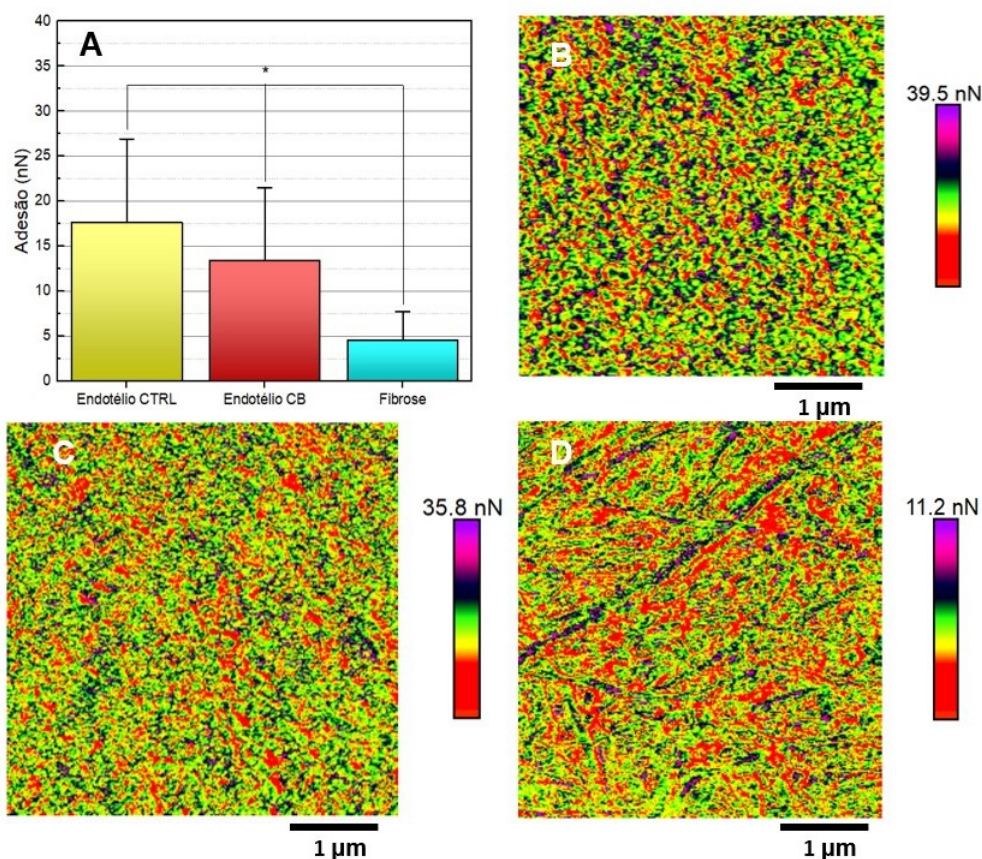
Figura 21 – Dados quantitativos do Módulo de Young da superfície endotelial posterior (A). Podemos comparar os grupos controle (B), patológico (C) e fibrose (D) evidenciando maiores resistências a deformações das células endoteliais da córnea com o avanço da patologia. Todos os dados possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$



de baixa umidade, a dissipação de carga é ineficaz, corroborando a maior influência das forças eletrostáticas e de van der Waals. Com isso em mente, podemos nos ater ao detalhe de que a monocamada endotelial é portadora de sítio de bombas iônicas cruciais para a deturgência da córnea, hidratando-a e deixando estável o tecido, equilibrando a difusão passiva pelo processo de bombeamento e vazamento. Por ser de maior influência as forças eletrostáticas e van der Waals, o endotélio controle possui maiores valores de adesão em comparação aos outros grupos como mostra a Figura 22A.

Nas forças adesivas, para cada grupo, os valores médios  $\pm$  DP são:  $17.7 \pm 6.03$  endotélio CTRL,  $12.28 \pm 4.4$  nN para endotélio CB e  $4.82 \pm 1.94$  nN para fibrose. As células endoteliais possuem reticulação endoplasmática lisa (THOMASY et al., 2014) que armazena íons necessários para ocorrer naturalmente o processo de hidratação da córnea, elevando o valor nas forças de adesão medidas pelo AFM. Devido à degradação da monocamada endotelial durante o avanço da patologia, é lógica a perda do armazenamento dos íons, já que o endotélio é portador de bombas iônicas. Consequentemente a córnea não consegue mais controlar o processo de gradientes eletro osmóticos locais para puxar o fluido do humor aquoso de volta para a parte posterior da córnea, inchando a camada

Figura 22 – Dados quantitativos das forças de Adesão no endotélio. Podemos comparar (A) os grupos controle, patológico e fibrose e observar a diminuição das forças adesivas devido à falta de íons característicos da monocamada endotelial, principalmente na camada de fibrose (B). As forças adesivas possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .



estroma, enrijecendo a córnea devido ao edema e originando a perda da acuidade visual, uma vez que a organização das fibrilas de colágeno do estroma perderam sua organização que permite a visão (DIAS et al., 2015). Resumindo, devido à CB ocorre a diminuição das forças adesivas mostradas no gráfico da Figura 22A no grupo patológico e principalmente de fibrose, uma vez que já há a inexistência de membrana celular endotelial, mas de fibrose, como indica o mapa com valores baixos de adesão na Figura 22B. Outra relação que podemos proceder é sobre as possíveis nanovilosidades argumentadas na Figura 20, pois as mesmas possuem cadeias polissacarídicas de proteoglicanos que ficam escassas com a degeneração da camada endotelial diminuindo sua adesão<sup>2</sup> (LYDATAKI et al., 2003b).

### 4.3 Avaliação Ultraestrutural do Epitélio.

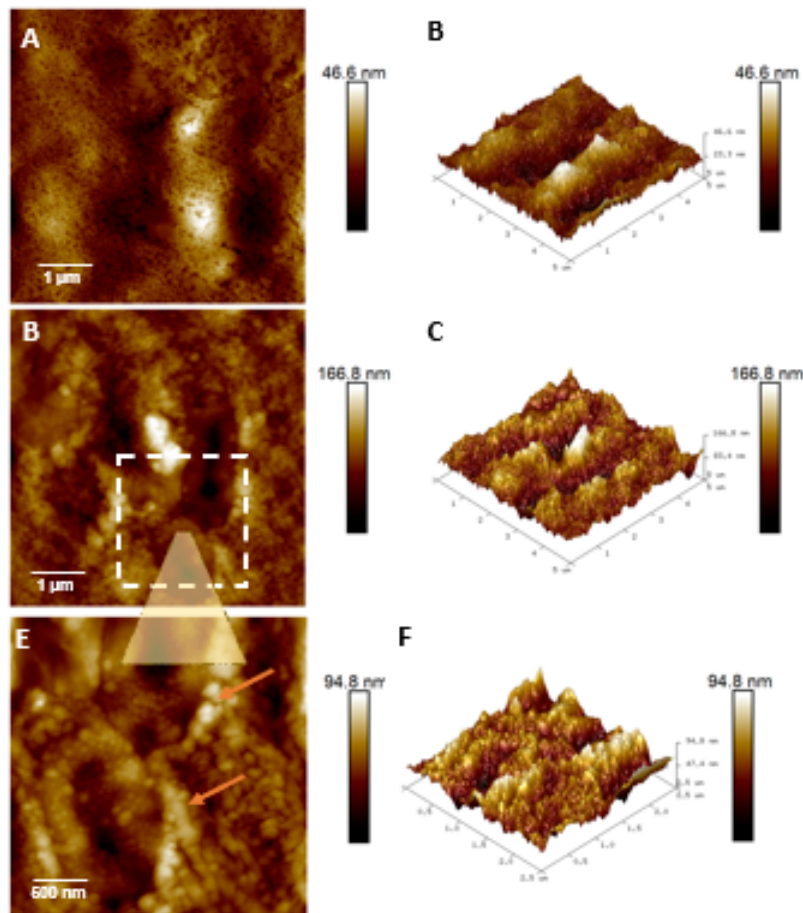
O epitélio precisa ter uniformidade devido a sua grande influência na refração da luz. Devido a sua relação simbiótica com o filme lacrimal, obtendo nutrientes, a membrana

<sup>2</sup> macromoléculas com alto teor negativo



celular epitelial possui numerosas nanovilosidades e micropilacas que secretam glicocálices que aumentam a área superficial entrando em contato direto com expressões de mucinas (MUC4 e MUC16) (RATES et al., 2022)(GOEDERT, 2019).

Figura 23 – Mapas topográficos  $5 \mu\text{m}^2$  da superfície epitelial controle bidimensional (A) e tridimensional (B) em comparação com patológico bidimensional (C) e tridimensional (D). Devido à instabilidade da camada epitelial, estruturas semelhantes a crateras são frequentemente observadas em varreduras de  $1 \mu\text{m}^2$  na superfície epitelial (E-F).



Quadrantes da córnea foram utilizados para análise do epitélio anterior. Mapas topográficos 2D e 3D controle podem ser visualizados na Figura 23A e 23B, respectivamente. Podemos observar as vilosidades características das células superficiais do epitélio. A glicoproteína mucina é um importante agente inibidor à sua capacidade de formar géis que bloqueiam o filme lacrimal, preenchendo irregularidades na superfície epitelial e aumentando a adesão do filme lacrimal e, por tanto, deixando a superfície uniforme (RATES et al., 2022)(GOEDERT, 2019).

As Figuras 23A e 23C mostram mapas topográficos controle e patológico, respectivamente, de  $5 \mu\text{m}^2$  evidenciando os danos causados pela CB. Devido às bolhas no epitélio, ocorre a perda das nanovilosidades e conseqüentemente perda da uniformidade da camada (ver Figura 23C). Por efeito desta, a manutenção do menisco lacrimal para a saúde do epitélio é



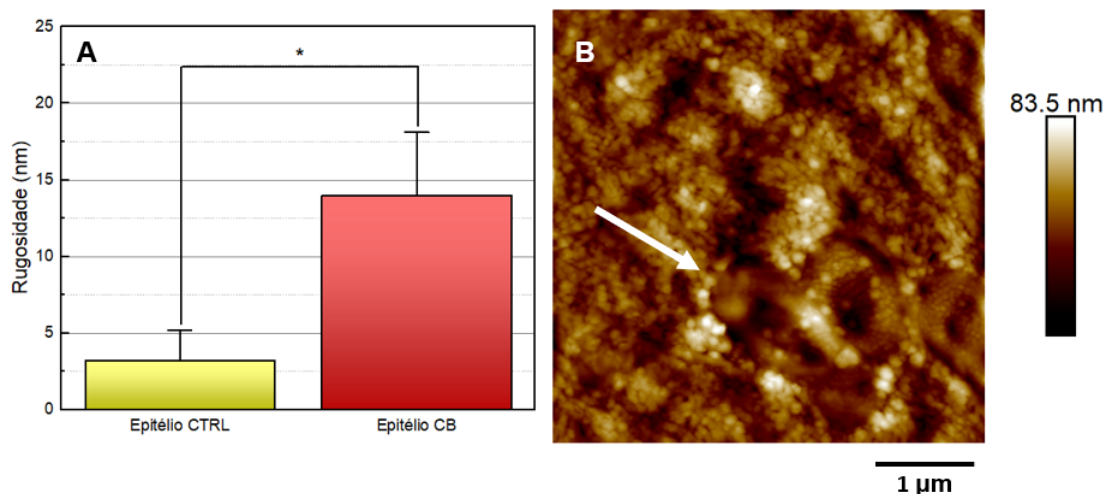
comprometida. A perda das nanovilosidades leva ao comprometimento das glicoproteínas, perdendo um fator fundamental de manutenção e proteção para o ambiente externo das terminações nervosas e camadas da córnea como estroma e Bowman, causando dor e deixando o ambiente propício para infecções (UCHINO, 2018). Não somente isso, como a retenção do filme lacrimal fica comprometido, o líquido presente é liberado mais facilmente pelos olhos acarretando lacrimejamento excessivo, um dos sintomas da CB.

Crateras presentes em mapas topográficos (sets laranjas na Figura 23E) podem apresentar instabilidade e degeneração na camada epitelial, pois Abrams et al. mostram as mesmas estruturas relacionando-as com a estabilidade do fluido lacrimal, tendo diâmetros de 1,4-2,6  $\mu\text{m}$  (ABRAMS et al., 2000). Neste estudo, obtivemos diâmetros  $1,63 \pm 0,24 \mu\text{m}$  das crateras presentes nos mapas topográficos, na faixa de comprimento reportado na literatura.

#### 4.4 Avaliação das Propriedades Nano mecânicas do Epitélio.

A CB se caracteriza por ser uma patologia que atinge principalmente a camada endotelial (GONÇALVES et al., 2008a). Porém, já sabemos que efeitos macroscópicos são vistos no epitélio devido às bolhas causadas pela doença. Sendo assim, as alterações biofísicas dessa camada é tão relevante quanto qualquer outra no estudo da CB. Através dos mapas topográficos obtidos pelo AFM, pôde-se gerar gráficos da rugosidade de cada grupo com os dados quantitativos dos mesmos, como mostra a Figura 24A.

Figura 24 – Dados quantitativos de rugosidade da camada epitelial. Podemos comparar a rugosidade (A) entre os dois grupos: controle e patológico. O avanço da patologia gera estruturas semelhantes a crateras (B) em mapas topográficos de  $5 \mu\text{m}^2$ , indicando a instabilidade do epitélio, como indica a seta branca. Dados de rugosidade possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .



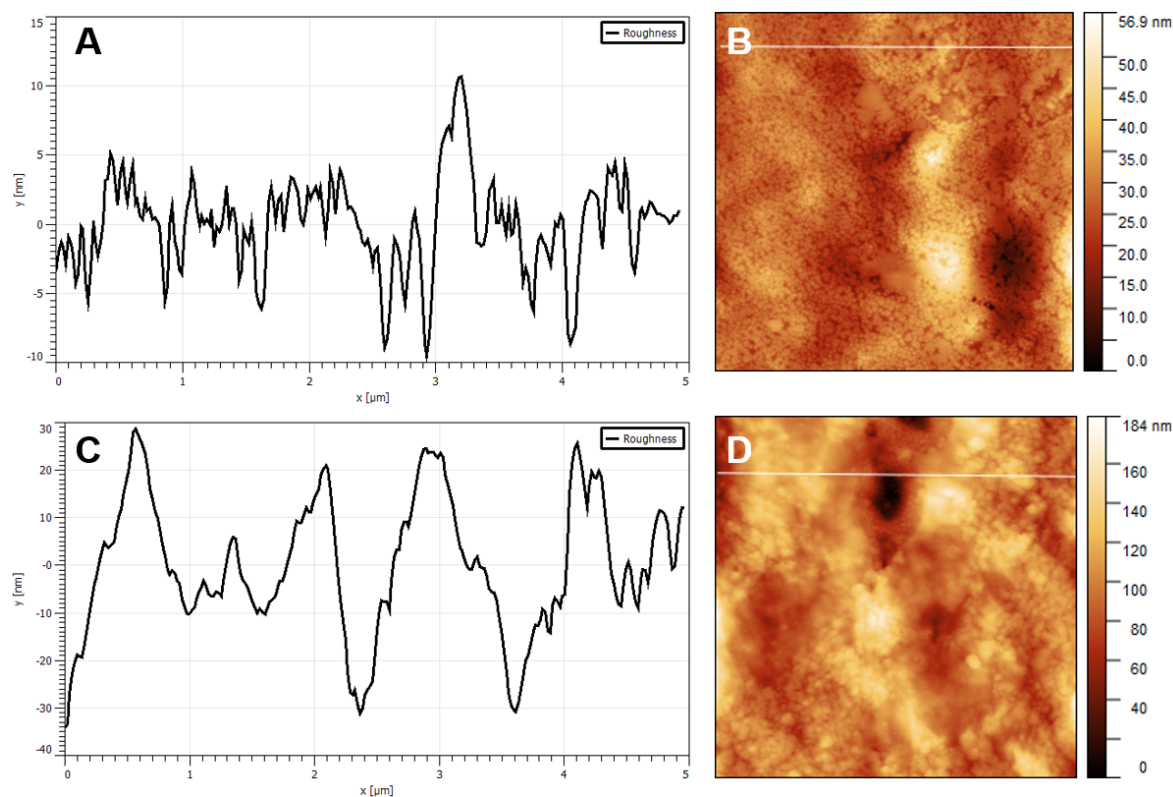
Os valores médios  $\pm$  DP são  $3,2 \pm 0,83$  nm para epitélio CTRL e  $14 \pm 4,43$  para

epitélio CB. A formação de bolhas degenera a camada mais externa da córnea prejudicando principalmente as células superficiais. A diminuição nos valores de rugosidade mostra que além de ocorrer a exfoliação da camada epitelial, também expõem cada vez mais as outras células epiteliais abaixo formando na grande variação de picos e vales (KULIKOV et al., 2020). Podemos ver melhor essa degeneração na Figura 24B com as crateras indicada pela seta branca. Como as células epiteliais superficiais não conseguem realizar mitose, restam as células basais assim o fazer para ocorrer a diferenciação e então renovação da camada epitelial em resposta aos danos causados pela doença. Porém, enquanto renova a superfície epitelial, a mesma enfraquece a sua adesão com as camadas mais internas. A formação de bolhas pode está associado a falta de proteínas adesivas da matriz extracelular, como fibronectina e laminina. Eagle e colaboradores sugerem que as bolhas causadas pela CB são devido à deformação na membrana basal graças a perda das ligações das células epiteliais com a membrana basal, gerando rompimento dos filamentos e ancoragem levando ao desprendimento do epitélio (TORRICELLI et al., 2013)(JR; LAIBSON; ARENTSEN, 1989). Além disso, há também um aumento de concentração da glicoproteína tenascina na membrana basal do epitélio, levando a um agente antiadesivo corroborando ainda mais com os casos de desprendimento do epitélio com as demais camadas(LJUBIMOV et al., 1996b).

Traçando um gráfico da rugosidade da superfície epitelial controle e doente, conforme mostrado na Figura 25, fica evidente que a exfoliação da camada epitelial provoca degradação das nanovilosidades. Na Figura 25A podemos ver distribuição uniforme dos picos associados a nanovilosidades, quando traçamos uma linha horizontal no mapa topográfico da Figura 25B. No mais, a CB apresenta uma superfície do epitélio anormal deixando violações nos glicocálices (LIU et al., 2012b) indicando perda das nanoprojeções como mostra o gráfico de rugosidade quando traçamos uma linha horizontal no mapa topográfico do epitélio doente, como mostram as Figuras 25C e 25D respectivamente.

Com a perda de nanovilosidades, ocorre diminuição da glicoproteína mucina por expressões oculares, tais como MUC4 e MUC16 (GLASGOW; GASIMOV; CASEY, 2009b). A glicoproteína mucina é um importante agente inibitório com a sua capacidade na formação de géis que barra o filme lacrimal preenchendo as irregularidades na superfície epitelial aumentando a aderência entre o filme lacrimal e a porção externa da membrana celular. O filme lacrimal preenche as irregularidades em sua superfície, tornando-a lisa e uniforme para uma boa refração da luz (GOZZO, 2009). Com isso em mente, a CB impede a formação de géis necessários para conter o filme lacrimal, deixando-o instável e o epitélio não uniforme para refração da luz contribuindo para a perda da acuidade visual. É definido que o epitélio possui as características de ser estratificado, escamoso e não queratinizado. Graças à rugosidade, podemos ver como a parte estratificada escamosa do epitélio é afetada expondo as células epiteliais sobrepostas mais internas. A não queratinização do epitélio é importante para a camada, por ser uma característica de tecidos em contato com ambientes

Figura 25 – Gráficos de Rugosidade (A-C) comparando a superfície epitelial controle (B) e doente (D). No gráfico controle, ocorre uniformidade nos picos presentes mostrando presença de nanovilosidades, diferindo do patológico

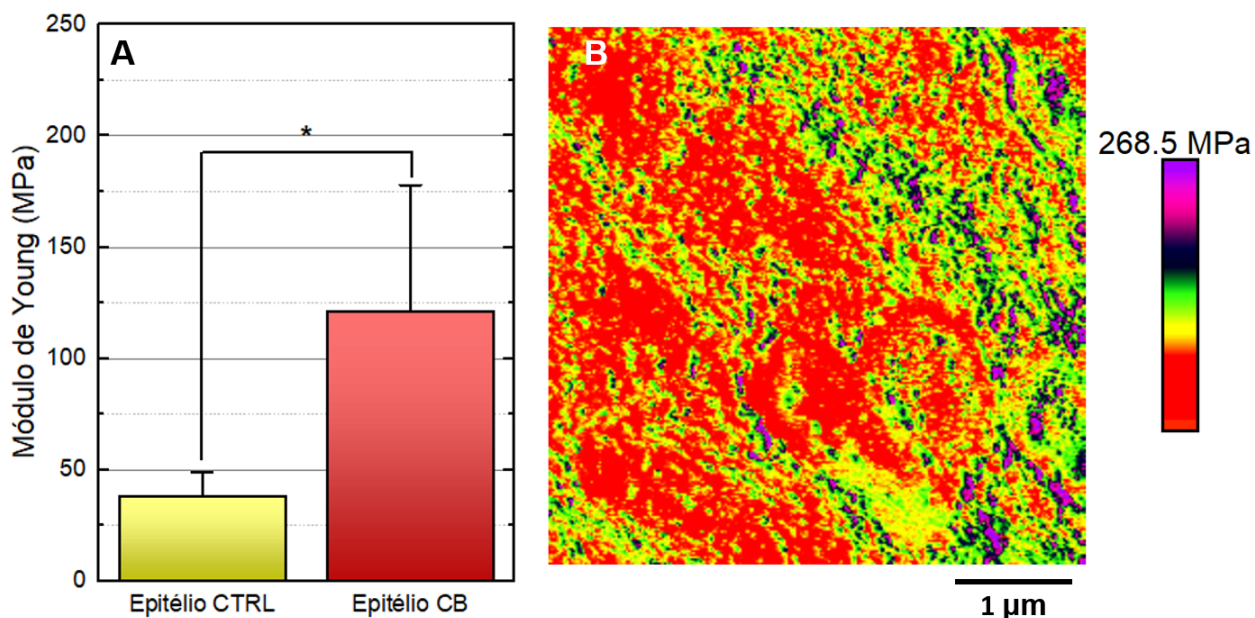


úmidos, tal qual é o contato com o filme lacrimal, além de ser um das razões que protege o tecido ao meio externo e a exposição a fricção física externa (ARGUESO et al., 2021).

O acúmulo de fluidos no estroma devido à perda das células endoteliais afetam diretamente o epitélio além da formação de bolhas. O epitélio possui a função, dentre várias outras, de controlar o inchaço do estroma (MA et al., 2018). A avaliação do quão é perceptível esse controle do epitélio dado o sintoma de edema corneano da CB é através do módulo de Young do epitélio. A Figura 26A mostra a comparação entre os valores do módulo de elasticidade entre os grupos controle e patológicos com valores médios e  $\pm$  DP de  $38,24 \pm 5,45$  MPa e  $121,18 \pm 6,24$  MPa, respectivamente.

É evidente o aumento do módulo de elasticidade do grupo doente chegando perto de um aumento de 3 vezes mais o valor do controle. Elsheikh e colaboradores discutiram a influência do epitélio no estresse e pressão da córnea e concluíram que a córnea com a sua camada mais externa possui maior deformação em comparação com a córnea sem o epitélio, dada uma mesma pressão (ELSHEIKH; ALHASSO; RAMA, 2008). Isso significa que dada uma mesma tensão, córneas com maiores deformações apresentam epitélio com módulo de elasticidade mais baixos enquanto córneas com módulo maiores possuem valores maiores. A córnea controle possui menor tensão, pois o estroma é saudável o suficiente para não deformar a córnea. No entanto, a tensão aumenta quando a CB causa edema corneano

Figura 26 – Dados quantitativos do módulo de Young do epitélio. Podemos comparar (A) controle e patológico observando o aumento do módulo de elasticidade. O mapa do módulo de elasticidade da superfície do epitélio mostra visualmente o aumento na resistência em resposta ao edema estromal. Dados possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .



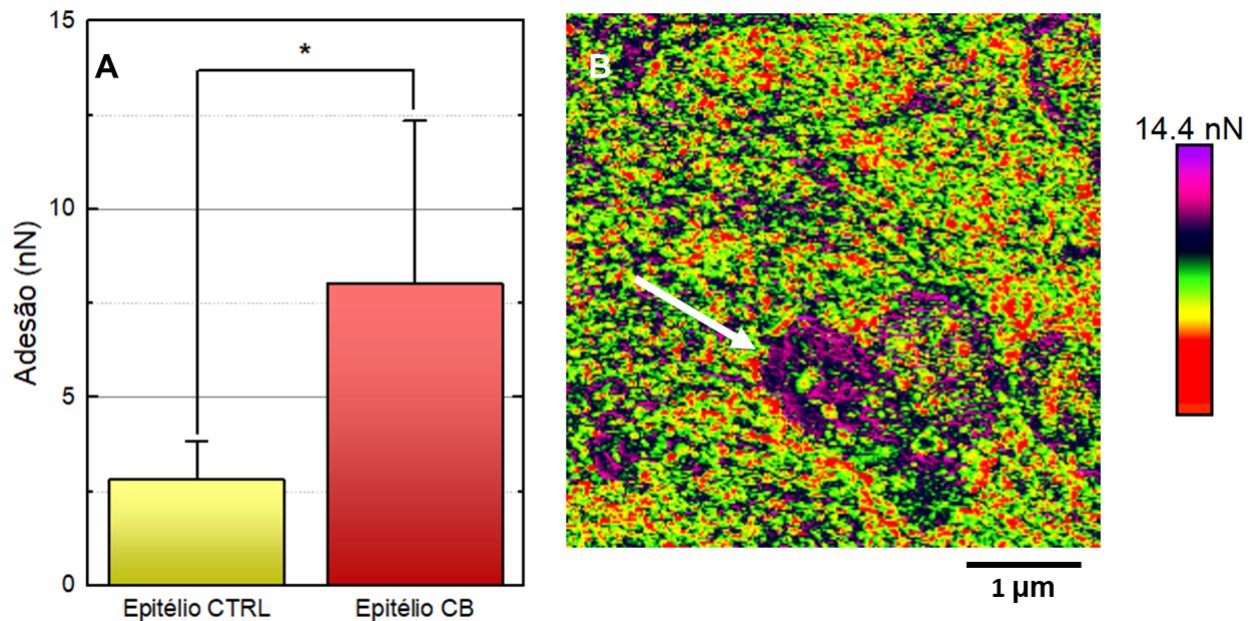
por conta da perda de células endoteliais. Com o inchaço na córnea, o estresse aumenta devido à tensão sentida pelo tecido deformando-a até chegar em um ponto característico de córnea espessa. Para impedir ainda mais a mudança no formato da córnea, o epitélio tenta controlar o inchaço do estroma aumentando seu módulo de Young, como podemos constatar no mapa representativo da Figura 26B. O módulo de elasticidade possui a ideia de resistir a deformações elásticas provocadas em um corpo (MA et al., 2018). Logo, é visivelmente justificável o aumento dessa grandeza física de CB, uma vez que a própria córnea tende a inibir ainda mais a perda de seu formato com o edema provocado. Além disso, nanovilosidades podem atuar como amortecedores influenciando os valores do módulo de Young, onde para o controle precisa ser menor para exercer tal função (??)

É fundamentalmente necessário que o epitélio cumpra com seu papel de barreira protetora, uma vez que é a camada mais externa da córnea em contato com o meio externo. É possível avaliar esta característica por meio das forças adesivas obtidas pelos mapas de AFM. Podemos observar na Figura 27 como as forças adesivas se comportam na córnea. No gráfico da Figura 27A, pode-se perceber claramente no aumento das forças adesivas, obtendo valores médios de cada grupo controle e patológico de  $2,84 \pm 0,63$  nN e  $7,82 \pm 2,02$  nN, respectivamente. O epitélio da córnea é compacto com condutância iônica baixa (EHLERS; HJORTDAL, 2005). Isso é importante, uma vez que isso garante a camada uma não interação com agentes presentes no meio externo para não ocorrer nenhuma infecção



ou outros problemas na córnea para o meio intracelular.

Figura 27 – Comparação (A) entre as forças adesivas entre o epitélio controle e patológico observando o aumento no acúmulo de cargas na superfície doente. A seta branca na Figura (B) em mapas de adesão patológicos de  $5 \mu\text{m}^2$  indica que feridas epiteliais apresentam uma concentração de íons. Algo natural no processo de cicatrização do epitélio. Dados possuem diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .



A córnea pode ser considerada como um tecido presente entre duas câmaras de fluidos, filme lacrimal e humor aquoso, gerado um potencial transepitelial (EHLERS; HJORTDAL, 2005). Esse potencial faz com que ocorra transporte epitelial de sódio para dentro da córnea e transporte de cloreto para fora. O sódio consegue entrar nas células superficiais mediante canais iônicos na superfície celular sendo expulso para o interior do tecido pelas enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ . A resistência transepitelial é de cerca de  $250.000 \Omega/\text{cm}$  (ZHAO et al., 2012) devido às junções estreitas entre as células superficiais, tornando o epitélio resistente a estímulos elétricos quaisquer. Com isso em mente, e dada as circunstâncias em que o experimento foi feito tendo apenas a contribuição das forças de van der Waals e eletrostáticas nas forças adesivas, podemos entender o baixo valor de adesão apresentado no gráfico da Figura 27A. Com a CB, o transporte de íons no epitélio é conflitante. Em condições normais, o potencial transepitelial é mantido, os espaços intercelulares são equipotenciais com o estroma, garantindo o transporte de íons do epitélio até o estroma. Mas com a patologia tal qual a CB, pode ser viável a diminuição da resistividade elétrica da camada promovendo ainda mais estímulos e interações elétricas entre os íons presentes na córnea e com agentes do meio externo perdendo sua função de proteção, ocasionando em

possíveis infecções. Primeiro, podemos associar o aumento das forças adesivas um acúmulo de  $\text{Ca}^+$ -ATPase devido o processo natural de cicatrização do epitélio diferenciando as células basais para a renovação das células superficiais (HAO; BARO; SAENZ, 1991), como mostra a seta branca na Figura 27B indicando maior valor de adesão na região das crateras. Segundo, os pacientes que possuem a CB apresentando normalmente um estado clínico de lacrimejo (ESPANA et al., 2003)(PRICOPIE et al., 2017). Isso pode indicar ainda mais íons de cloreto saindo de dentro das células para jogando água para fora enquanto íons de sódio também entram na córnea com mais frequência, originando assim nas lágrimas excessivas. Assim, podemos observar que a degeneração do epitélio afeta também os processos elétricos afetando as funcionalidades da camada na totalidade. Tais resultados aqui apresentados exprimem as grandes alterações físicas provocadas com o avanço da patologia. Estas mudanças resultam em efeitos em nanoescala das camadas da córnea gerando os sintomas macroscópicos característicos da doença.

## 5 Conclusões de Perspectivas

A física é a mais fundamental e abrangente das ciências. Estudar detalhadamente seres vivos é equivalente a observar processos físicos ali presentes. Sendo um campo tão vasto, os sistemas biológicos são complexos demais para desvendar apenas com conceitos da própria biologia, tal qual é o funcionamento da visão. A córnea é um tecido ocular extremamente importante, pois a mesma atua como lente para a luz que incide nos olhos, focalizando-a na retina e gerando imagens. Investigar a córnea com um posicionamento físico é convenientemente justificável, uma vez que suas propriedades biofísicas são o que faz o sentido da visão ser possível.

A camada epitelial e endotelial apresentam uniformidade em sua porção anterior e posterior, respectivamente. Individualmente, cada uma das duas camadas da córnea possuem propriedades fundamentais para o mecanismo da córnea. O endotélio precisa ser deformável o suficiente para sua monocamada endotelial poder preencher lacunas deixadas pela perda anual de células endoteliais, assim como sua atividade elétrica, devido seus sítios de bombas iônicas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , que ajudam na hidratação da córnea regulando a pressão intraocular oriunda do humor aquoso. O epitélio é estratificado, escamoso e não queratinizado. O mesmo apresenta mecanismos interessantes quanto a sua reavilitação diferenciando um de seus três tipos de células, além de ser uma barreira de proteção da córnea contra o ambiente externo. A CB é um distúrbio endotelial envolvendo a perda da densidade de células endoteliais. Com tal perda, a córnea apresenta-se instável a ponto de não realizar suas funções de forma completamente eficaz. Assim, podemos associar os sintomas causados pela doença com a alteração das propriedades físicas da córnea.

A física é de grande importância para tais questões biológicas devido a sua vantagem de oferecer técnicas experimentais. A AFM demonstra um potencial enorme no estudo de sistemas biológicos. No presente estudo, pôde-se comparar amostras de doadores saudáveis com amostras de córneas doentes portadoras de CB, utilizando da técnica de AFM. A grande vantagem da utilização do AFM é sua alta resolução, fácil preparação das amostras, acesso a mapas tridimensionais e obtenção de dados quantitativos das propriedades físicas da amostra. Sendo assim, foi possível observar as mudanças da camada endotelial e epitelial provocadas pela doença no que se diz respeito a sua ultraestrutura e biomecânica.

Através da análise ultraestrutural, foi possível observar a degradação das camadas epitelial e endotelial portadoras de CB. A primeira apresentando crateras características e a segunda com perda de sua parede celular, apresentando espaçamentos em sua membrana celular no processo de esticamento das células endoteliais. Os dados de rugosidade fortalecem as hipóteses de degradação apresentando valores mais elevados para os grupos

patológicos em comparação aos saudáveis. Fora as possibilidades das nanovilosidades da porção anterior do epitélio e posterior do endotélio terem suas vilosidades degeneradas devido à degradação destas mesmas camadas. Além disso, a análise estrutural mostrou a existência de uma “camada extra” de fibras colágeno entre o endotélio e Descemet, devido à fibrose causada pelas lesões endoteliais. Dados de volume e área foram dados físicos importantes para entendermos melhor o comportamento do citoesqueleto das células endoteliais associado com as fibrilas da F-actina.

O módulo de Young forneceu ideias interessantes sobre o comportamento da córnea quando ocorre o avanço da patologia. Conforme a doença progride, a parede endotelial encontra-se com vacâncias e o inchaço da córnea aumenta. Para controlar este problema, o endotélio modifica suas células endoteliais deformando-as mudando sua forma hexagonal assimétrica para uma forma pleomórfica. Porém, uma célula endotelial não consegue se deformar continuamente, apresentando um limite de deformação devido ao aumento do módulo de Young. Ainda com vacâncias para preencher, a membrana de Descemet diferencia uma porção de fibrose na tentativa de cobrir o que falta dos vazios deixados pela doença. Enquanto tudo isso, o epitélio deixa de ser não queratinizado, enrijecendo-se, possuindo módulo de elasticidade maior para controlar o inchaço do estroma evitando a ainda mais a mudança do formato da córnea.

As forças adesivas foram importantes no estudo da patologia. Devido à metodologia do trabalho, podemos associar as forças adesivas apenas as parcelas de van der Waals e eletroestáticas. No endotélio, a adesão comprova a perda de sítios iônicos essenciais para a regularização do tecido corneano, além das perdas de cadeias de proteoglicanos presentes nas possíveis nanovilosidades na porção posterior do endotélio. Para o epitélio anterior, a adesão se mostrou fundamental para entender a maior permeabilidade do epitélio, perdendo progressivamente sua função protetora, possivelmente diminuindo sua resistividade elétrica. O acúmulo dos íons  $\text{Ca}^+$ -ATPase em feridas epiteliais, principalmente em crateras, para auxiliar no processo de reabilitação de esta camada, aumenta as forças adesivas, indicando a grande degradação da camada epitelial, além de afetar o transporte de íons de cloreto e de sódio importantes para o processo físico-químico da camada.

Tais resultados aqui podem ser fundamentais para entender melhor a CB no que se diz respeito as mudanças físicas provocadas pela patologia. O estudo detalhado da ultraestrutura e biomecânica aqui apresentado pode ajudar ou em novas interpretações, ou até mesmo fortalecer dados já presentes no âmbito acadêmico.



## Referências

- ABRAMS, G.; SCHAUS, S.; GOODMAN, S.; NEALEY, P.; MURPHY, C. Nanoscale topography of the corneal epithelial basement membrane and descemet's membrane of the human. *Cornea*, LWW, v. 19, n. 1, p. 57–64, 2000. Citado na página 60.
- ADAMS, J. Bonding energy models. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, p. 763–767, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.
- AL-AQABA, M.; ALOMAR, T.; LOWE, J.; DUA, H. S. Corneal nerve aberrations in bullous keratopathy. *American journal of ophthalmology*, Elsevier, v. 151, n. 5, p. 840–849, 2011. Citado na página 14.
- ALBUQUERQUE, L.; PIGATTO, J. A. T.; FREITAS, L. V. d. R. P. Análise do endotélio da cornea de galinhas utilizando à microscopia especular de contato. *Semina: Ciências Agrárias*, Universidade Estadual de Londrina, 2015. Citado 3 vezes nas páginas 21, 51 e 55.
- ALENCAR, L. M. R. Estudo morfológico e das propriedades elásticas de plaquetas humanas por microscopia de força atômica. 2007. Citado na página 38.
- ALENCAR, L. M. R. Estudo da viscoelasticidade de células de câncer renal por microscopia de força atômica. 2010. Citado na página 40.
- AMORIM, M. d. S. d. N.; BATISTA, J. A.; JUNIOR, F. M.; FONTES, A.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; ALENCAR, L. M. R. New insights into hemolytic anemias: Ultrastructural and nanomechanical investigation of red blood cells showed early morphological changes. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, American Scientific Publishers, v. 18, n. 2, p. 405–421, 2022. Citado na página 50.
- ARGUESO, P.; WOODWARD, A. M.; FEELEY, M. N.; RINALDI, J. Cd147 contributes to maintain a nonkeratinized squamous epithelium in cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 62, n. 8, p. 849–849, 2021. Citado na página 62.
- BEATO, J. N.; ESTEVES-LEANDRO, J.; REIS, D.; FALCÃO, M.; ROSAS, V.; CARNEIRO, Â.; REIS, F. F. Corneal structure and endothelial morphological changes after uneventful phacoemulsification in type 2 diabetic and nondiabetic patients. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, SciELO Brasil, v. 84, p. 454–461, 2021. Citado na página 55.
- BELIKOV, S.; ALEXANDER, J.; WALL, C.; YERMOLENKO, I.; MAGONOV, S.; MALOVICHKO, I. Thermal tune method for afm oscillatory resonant imaging in air and liquid. In: IEEE. *2014 American Control Conference*. [S.l.], 2014. p. 1009–1014. Citado na página 47.
- BELLITTO, V. *Atomic force microscopy: imaging, measuring and manipulating surfaces at the atomic scale*. [S.l.]: BoD–Books on Demand, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.

BELLITTO, V. *Atomic force microscopy: imaging, measuring and manipulating surfaces at the atomic scale*. [S.l.]: BoD–Books on Demand, 2012. Citado na página 38.

BOGERD, B. Van den; DHUBHGHAILL, S. N.; KOPPEN, C.; TASSIGNON, M.-J.; ZAKARIA, N. A review of the evidence for in vivo corneal endothelial regeneration. *Survey of ophthalmology*, Elsevier, v. 63, n. 2, p. 149–165, 2018. Citado 4 vezes nas páginas 20, 21, 22 e 23.

BRAGA, P. C.; RICCI, D. *Atomic force microscopy: biomedical methods and applications*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2008. v. 242. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 27.

BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface science reports*, Elsevier, v. 59, n. 1-6, p. 1–152, 2005. Citado na página 56.

BUTT, H.-J.; KAPPL, M. Normal capillary forces. *Advances in colloid and interface science*, Elsevier, v. 146, n. 1-2, p. 48–60, 2009. Citado na página 33.

CAPPELLA, B.; DIETLER, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface science reports*, Elsevier, v. 34, n. 1-3, p. 1–104, 1999. Citado na página 38.

CHAN, S. W. S.; YUCEL, Y.; GUPTA, N. New trends in corneal transplants at the university of toronto. *Canadian Journal of Ophthalmology*, Elsevier, v. 53, n. 6, p. 580–587, 2018. Citado na página 14.

COHEN, S. H.; LIGHTBODY, M. L.; BRAY, M. T. *Atomic force microscopy/scanning tunneling microscopy*. [S.l.]: Springer, 1997. Citado na página 34.

CRUZ, J.; SOUSA, T.; CAVALHEIRO, A.; PEQUENO, A.; ROMÃO, B.; COITO, C. Análise da rugosidade de superfície e da microdureza de 6 resinas compostas. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, Elsevier, v. 57, n. 1, p. 38–45, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.

DELMONTE, D. W.; KIM, T. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, Elsevier, v. 37, n. 3, p. 588–598, 2011. Citado 4 vezes nas páginas 13, 16, 18 e 19.

DIAS, J.; DIAKONIS, V. F.; LORENZO, M.; GONZALEZ, F.; PORRAS, K.; DOUGLAS, S.; AVILA, M.; YOO, S. H.; ZIEBARTH, N. M. Corneal stromal elasticity and viscoelasticity assessed by atomic force microscopy after different cross linking protocols. *Experimental eye research*, Elsevier, v. 138, p. 1–5, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 58.

DUA, H. S.; FREITAS, R.; MOHAMMED, I.; TING, D. S.; SAID, D. G. The pre-descemet's layer (dua's layer, also known as the dua-fine layer and the pre-posterior limiting lamina layer): Discovery, characterisation, clinical and surgical applications, and the controversy. *Progress in Retinal and Eye Research*, Elsevier, p. 101161, 2023. Citado na página 17.

DUNKER, S. L.; ARMITAGE, W. J.; ARMITAGE, M.; BROCATO, L.; FIGUEIREDO, F. C.; HEEMSKERK, M. B.; HJORTDAL, J.; JONES, G. L.; KONIJN, C.; NUIJTS, R. M. et al. Practice patterns of corneal transplantation in europe: first report by the

- European cornea and cell transplantation registry. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, LWW, v. 47, n. 7, p. 865–869, 2021. Citado na página 14.
- EGHRARI, A. O.; RIAZUDDIN, S. A.; GOTTSCH, J. D. Overview of the cornea: structure, function, and development. *Progress in molecular biology and translational science*, Elsevier, v. 134, p. 7–23, 2015. Citado na página 18.
- EHLERS, N.; HJORTDAL, J. The cornea: epithelium and stroma. *Advances in organ biology*, Elsevier, v. 10, p. 83–111, 2005. Citado 4 vezes nas páginas 18, 19, 63 e 64.
- ELSHEIKH, A.; ALHASSO, D.; RAMA, P. Assessment of the epithelium's contribution to corneal biomechanics. *Experimental eye research*, Elsevier, v. 86, n. 2, p. 445–451, 2008. Citado na página 62.
- ESPANA, E. M.; GRUETERICH, M.; SANDOVAL, H.; SOLOMON, A.; ALFONSO, E.; KARP, C. L.; FANTES, F.; TSENG, S. C. Amniotic membrane transplantation for bullous keratopathy in eyes with poor visual potential. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, Elsevier, v. 29, n. 2, p. 279–284, 2003. Citado na página 65.
- FEIZI, S.; JAFARINASAB, M. R.; KARIMIAN, F.; HASANPOUR, H.; MASUDI, A. Central and peripheral corneal thickness measurement in normal and keratoconic eyes using three corneal pachymeters. *Journal of ophthalmic & vision research*, Ophthalmic Research Center, v. 9, n. 3, p. 296, 2014. Citado na página 16.
- FEYNMAN, R. P.; LEIGHTON, R. B.; SANDS, M. The feynman lectures on physics; vol. i. *American Journal of Physics*, American Association of Physics Teachers, v. 33, n. 9, p. 750–752, 1965. Citado 4 vezes nas páginas 13, 16, 41 e 55.
- FORRESTER, J. V.; DICK, A. D.; MCMENAMIN, P.; ROBERTS, F.; PEARLMAN, E. *The eye*. [S.l.]: Elsevier, 2021. Citado na página 18.
- FRENCH, R. H. Origins and applications of london dispersion forces and hamaker constants in ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, Wiley Online Library, v. 83, n. 9, p. 2117–2146, 2000. Citado na página 28.
- GIESSIBL, F. J. Advances in atomic force microscopy. *Reviews of modern physics*, APS, v. 75, n. 3, p. 949, 2003. Citado na página 25.
- GLASGOW, B. J.; GASIMOV, O. K.; CASEY, R. C. Exfoliative epitheliopathy of bullous keratopathy with breaches in the muc16 glyocalyx. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 50, n. 9, p. 4060–4064, 2009. Citado na página 24.
- GLASGOW, B. J.; GASIMOV, O. K.; CASEY, R. C. Exfoliative epitheliopathy of bullous keratopathy with breaches in the muc16 glyocalyx. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 50, n. 9, p. 4060–4064, 2009. Citado na página 61.
- GOEDERT, M. E. Estudo descritivo e comparativo da arquitetura de córneas humanas normais no envelhecimento. 2019. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 59.
- GONÇALVES, E. D.; CAMPOS, M.; PARIS, F.; GOMES, J. Á. P.; FARIAS, C. C. d. Bullous keratopathy: etiopathogenesis and treatment. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, SciELO Brasil, v. 71, p. 61–64, 2008. Citado 3 vezes nas páginas 23, 24 e 60.

- GONÇALVES, E. D.; CAMPOS, M.; PARIS, F.; GOMES, J. Á. P.; FARIAS, C. C. d. Ceratopatia bolhosa: etiopatogênese e tratamento. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, SciELO Brasil, v. 71, p. 61–64, 2008. Citado na página 14.
- GONG, Y.; MISTURE, S. T.; GAO, P.; MELLOTT, N. P. Surface roughness measurements using power spectrum density analysis with enhanced spatial correlation length. *The Journal of Physical Chemistry C*, ACS Publications, v. 120, n. 39, p. 22358–22364, 2016. Citado na página 48.
- GOULD, D.; MCLELLAN, G. J. et al. BSAVA manual of canine and feline ophthalmology. *BSAVA manual of canine and feline ophthalmology*, British Small Animal Veterinary Association, n. Ed. 3, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 18.
- GOZZO, F. V. *Caracterização morfológica de tecidos oculares por microscopia de força atômica (MFA)*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 61.
- HAO, H. W.; BARO, A.; SAENZ, J. Electrostatic and contact forces in force microscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena*, American Vacuum Society, v. 9, n. 2, p. 1323–1328, 1991. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 65.
- HELENE, O.; HELENE, A. F. Alguns aspectos da óptica do olho humano. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, SciELO Brasil, v. 33, 2011. Citado na página 16.
- HERRMANN, P. S.; SILVA, M. A. da; F<sup>o</sup>, R. B.; JOB, A. E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. *Polímeros*, SciELO Brasil, v. 7, p. 51–61, 1997. Citado na página 27.
- JEANG, L. J.; MARGO, C. E.; ESPANA, E. M. Diseases of the corneal endothelium. *Experimental eye research*, Elsevier, v. 205, p. 108495, 2021. Citado na página 24.
- JOYCE, N. C. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Experimental eye research*, Elsevier, v. 81, n. 6, p. 629–638, 2005. Citado na página 21.
- JOYCE, N. C. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Experimental eye research*, Elsevier, v. 95, n. 1, p. 16–23, 2012. Citado 3 vezes nas páginas 21, 22 e 23.
- JR, R. C. E.; LAIBSON, P.; ARENTSEN, J. Epithelial abnormalities in chronic corneal edema: a histopathological study. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, American Ophthalmological Society, v. 87, p. 107, 1989. Citado na página 61.
- JUMELLE, C.; HAMRI, A.; EGAUD, G.; MAUCLAIR, C.; REYNAUD, S.; DUMAS, V.; PEREIRA, S.; GARCIN, T.; GAIN, P.; THURET, G. Comparison of four methods of surface roughness assessment of corneal stromal bed after lamellar cutting. *Biomedical optics express*, Optica Publishing Group, v. 8, n. 11, p. 4974–4986, 2017. Citado na página 42.
- KHALILGHARIBI, N.; MAO, Y. To form and function: on the role of basement membrane mechanics in tissue development, homeostasis and disease. *Open Biology*, The Royal Society, v. 11, n. 2, p. 200360, 2021. Citado na página 20.

- KIM, E. K.; GEROSKI, D. H.; HOLLEY, G. P.; URKEN, S. I.; EDELHAUSER, H. F. Corneal endothelial cytoskeletal changes in f-actin with aging, diabetes, and after cytochalasin exposure. *American journal of ophthalmology*, Elsevier, v. 114, n. 3, p. 329–335, 1992. Citado na página 54.
- KITTEL, C.; MCEUEN, P. *Introduction to solid state physics*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 31.
- KULIKOV, A. N.; MALTSEV, D. S.; KUDRYASHOVA, E. V.; BURNASHEVA, M. A. Decreased epithelial to corneal thickness ratio in healthy fellow eyes of patients with unilateral bullous keratopathy. *British Journal of Ophthalmology*, BMJ Publishing Group Ltd, v. 104, n. 2, p. 230–234, 2020. Citado na página 61.
- KWAŚNIEWSKA, A.; ŚWIETLICKI, M.; PRÓSZYŃSKI, A.; GŁADYSZEWSKI, G. The quantitative nanomechanical mapping of starch/kaolin film surfaces by peak force afm. *Polymers*, MDPI, v. 13, n. 2, p. 244, 2021. Citado na página 41.
- LAING, R. A.; SANDSTROM, M. M.; BERROSPI, A. R.; LEIBOWITZ, H. M. Changes in the corneal endothelium as a function of age. *Experimental eye research*, Elsevier, v. 22, n. 6, p. 587–594, 1976. Citado na página 55.
- LAST, J. A.; RUSSELL, P.; NEALEY, P. F.; MURPHY, C. J. The applications of atomic force microscopy to vision science. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 51, n. 12, p. 6083–6094, 2010. Citado na página 14.
- LEDUR, M. Doenças da córnea. Universidade Federal de Santa Maria, 2004. Citado na página 18.
- LEIGHTON, R. B.; SANDS, M. *The Feynman lectures on physics*. [S.l.]: Addison-Wesley Boston, MA, USA, 1965. Citado na página 55.
- LEKKA, M. *Cellular analysis by atomic force microscopy*. [S.l.]: CRC Press, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.
- LIU, T.; XU, Y.; SUN, D.; XIE, L. Histological evaluation of corneal scar formation in pseudophakic bullous keratopathy. *PLoS One*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 7, n. 6, p. e39201, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 24.
- LIU, T.; XU, Y.; SUN, D.; XIE, L. Histological evaluation of corneal scar formation in pseudophakic bullous keratopathy. *PLoS One*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 7, n. 6, p. e39201, 2012. Citado na página 61.
- LJUBIMOV, A. V.; BURGESSON, R. E.; BUTKOWSKI, R. J.; COUCHMAN, J. R.; WU, R. R.; NINOMIYA, Y.; SADO, Y.; MAGUEN, E.; NESBURN, A. B.; KENNEY, M. C. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 37, n. 6, p. 997–1007, 1996. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 24.
- LJUBIMOV, A. V.; BURGESSON, R. E.; BUTKOWSKI, R. J.; COUCHMAN, J. R.; WU, R. R.; NINOMIYA, Y.; SADO, Y.; MAGUEN, E.; NESBURN, A. B.; KENNEY, M. C. Extracellular matrix alterations in human corneas with bullous keratopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 37, n. 6, p. 997–1007, 1996. Citado 2 vezes nas páginas 52 e 61.



LOMBARDO, M.; LOMBARDO, G.; CARBONE, G.; SANTO, M. P. D.; BARBERI, R.; SERRAO, S. Biomechanics of the anterior human corneal tissue investigated with atomic force microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 53, n. 2, p. 1050–1057, 2012. Citado 3 vezes nas páginas 13, 16 e 42.

LOMBARDO, M.; SANTO, M. P. D.; LOMBARDO, G.; BARBERI, R.; SERRAO, S. Atomic force microscopy analysis of normal and photoablated porcine corneas. *Journal of biomechanics*, Elsevier, v. 39, n. 14, p. 2719–2724, 2006. Citado na página 42.

LYDATAKI, S.; LESNIEWSKA, E.; TSILIMBARIS, M.; GRIMELLEC, C. L.; ROCHETTE, L.; GOUDONNET, J.; PALLIKARIS, I. Observation of the posterior endothelial surface of the rabbit cornea using atomic force microscopy. *Cornea*, LWW, v. 22, n. 7, p. 651–664, 2003. Citado 3 vezes nas páginas 21, 51 e 55.

LYDATAKI, S.; LESNIEWSKA, E.; TSILIMBARIS, M.; GRIMELLEC, C. L.; ROCHETTE, L.; GOUDONNET, J.; PALLIKARIS, I. Observation of the posterior endothelial surface of the rabbit cornea using atomic force microscopy. *Cornea*, LWW, v. 22, n. 7, p. 651–664, 2003. Citado na página 58.

LYDATAKI, S.; TSILIMBARIS, M. K.; LESNIEWSKA, E. S.; BRON, A.; PALLIKARIS, I. G. Corneal tissue observed by atomic force microscopy. *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications*, Springer, p. 69–83, 2004. Citado 3 vezes nas páginas 14, 16 e 17.

LYDATAKI, S.; TSILIMBARIS, M. K.; LESNIEWSKA, E. S.; BRON, A.; PALLIKARIS, I. G. Corneal tissue observed by atomic force microscopy. *Atomic Force Microscopy: Biomedical Methods and Applications*, Springer, p. 69–83, 2004. Citado na página 14.

MA, J.; WANG, Y.; WEI, P.; JHANJI, V. Biomechanics and structure of the cornea: implications and association with corneal disorders. *Survey of ophthalmology*, Elsevier, v. 63, n. 6, p. 851–861, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 62 e 63.

MARGENAU, H. Van der waals forces. *Reviews of Modern Physics*, APS, v. 11, n. 1, p. 1, 1939. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.

MARTINS, T. M. da M. et al. Desenvolvimento e caracterização de córneas humanas descelularizadas e recelularização com células-tronco visando regeneração do epitélio corneano anterior. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 18.

MATSUDA, M.; YEE, R. W.; EDELHAUSER, H. F. Comparison of the corneal endothelium in an american and a japanese population. *Archives of Ophthalmology*, American Medical Association, v. 103, n. 1, p. 68–70, 1985. Citado na página 55.

MEDEIROS, C. S.; SAIKIA, P.; OLIVEIRA, R. C. de; LASSANCE, L.; SANTHIAGO, M. R.; WILSON, S. E. Descemet's membrane modulation of posterior corneal fibrosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 60, n. 4, p. 1010–1020, 2019. Citado na página 52.

MERGLER, S.; PLEYER, U. The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Progress in retinal and eye research*, Elsevier, v. 26, n. 4, p. 359–378, 2007. Citado 3 vezes nas páginas 21, 22 e 23.

- MIESFELD, J. B.; BROWN, N. L. Eye organogenesis: a hierarchical view of ocular development. *Current topics in developmental biology*, Elsevier, v. 132, p. 351–393, 2019. Citado na página 18.
- MORISHIGE, N.; SONODA, K.-H. Bullous keratopathy as a progressive disease: evidence from clinical and laboratory imaging studies. *Cornea*, LWW, v. 32, p. S77–S83, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 24.
- MORRIS A. PATRICK GUNNING, A. R. K. V. J. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. 2. ed. [S.l.]: PublisherImperial College Press, 2009. ISBN 9781848164673. Citado na página 14.
- NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica*, SciELO Brasil, v. 44, p. 212–219, 1998. Citado na página 14.
- NEWMAN, J. *Physics of the life sciences*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 17.
- OKUNO, E.; CALDAS, I. L.; CHOW, C. Física para ciências biológicas e biomédicas. In: *Física para ciências biológicas e biomédicas*. [S.l.: s.n.], 1986. p. 490–490. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 16.
- OLIVEIRA, R. C. de; WILSON, S. E. Descemet’s membrane development, structure, function and regeneration. *Experimental eye research*, Elsevier, v. 197, p. 108090, 2020. Citado na página 52.
- OLIVER, W. C.; PHARR, G. M. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *Journal of materials research*, Cambridge University Press, v. 19, n. 1, p. 3–20, 2004. Citado na página 41.
- PATEL, S. P.; BOURNE, W. M. Corneal endothelial cell proliferation: a function of cell density. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 50, n. 6, p. 2742–2746, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 23.
- PATEL, S. P.; BOURNE, W. M. Corneal endothelial cell proliferation: a function of cell density. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 50, n. 6, p. 2742–2746, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 55.
- PRICE, M. O.; MEHTA, J. S.; JURKUNAS, U. V.; JR, F. W. P. Corneal endothelial dysfunction: Evolving understanding and treatment options. *Progress in retinal and eye research*, Elsevier, v. 82, p. 100904, 2021. Citado na página 23.
- PRICOPIE, S.; ISTRATE, S.; VOINEA, L.; LEASU, C.; PAUN, V.; RADU, C. Pseudophakic bullous keratopathy. *Romanian journal of ophthalmology*, Romanian Society of Ophthalmology, v. 61, n. 2, p. 90, 2017. Citado na página 65.
- RABINOVICH, Y. I.; ADLER, J. J.; ESAYANUR, M. S.; ATA, A.; SINGH, R. K.; MOUDGIL, B. M. Capillary forces between surfaces with nanoscale roughness. *Advances in colloid and interface science*, Elsevier, v. 96, n. 1-3, p. 213–230, 2002. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 34.

- RAITERI, R.; GRATAROLA, M.; BUTT, H.-J. Measuring electrostatic double-layer forces at high surface potentials with the atomic force microscope. *The Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 100, n. 41, p. 16700–16705, 1996. Citado na página 37.
- RAO, S. K.; SEN, P. R.; FOGLA, R.; GANGADHARAN, S.; PADMANABHAN, P.; BADRINATH, S. Corneal endothelial cell density and morphology in normal indian eyes. *Cornea*, LWW, v. 19, n. 6, p. 820–823, 2000. Citado na página 55.
- RATES, E. R. D.; ALMEIDA, C. D.; COSTA, E. d. P. F.; FARIAS, R. J. d. M.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; ALENCAR, L. M. R. Layer-by-layer investigation of ultrastructures and biomechanics of human cornea. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI, v. 23, n. 14, p. 7833, 2022. Citado 6 vezes nas páginas 14, 16, 18, 20, 42 e 59.
- REIFENBERGER, R. G. *Fundamentals of Atomic Force Microscopy: Part I: Foundations*. [S.l.]: World Scientific Publishing Company Pte Limited Singapore, 2016. Citado 7 vezes nas páginas 25, 26, 28, 29, 30, 34 e 36.
- RUGAR, D.; HANSMA, P. Atomic force microscopy. *Physics today*, v. 43, n. 10, p. 23–30, 1990. Citado na página 25.
- SABATER-CRUZ, N.; FIGUERAS-ROCA, M.; PADRÓ-PITARCH, L.; TORT, J.; CASAROLI-MARANO, R. P. Corneal transplantation activity in catalonia, spain, from 2011 to 2018: Evolution of indications and surgical techniques. *PLoS one*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 16, n. 4, p. e0249946, 2021. Citado na página 14.
- SANTHIAGO, M. R. d.; MONICA, L. A. M.; KARA-JUNIOR, N.; GOMES, B. d. A. F.; BERTINO, P. M.; MAZUREK, M. G. G.; YAMANE, Y.; MEIRELLES, S. H. S. Perfil do paciente com ceratopatia bolhosa pós-facectomia atendidos em hospital público. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, SciELO Brasil, v. 68, p. 201–205, 2009. Citado na página 14.
- SEO, Y.; JHE, W. Atomic force microscopy and spectroscopy. *Reports on Progress in Physics*, IOP Publishing, v. 71, n. 1, p. 016101, 2007. Citado 3 vezes nas páginas 28, 30 e 32.
- SILVA, G. R. d. et al. Microscopia de força atômica na análise de rugosidade e da dimensão fractal de membranas celulares. Universidade Federal de Alagoas, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 45.
- SNELL, R. S.; LEMP, M. A. *Clinical anatomy of the eye*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013. Citado na página 16.
- SOTRES, J.; BARÓ, A. Afm imaging and analysis of electrostatic double layer forces on single dna molecules. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 98, n. 9, p. 1995–2004, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 36 e 37.
- SRIDHAR, M. S. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian journal of ophthalmology*, Wolters Kluwer–Medknow Publications, v. 66, n. 2, p. 190, 2018. Citado 3 vezes nas páginas 13, 16 e 18.
- STRAEHLA, J. P.; LIMPOCO, F.; DOLGOVA, N. V.; KESELOWSKY, B. G.; SAWYER, W. G.; PERRY, S. S. Nanomechanical probes of single corneal epithelial cells: shear stress and elastic modulus. *Tribology letters*, Springer, v. 38, p. 107–113, 2010. Citado na página 13.



THOMASY, S. M.; RAGHUNATHAN, V. K.; WINKLER, M.; REILLY, C. M.; SADELI, A. R.; RUSSELL, P.; JESTER, J. V.; MURPHY, C. J. Elastic modulus and collagen organization of the rabbit cornea: epithelium to endothelium. *Acta biomaterialia*, Elsevier, v. 10, n. 2, p. 785–791, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 55 e 57.

TORRICELLI, A. A.; SINGH, V.; SANTHIAGO, M. R.; WILSON, S. E. The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 54, n. 9, p. 6390–6400, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 61.

TRTIK, P.; KAUFMANN, J.; VOLZ, U. On the use of peak-force tapping atomic force microscopy for quantification of the local elastic modulus in hardened cement paste. *Cement and concrete research*, Elsevier, v. 42, n. 1, p. 215–221, 2012. Citado na página 42.

UCHINO, Y. The ocular surface glycocalyx and its alteration in dry eye disease: a review. *Investigative ophthalmology & visual science*, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, v. 59, n. 14, p. DES157–DES162, 2018. Citado na página 60.

WANG, X.; RAMÍREZ-HINESTROSA, S.; DOBNIKAR, J.; FRENKEL, D. The lennard-jones potential: when (not) to use it. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Royal Society of Chemistry, v. 22, n. 19, p. 10624–10633, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.

WILSON, L.; MATSUDAIRA, P. T.; JENA, B. P.; HORBER, J. H. *Atomic force microscopy in cell biology*. [S.l.]: Academic Press, 2002. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 26.

WILSON, S. E. Coordinated modulation of corneal scarring by the epithelial basement membrane and descemet's basement membrane. *Journal of Refractive Surgery*, SLACK Incorporated Thorofare, NJ, v. 35, n. 8, p. 506–516, 2019. Citado na página 52.

WILSON, S. E.; HONG, J.-W. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? a hypothesis. *Cornea*, LWW, v. 19, n. 4, p. 417–420, 2000. Citado na página 17.

WILSON, S. E.; TORRICELLI, A. A.; MARINO, G. K. Corneal epithelial basement membrane: Structure, function and regeneration. *Experimental eye research*, Elsevier, v. 194, p. 108002, 2020. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.

YUEN, H. K.; RASSIER, C. E.; JARDELEZA, M. S. R.; GREEN, W. R.; CRUZ, Z. D. L.; STARK, W. J.; GOTTSCH, J. D. A morphologic study of fuchs dystrophy and bullous keratopathy. *Cornea*, LWW, v. 24, n. 3, p. 319–327, 2005. Citado na página 24.

ZHAO, H.; LUO, Y.; NIU, C.; GUAN, W. Comparison of treatments for bullous keratopathy in rabbits. *Experimental and Therapeutic Medicine*, Spandidos Publications, v. 5, n. 5, p. 1481–1485, 2013. Citado na página 14.

ZHAO, M.; CHALMERS, L.; CAO, L.; VIEIRA, A. C.; MANNIS, M.; REID, B. Electrical signaling in control of ocular cell behaviors. *Progress in retinal and eye research*, Elsevier, v. 31, n. 1, p. 65–88, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 64.