

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

**MARIA DO SOCORRO DO NASCIMENTO AMORIM**

**ABORDAGENS BIOFÍSICAS E VIBRACIONAIS NA INVESTIGAÇÃO DE  
TAUPATIAS E DECLÍNIO COGNITIVO ASSOCIADO AO DIABETES**

**SÃO LUÍS - MA**

**2025**

Maria do Socorro do Nascimento Amorim

ABORDAGENS BIOFÍSICAS E VIBRACIONAIS NA INVESTIGAÇÃO DE TAUPATIAS  
E DECLÍNIO COGNITIVO ASSOCIADO AO DIABETES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Física.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar.

São Luís - MA

2025

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

do Nascimento Amorim, Maria do Socorro.

Abordagens Biofísicas e Vibracionais na Investigação de Taupatias e Declínio Cognitivo Associado ao Diabetes /  
Maria do Socorro do Nascimento Amorim. - 2025.

161 p.

Orientador(a) : Luciana Magalhães Rebêlo Alencar.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em  
Física/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,  
2025.

1. Taupatias. 2. Diabetes Mellitus. 3. Hipocampo. 4.  
Microscopia de Força Atômica. 5. Espectroscopia Raman. I.  
Magalhães Rebêlo Alencar, Luciana. II. Título.

Maria do Socorro do Nascimento Amorim

Abordagens Biofísicas e Vibracionais na Investigação de Taupatias e Declínio Cognitivo  
Associado ao Diabetes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Física.

Aprovado em: 21/ 02/ 2025

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão - Campus São Luís

---

Prof. Dr. Clenilton Costa dos Santos  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Diego Augusto Batista Barbosa  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Pedro Noronha Filho  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa  
Universidade de São Paulo

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Ana e Manoel, pelo amor  
incondicional e pelo apoio constante  
durante toda a minha jornada acadêmica.*

*“Em meio às minhas cinzas, eu desperto.  
E do chão do deserto, nasce uma rosa outra vez.”*

(Rosa de Saron)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sustento e amparo em todo o caminho percorrido até aqui. O Seu amor sempre me sustentará.

À professora Luciana, pela orientação neste trabalho e pela amizade consolidada. Agradeço a disponibilidade e acolhimento que sempre demonstrou, pelos grandes ensinamentos na vida acadêmica e por assumir a frente da batalha muitas vezes. Sua garra e determinação são exemplos de vida para mim.

À professora Ivone, amiga e incentivadora da minha jornada acadêmica, desde os tempos do Ilha da Ciência, e ao professor Oliveira, por depositar sua confiança em mim e no meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica e Nanosistemas, Erick, Álefe, Joel, Beatriz e Rosa pelos momentos de conversas e contribuições na pesquisa.

Ao Laboratório de Fisiologia Experimental, pelas amostras utilizadas neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Aos meus pais, Ana Maria e Manoel Carlos, pelo amor e apoio incondicional. Obrigada por não medirem esforços para que mais esta etapa fosse concluída, desde 2014 quando mudei de cidade para concluir o Ensino Médio. O conhecimento é a herança mais importante que vocês poderiam me dar e essa conquista sempre será nossa.

Aos meus irmãos Carlos Natã e Carlos Adriano pelos momentos fraternos e aprendizados compartilhados. Nem tudo são flores, mas há aprendizado em tudo que vivemos.

À minha irmã de vida Ramille Santana, obrigada por me ouvir e me dar os melhores conselhos em situações difíceis. Te admiro e te tenho na mais alta estima.

Ao meu primo Walbemário, pelo incentivo às minhas conquistas, desde o jardim de infância.

Às amigas queridas, Inara, Beth, Gegê, Marina, Brenda e Lohanna. Vocês são fundamentais em minha vida, independente do tempo e distância.

Aos meus pequenos Heloísa, Helena e José, pela pureza e amor sincero; e minha luz, Agnes Maria, que veio como uma arco-íris após a chuva.

Ao meu avô Haroldo (In memoriam), que sempre se referiu a mim como professora. Que o senhor sinta orgulho de sua neta professora de onde estiver.

Ao pequeno Vinicius (In memoriam), filho da minha primeira amiga. A saudade não diminuiu, apenas ficou acomodada. Te amarei para sempre.

A pessoas especiais que permaneceram em minha vida, nutrindo o carinho dos encontros, em especial Vera, Ana Clara, Clarinha e Mercês.

Aos meus alunos e amigos do Colégio Universitário, que contribuem diariamente para o meu amadurecimento profissional, em especial Irê, Fabiola, Ângelo, Ulisses, Gustavo e Fernanda.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, com palavras, gestos e orações.

Muito obrigada!

## RESUMO

Doenças neurodegenerativas, como as taupatias, representam um crescente desafio de saúde pública devido ao seu impacto devastador na qualidade de vida e à falta de tratamentos eficazes. As taupatias, incluindo a doença de Alzheimer, são caracterizadas pela agregação anormal da proteína tau, proteína associada aos microtúbulos, essenciais para a manutenção da estrutura e do funcionamento dos neurônios, levando à disfunção neuronal e ao declínio cognitivo. A relação entre essas doenças e o diabetes mellitus, doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia, tem emergido como um foco importante de pesquisa científica. Esta interconexão sublinha a importância de entender as bases moleculares e celulares dessas doenças para desenvolver estratégias terapêuticas eficazes. Este trabalho é dividido em duas partes: *(i)* revisão que destaca o uso da técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) como uma técnica de pesquisa adequada para o estudo de danos celulares em taupatias, mesmo em estágios iniciais, permitindo elucidar mecanismos patogênicos dessas doenças. Esta primeira parte sintetiza os estudos recentes que aplicaram AFM para elucidar as alterações estruturais e biofísicas associadas às taupatias, incluindo a doença de Alzheimer e Parkinson, focando na análise das propriedades mecânicas dos agregados de tau e nas mudanças na morfologia celular e tecidual. Para isto, buscou-se na literatura pesquisas dos últimos 5 anos que empregassem o AFM na investigação de tecidos, células e proteínas no contexto de taupatias, reunindo a principal abordagem e os resultados de cada estudo. Ao integrar e avaliar os avanços recentes, este trabalho fornece uma visão abrangente sobre o papel crucial do AFM na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes às taupatias e na promoção de novas abordagens para o tratamento dessas doenças devastadoras; e *(ii)* caracterização das alterações ultraestruturais, nanomecânicas e vibracionais no tecido hipocampal hiperglicêmico usando Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia Raman (ER), investigando como o diabetes mellitus contribui para o declínio cognitivo, examinando os efeitos da resistência à insulina no cérebro sobre a função neural. Os resultados revelam assinaturas moleculares distintas e propriedades mecânicas alteradas em tecidos patológicos, fornecendo novos *insights* sobre os mecanismos subjacentes à neurodegeneração e ao impacto do diabetes no cérebro. Ao aprofundar a compreensão dessas alterações, este trabalho contribui para o desenvolvimento de potenciais biomarcadores para diagnósticos e abre caminho para novas estratégias terapêuticas direcionadas às taupatias e sua relação com diabetes mellitus.

**Palavras-chave:** Taupatias. Neurodegeneração. Diabetes Mellitus. Biomecânica. Hipocampo. Microscopia de Força Atômica. Espectroscopia Raman.

## ABSTRACT

Neurodegenerative diseases, such as tauopathies, pose a growing public health challenge due to their devastating impact on quality of life and the lack of effective treatments. Tauopathies, including Alzheimer's disease, are characterized by the abnormal aggregation of tau protein, a microtubule-associated protein essential for maintaining neuronal structure and function, leading to neuronal dysfunction and cognitive decline. The connection between these diseases and diabetes mellitus, a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, has emerged as an important focus of scientific research. This interrelationship underscores the importance of understanding the molecular and cellular foundations of these conditions to develop effective therapeutic strategies. This study is divided into two parts: (i) a review highlighting the use of Atomic Force Microscopy (AFM) as a suitable research tool for studying cellular damage in tauopathies, even at early stages, which allows for the elucidation of the pathogenic mechanisms underlying these diseases. This section synthesizes recent studies that applied AFM to investigate structural and biophysical changes associated with tauopathies, including Alzheimer's and Parkinson's diseases, focusing on the analysis of the mechanical properties of tau aggregates and changes in cellular and tissue morphology. To this end, a literature search was conducted for studies from the past five years that utilized AFM to explore tissues, cells, and proteins in the context of tauopathies, compiling the primary approaches and findings of each study. By integrating and evaluating recent advancements, this work provides a comprehensive view of AFM's crucial role in understanding the molecular mechanisms underlying tauopathies and promoting new approaches to treating these devastating conditions; and (ii) the characterization of ultrastructural, nanomechanical, and vibrational alterations in hyperglycemic hippocampal tissue using Atomic Force Microscopy and Raman Spectroscopy (RS), which investigates how diabetes mellitus contributes to cognitive decline by examining the effects of insulin resistance in the brain on neural function. The results reveal distinct molecular signatures and altered mechanical properties in pathological tissues, offering new insights into the mechanisms underlying neurodegeneration and the impact of diabetes on the brain. By deepening the understanding of these changes, this work contributes to the development of potential biomarkers for diagnostics, paving the way for novel therapeutic strategies targeting tauopathies and their relationship with diabetes mellitus.

**Keywords:** Tauopathies. Neurodegeneration. Diabetes Mellitus. Biomechanics. Hippocampus. Atomic Force Microscopy. Raman Spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

- 2.1 Mecanismo de Entrega de Glicose em Diferentes Condições Metabólicas.** A. Situação Saudável: A insulina liberada pelo pâncreas se liga aos receptores de insulina nas células musculares e adiposas, facilitando a entrada de glicose nas células para produção de energia. B. Diabetes Mellitus Tipo 1: Devido à destruição autoimune das células beta pancreáticas, há uma deficiência na produção de insulina. Como resultado, a glicose permanece na corrente sanguínea, levando à hiperglicemia. C. Diabetes Mellitus Tipo 2: Apesar da produção de insulina pelo pâncreas, a resistência à insulina nos tecidos periféricos impede a entrada eficaz de glicose nas células. Isso resulta em níveis elevados de glicose no sangue, característicos de hiperglicemia. ....**24**
- 3.1 Esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica com seus componentes.** A sonda AFM varre fibras de proteína tau com o auxílio do scanner piezoelétrico. A detecção da deflexão do cantilever é avaliada pela reflexão do laser na parte traseira do cantilever, que é enviado ao detector de 4 quadrantes, identificando variações horizontais e verticais do sinal. Os sinais são convertidos em mapas topográficos a partir dos quais são obtidas as propriedades físicas da superfície. ....**38**
- 3.2 Esquema gráfico de uma curva típica de força/separação, mostrando a curva de aproximação em laranja e a curva de retração, linha pontilhada em azul.** No ponto 1, a sonda está na região sem contato, aproximando-se da amostra. No ponto 2 ocorre o contato entre a sonda e a superfície. No ponto 3, encontra-se o ponto de pico de força, onde a sonda recua na amostra. A partir do ponto 4, a sonda se afasta da superfície devido ao predomínio de forças repulsivas. No ponto 5, encontra-se o ponto de força mínima e a região de adesão máxima, onde a sonda se desprende da amostra. A região roxa representa a histerese e é a soma das forças dissipativas e de adesão. No ponto 6 a sonda está na região sem contato, afastando-se da superfície da amostra. ....**41**
- 3.3 Esquema dos principais modos de operação do AFM utilizados no estudo de sistemas biológicos.** A) AFM Biológico (Bio-AFM). B) Modo AFM Dinâmico (DM-AFM). C) Curva força-distância (FD-AFM). D) *Peak Force Quantitative Nanomechanics* (QNM-AFM). E) AFM de alta velocidade (HS-AFM). ....**45**
- 3.4 Papéis fisiológicos da tau no sistema nervoso e da Tau disfuncional nas taupatias.** .....**50**

**4.1** Desenho experimental para obter amostras de controle, diabetes tipo 1 e tipo 2 (DM2) em ratos. Na Fase I, ratas fêmeas foram induzidas ao DM2 usando uma dieta rica em sacarose. Após o acasalamento e amamentação (Fase II), os filhotes foram divididos em grupos experimentais (Fase III): controle (CTR), DM1 induzido por STZ e DM2. Na Fase IV, os ratos foram submetidos a testes cognitivos. Na Fase V, a eutanásia foi realizada para coletar amostras de sangue e cérebro para análises bioquímicas e estruturais do hipocampo. ....70

**4.2** Diferenças morfométricas entre os tipos de Diabetes mellitus. A, peso corporal (g); B, área sob a curva (AUC) do peso corporal; C, índice de Lee ( $\text{g}^3/\text{cm} \cdot 1000$ ); D, peso relativo (g/100g de PC) dos músculos posteriores (sóleo e gastrocnêmio); E, peso relativo (g/100g de PC) dos coxins adiposos retroperitoneais, periepípidídeos e mesentéricos avaliados em ratos controle (CTR, n=5), ratos diabéticos tipo 1 (T1DM, n=5) e ratos diabéticos tipo 2 (T2DM, n=5). Pontos e barras representam média  $\pm$  SEM (Anova-Tukey unidirecional). a representa  $p < 0,05$  quando comparado ao CTR, enquanto b representa  $p < 0,05$  quando comparado ao T1DM. ....75

**4.3** Eixo glicose-insulina e resistência à insulina em diferentes tipos de Diabetes mellitus. A, Níveis glicêmicos de jejum (mg/dL); B, níveis séricos de triglicérides (mg/dL); C, níveis glicêmicos (mg/dL) durante teste de tolerância à glicose – GTT; D, AUC dos níveis glicêmicos durante o GTT; E, níveis séricos de insulina ( $\mu\text{LU}/\text{mL}$ ); F, índice HOMA para estabelecer resistência periférica à insulina; e G, índice TyG para estabelecer resistência hepática à insulina em ratos controle (CTR, n=5), ratos diabéticos tipo 1 (DM T1, n=5) e ratos diabéticos tipo 2 (DMT2, n=5). Pontos e barras representam média  $\pm$  SEM (Anova-Tukey unidirecional). a representa  $p < 0,05$  quando comparado ao CTR, enquanto b representa  $p < 0,05$  quando comparado ao DMT1. ....77

**4.4** Morfometria cerebral e função cognitiva em diferentes tipos de diabetes mellitus. A, peso relativo (g/100g de PC) do cérebro total; B, tempo total (s) gasto explorando os dois objetos idênticos durante o estágio de familiarização no teste de reconhecimento de novos objetos; C, tempo total (s) gasto explorando objetos novos e familiares durante o teste de reconhecimento de novos objetos; D, tempo relativo de exploração (%) do novo objeto no teste de reconhecimento de novos objetos; E, tempo (s) gasto aprendendo a localização da plataforma de fuga em dias consecutivos de treinamento no teste do labirinto aquático; F, AUC do tempo de aprendizagem no teste do labirinto aquático; G, tempo (s) de exploração até o quadrante alvo no teste do labirinto aquático em ratos controle (CTR, n=5), ratos diabéticos tipo 1 (DM T1, n=5) e ratos diabéticos tipo 2 (DM T2, n=5). Pontos e barras representam média  $\pm$  SEM (Anova-

Tukey unidirecional). A representa  $p < 0,05$  em comparação com CTR, enquanto b representa  $p < 0,05$  em comparação com DM1. ....79

**4.5** Mapas morfológicos AFM. A. Mapa de altura do tecido hipocampal controle. As setas azuis apontam para estruturas observadas apenas no tecido hipocampal controle. C. Mapa de altura dos tecidos do grupo DMT1 e D. Grupo DMT2. As setas roxas apontam para buracos no tecido T1DM e T2DM. As Figuras B, D e F mostram seus respectivos mapas tridimensionais. ....82

**4.6** Dados quantitativos de AFM. Dados quantitativos sobre propriedades ultraestruturais de tecidos do grupo controle (normoglicêmico) e pacientes com diabetes. (A) Rugosidade, (B) Área de superfície do tecido, (C) Gráficos de volume. Asteriscos indicam diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ . ....84

**4.7** Dados de adesão AFM. Dados de adesão qualitativos e quantitativos de tecidos do grupo controle e indivíduos DM. (A) Mapa de adesão do controle, (B) T1DM e (C) grupo T2DM. (D) Gráfico de barras das forças de adesão comparando os diferentes grupos. Asteriscos indicam diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ . ....87

**4.8** Dados do módulo AFM. Dados qualitativos e quantitativos do módulo de Young (YM) de tecidos do grupo controle e indivíduos DM. (A) Mapa MY do controle, (B) DM T1 e (C) grupo DM T2. (D) Gráfico de barras do MY comparando os diferentes grupos. Asteriscos indicam diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ . ....89

**4.9** Exemplos de curvas força-distância obtidas por AFM para amostras hipocampais. A curva azul é a curva de aproximação. A curva vermelha é a curva de retração. A, controle. B, Diabetes Mellitus Tipo 1. C, Diabetes Mellitus Tipo 2. ....91

**4.10** Identificação molecular. A. Espectros médios e identificação de modos relacionados ao grupo controle (preto), grupo DM T1 (azul) e grupo DM T2 (vermelho). B. Análise de PCA mostrando a diferenciação entre o grupo controle (preto), grupo T1DM (azul) e grupo T2DM (vermelho), com uma variância total de 87,9%. ....92

**A.1** Esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica e seus componentes..104

**A.2** Descrição qualitativa para o potencial de Lennard-Jones  $V(r)$  e para as forças atrativas de van der Waals e repulsivas de origem quântica. ....113

<b>A.3</b> Potencial de interação entre sonda-amostra e suas respectivas regiões nas quais os modos de operação do AFM atuam. ....	<b>114</b>
<b>A.4</b> Representação esquemática do espalhamento Rayleigh e Raman. ....	<b>120</b>
<b>A.5</b> Esquema de um espectrômetro Raman. A linha vermelha é a trajetória do laser e a linha azul é a trajetória dos fótons que foram alterados. ....	<b>123</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Tabela apresentando resultados de pesquisas dos últimos cinco anos utilizando a técnica AFM no estudo das taupatias. São apresentados os modos de operação, as especificações da sonda, a abordagem e os principais resultados obtidos.

**Tabela 2.** Assinatura de cada pico do espectro Raman.

## LISTA DE SIGLAS

AFM- Microscopia de Força Atômica

CTR - Controle

ER- Espectroscopia Raman

DA – Doença de Alzheimer

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DM – Diabetes Mellitus

DMT1 – Diabetes Mellitus Tipo 1

DMT2 – Diabetes Mellitus Tipo 2

MAPT - Proteína Tau Associada aos Microtúbulos

MEC- Matriz Extracelular

NFT - Emaranhados Neurofibrilares

PCA- Análise de Componente Principal

PDIIs - Proteínas Intrinsecamente Desordenadas

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

Rq- Rugosidade

SP - Placas Senis

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Diabetes Mellitus .....	21
2.1.1 Diabetes Mellitus tipo 1 .....	24
2.1.2 Diabetes Mellitus tipo 2 .....	25
2.2 Distúrbios Metabólicos e Declínio Cognitivo .....	27
2.3 AFM e Espectroscopia Raman no Estudo de Tecidos e Células Cerebrais .....	30
Parte I .....	34
MICROSCOPIADE FORÇA ATÔMICA APLICADA AO ESTUDO DE TAUPATIAS .....	34
Capítulo 3 .....	35
3.1 Introdução .....	35
3.2 Microscopia de Força Atômica .....	37
3.2.1 Curvas de Força.....	40
3.2.2 AFM em Sistemas Biológicos.....	42
3.3 Taupatias: aspectos clínicos e moleculares .....	49
3.4 AFM em Taupatias.....	52
3.5 Conclusões .....	65
Parte II.....	66
Capítulo 4 .....	67
4.1 Introdução .....	67
4.2 Materiais e Métodos .....	69
4.2.1 Desenho experimental .....	69
4.2.2 Testes cognitivos .....	71
4.2.3 Preparação de amostras .....	72
4.2.4 Configuração de AFM.....	73
4.2.5 Configuração de Espectroscopia Raman .....	73
4.2.6 Análise de Dados.....	74
4.2.7 Análise Estatística .....	75
4.3 Resultados e Discussões.....	75
4.3.1 Caracterização do Diabetes .....	75
4.3.2 Avaliação da Cognição.....	78
4.3.3 Resultados ultraestruturais .....	81
4.3.4 Resultados nanomecânicos.....	86
4.3.5 Resultados Vibracionais .....	91
4.4 Conclusões .....	99

5 Conclusões e Perspectivas.....	100
APÊNDICES.....	102
A FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	102
A.1 Conceitos básicos de Microscopia de Força Atômica.....	102
A.1.1 Forças em nanoescala.....	105
A.2 Espectroscopia Vibracional Raman.....	118
B ARTIGO PUBLICADOS .....	124
C COMITÊ DE ÉTICA DA UFMA .....	125
REFERÊNCIAS.....	128

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas, como as taupatias, representam um crescente desafio para a saúde pública devido ao seu impacto devastador na qualidade de vida e à ausência de tratamentos eficazes. As taupatias, incluindo a doença de Alzheimer, são caracterizadas pela acumulação anormal da proteína tau em neurônios, o que resulta em disfunção neuronal e declínio cognitivo progressivo (Mandelkow *et al.*, 2007). De acordo com a *Alzheimer's Association* ('2023 Alzheimer's disease facts and figures', 2023), mais de 55 milhões de pessoas vivem com demência no mundo, e a doença de Alzheimer é responsável por cerca de 60-70% desses casos. A detecção precoce e a compreensão dos mecanismos patológicos são cruciais para o desenvolvimento de terapias eficazes.

Paralelamente, o diabetes mellitus, especialmente o tipo 2, tem sido associado a um aumento no risco de declínio cognitivo e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Srikanth *et al.*, 2020). Estudos indicam que indivíduos com diabetes tipo 2 têm uma probabilidade 50% maior de desenvolver demência em comparação com aqueles sem a condição (Janson *et al.*, 2004). A resistência à insulina e outras disfunções metabólicas associadas ao diabetes tipo 2 contribuem para alterações na função cerebral e na estrutura neuronal, exacerbando o risco de declínio cognitivo.

O diagnóstico precoce de taupatias e do declínio cognitivo associado ao diabetes mellitus representa um desafio significativo na prática clínica. A complexidade dos mecanismos patológicos envolvidos nessas condições, aliada à natureza insidiosa e progressiva dos sintomas, dificulta a detecção precoce e precisa. Nas taupatias, como a doença de Alzheimer, os biomarcadores tradicionais frequentemente não conseguem captar as mudanças iniciais no tecido cerebral, limitando a eficácia das intervenções preventivas (Blennow *et al.*, 2010). Além disso, a sobreposição de sintomas entre diferentes doenças neurodegenerativas complica ainda mais o diagnóstico diferencial. No caso do declínio cognitivo associado ao diabetes, a resistência à insulina e outras disfunções metabólicas podem exacerbar ou mimetizar os sintomas de taupatias, tornando a identificação dos mecanismos específicos subjacentes à neurodegeneração ainda mais desafiadora (Srikanth *et al.*, 2020). Esta complexidade sublinha a necessidade de novas abordagens diagnósticas, como as técnicas biofísicas e vibracionais, que possam proporcionar uma análise mais detalhada e precoce das alterações patológicas no tecido cerebral, possibilitando uma intervenção mais eficaz e personalizada.

A Microscopia de Força Atômica (AFM) tem emergido como uma ferramenta crucial no estudo de taupatias devido à sua capacidade de fornecer imagens de alta resolução e medições detalhadas das propriedades mecânicas e estruturais das proteínas e agregados

patológicos. O AFM permite a visualização das superfícies celulares e dos agregados de proteínas em escala nanométrica, bem como de células e tecidos como hipocampo, oferecendo uma compreensão detalhada das mudanças morfológicas e mecânicas que ocorrem em taupatias como a doença de Alzheimer (Makky *et al.*, 2020a). A capacidade do AFM de medir forças intermoleculares e mapear propriedades mecânicas a nível celular e subcelular torna esta técnica essencial para elucidar os mecanismos de agregação e propagação da proteína tau, e também da elucidação de declínio cognitivo associado ao diabetes, contribuindo para o desenvolvimento de novos biomarcadores diagnósticos e estratégias terapêuticas.

A Espectroscopia Raman, por sua vez, oferece uma abordagem complementar, focando na análise das assinaturas moleculares e vibracionais dos tecidos cerebrais afetados por taupatias e diabetes. Esta técnica baseia-se na dispersão inelástica da luz para fornecer informações sobre a composição molecular e as interações químicas nos tecidos, permitindo a identificação de alterações bioquímicas associadas a doenças neurodegenerativas e disfunções metabólicas (Paraskevaidi *et al.*, 2018). No contexto do declínio cognitivo associado ao diabetes, a espectroscopia Raman tem sido utilizada para detectar mudanças nas assinaturas vibracionais que refletem a presença de resistência à insulina e outras alterações metabólicas no cérebro (Huang and Isidoro, 2017). A aplicação desta técnica permite uma análise não destrutiva e altamente sensível dos tecidos, facilitando a detecção precoce de alterações patológicas e a identificação de potenciais biomarcadores para o diagnóstico e monitoramento da progressão da doença.

A integração das técnicas de AFM e espectroscopia Raman na investigação de taupatias e declínio cognitivo associado ao diabetes oferece uma abordagem multidimensional e abrangente. Enquanto o AFM fornece uma visão detalhada das propriedades mecânicas e estruturais em escala nanométrica, a espectroscopia Raman complementa essa informação com dados sobre a composição molecular e as interações químicas. Esta combinação de técnicas avançadas não só aprimora a compreensão dos mecanismos patológicos subjacentes, mas também abre caminho para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas, potencialmente transformando o manejo clínico dessas condições devastadoras.

Apesar do potencial significativo da Microscopia de Força Atômica e da Espectroscopia Raman na investigação de taupatias e declínio cognitivo associado ao diabetes, o uso dessas técnicas ainda é relativamente limitado na pesquisa biomédica. No contexto específico do declínio cognitivo associado ao diabetes, a aplicação do AFM e da Espectroscopia Raman ainda está em fases iniciais, sendo este um dos grandes diferenciais desta pesquisa, principalmente no contexto do tecido do hipocampo. A maior parte dos estudos até o momento tem se concentrado em modelos *in vitro* ou em pequenos cortes de amostras, limitando a generalização

dos achados para contextos clínicos mais amplos (Bashir *et al.*, 2024). O potencial dessas técnicas para fornecer *insights* detalhados sobre os mecanismos patológicos subjacentes às taupatias e às disfunções cognitivas relacionadas ao diabetes ainda não foi plenamente explorado, o que sublinha a necessidade de mais pesquisas e investimentos para expandir seu uso.

Desta forma, o objetivo desta tese é integrar as abordagens biofísicas e vibracionais para obter uma compreensão mais abrangente das taupatias e do declínio cognitivo associado ao diabetes. A combinação de técnicas avançadas como o AFM e a espectroscopia Raman oferece uma perspectiva inovadora sobre os mecanismos patológicos e promove o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas, permitindo a comparação direta de tecidos de hipocampo normoglicêmicos e hiperglicêmicos, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento na área e para a melhoria das intervenções clínicas voltadas ao combate dessas condições debilitantes.

Para tanto, este trabalho estrutura-se primeiramente com o capítulo 1, com esta Introdução. No capítulo seguinte, apresenta-se a Revisão Bibliográfica, onde são descritos conceitos da fisiopatologia de diabetes e declínio cognitivo, além de uma revisão de trabalhos que utilizaram as técnicas de AFM e espectroscopia Raman no estudo de tecidos cerebrais. O capítulo 3 trata da parte I: Microscopia de Força Atômica aplicada ao estudo de taupatias. O capítulo 4 trata da parte II: Diabetes e Declínio Cognitivo: uma Abordagem Inovadora para Análise das Propriedades Biofísicas e Vibracionais do Hipocampo. Por fim, no capítulo 5, tem-se as Conclusões e Perspectivas para esta pesquisa, além das Referências Bibliográficas. Nos apêndices, são apresentados os princípios das técnicas centrais deste trabalho, o AFM e espectroscopia Raman.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta a revisão bibliográfica, incluindo informações acerca do diabetes, assim como sua relação com o declínio cognitivo, destacando os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, os fatores de risco, as consequências clínicas e as estratégias de manejo e prevenção. Além disso, este capítulo apresenta uma seção que destaca os principais estudos que utilizaram as técnicas de AFM e Espectroscopia Raman na investigação de patologias em tecidos e células cerebrais.

### 2.1 Diabetes Mellitus

O diabetes, com sua prevalência global cada vez maior, surgiu como um dos problemas de saúde mais importantes e desafiadores que a população humana do mundo atual enfrenta. Como mostra o estudo de Banday e colaboradores (Banday, Sameer and Nissar, 2020a), o aumento da prevalência do diabetes na maioria das regiões do mundo tem sido também associado ao rápido desenvolvimento econômico, levando à urbanização e à adoção de hábitos de vida modernos. Segundo o mesmo estudo, no ano de 2019, o número de adultos de 20 a 79 anos com diabetes foi estimado em cerca de 463 milhões, o que representa 9,3% da população adulta mundial total. Até o ano de 2030, esse número foi estimado em 578 milhões, representando 10,2% da população adulta mundial total e aumentando ainda mais para 700 milhões até o ano de 2045, o que representa 10,9% da população adulta mundial total. Ainda em 2019, a prevalência de diabetes entre homens e mulheres foi estimada em 9,6% e 9,0%, respectivamente, do total da população mundial por gênero. Além disso, aproximadamente 4,2 milhões de adultos com idades entre 20 e 99 anos morreram devido ao diabetes e suas complicações associadas, e gastos com saúde com diabetes foram estimados em pelo menos 760 bilhões de dólares, o que representa 10% do gasto total com adultos. Estima-se que o diabetes durante a gravidez tenha afetado mais de 20 milhões de nascidos vivos em relação à prematuridade (1 em cada 6 nascidos vivos) no ano de 2019 (Gojnic *et al.*, 2022).

Os índices de diabetes mellitus no Brasil também têm aumentado significativamente nas últimas décadas. De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em parceria com o Ministério da Saúde, a prevalência de diabetes diagnosticado entre adultos é de aproximadamente 7,7%, o que representa cerca de 11 milhões de pessoas (Campos, 2020). A prevalência varia entre diferentes regiões do país, sendo geralmente maior em áreas urbanas, especialmente no Sudeste, devido a

fatores como maior urbanização, mudanças nos hábitos alimentares e estilos de vida sedentários. A prevalência também aumenta com a idade e é mais comum em mulheres do que em homens. O impacto socioeconômico do diabetes é significativo, com custos diretos e indiretos relacionados ao tratamento e às complicações da doença, como doenças cardiovasculares, neuropatia e retinopatia diabética. Em resposta, o Ministério da Saúde tem implementado diversas políticas e programas para prevenir e controlar o diabetes, incluindo campanhas de conscientização, promoção de hábitos alimentares saudáveis, incentivo à prática de atividade física e programas de monitoramento e tratamento da doença (Ministério da Saúde, 2021). Esses esforços são essenciais para controlar a progressão da doença e minimizar suas complicações.

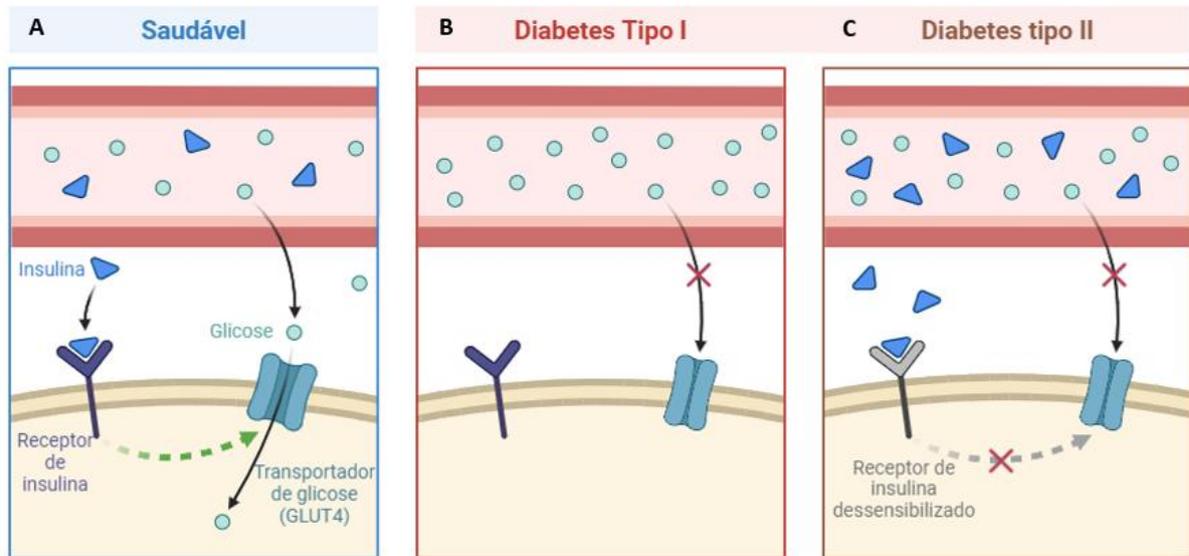
De forma geral, o diabetes mellitus é um distúrbio metabólico complexo caracterizado pela hiperglicemia, uma condição fisiologicamente anormal representada por níveis elevados contínuos de glicose no sangue (Banday, Sameer and Nissar, 2020b). Trata-se de uma doença multifatorial, envolvendo fatores genéticos e fatores externos, tais como a obesidade, falta de atividade física, dieta pobre e até mesmo estresse. A hiperglicemia crônica é um grande iniciador de complicações microvasculares diabéticas como, retinopatia e neuropatia. Além disso, a hiperglicemia crônica pode induzir múltiplas alterações celulares que levam a complicações. Vários órgãos do corpo, como olhos, rins, fígado e cérebro, são afetados pela hiperglicemia e pelos distúrbios metabólicos de proteínas, lipídios e carboidratos que estão ligados a ela, o que prejudica o funcionamento adequado e desempenho de cada órgão (Gupta *et al.*, 2022).

Características clínicas semelhantes à do diabetes mellitus foram descritas há 3000 anos pelos antigos egípcios. O termo "diabetes" foi cunhado pela primeira vez por Aeraetus da Capadócia. Mais tarde, a palavra mellitus (doce de mel) foi adicionada por Thomas Willis (Grã-Bretanha) em 1675 após redescobrir a doçura da urina e do sangue de pacientes, primeiramente notada pelos antigos indianos. Foi somente em 1776 que Dobson (Grã-Bretanha) confirmou pela primeira vez a presença de excesso de açúcar na urina e no sangue como causa de sua doçura (Ahmed, 2002).

O diabetes mellitus apresenta uma patogênese complexa e uma variedade de manifestações, tornando qualquer tentativa de classificação desse transtorno difícil, mas ainda assim útil. Essas classificações são frequentemente influenciadas pelas condições fisiológicas observadas no momento da avaliação e diagnóstico. Atualmente, a classificação do DM é baseada na etiologia e na patogênese da doença, sendo útil tanto na avaliação clínica quanto na decisão sobre a terapia necessária (Banday, Sameer and Nissar, 2020b). De acordo com essa classificação, o diabetes pode ser dividido em quatro categorias principais: diabetes mellitus

tipo 1 (DMT1), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), diabetes mellitus gestacional (DMG) e diabetes causado ou associado a certas condições, patologias e/ou transtornos específicos (Ahmed, 2002). Neste trabalho, abordou-se especificamente os casos de diabetes mellitus tipo 1 e diabetes mellitus tipo 2, que são os dois tipos mais predominantes no mundo.

O DMT1 é caracterizado pela secreção insuficiente de insulina e pela liberação excessiva de glucagon. Por outro lado, o DMT2 representa a forma mais comum de diabetes, caracterizando-se por níveis inadequados de insulina, aumento da acumulação de gordura no fígado, depuração de insulina comprometida e resistência hepática à ação da insulina (Bhatt and Smith, 2015). A Figura 2.1 ilustra como ocorre o mecanismo de entrega de glicose em uma situação saudável, com DMT1 e DMT2. Em uma situação saudável, a glicose é regulada de forma eficiente pelo corpo. Após a ingestão de alimentos, a glicose é absorvida pelo intestino e entra na corrente sanguínea, elevando os níveis de glicose no sangue. Em resposta, o pâncreas libera insulina, um hormônio que facilita a entrada da glicose nas células para ser utilizada como fonte de energia ou armazenada como glicogênio no fígado e nos músculos, reduzindo os níveis de glicose no sangue a valores normais. No diabetes mellitus tipo 1, o sistema imunológico ataca e destrói as células beta do pâncreas que produzem insulina, resultando em pouca ou nenhuma produção de insulina. Sem insulina, a glicose não pode entrar nas células e permanece elevada na corrente sanguínea, levando a hiperglicemia. No diabetes mellitus tipo 2, o corpo ainda produz insulina, mas as células se tornam resistentes a ela, e a quantidade de insulina produzida pode ser insuficiente para superar essa resistência. Como resultado, a glicose também se acumula no sangue, causando hiperglicemia. Em ambos os tipos de diabetes, o controle inadequado dos níveis de glicose pode levar a diversas complicações de saúde.



**Figura 2.1 Mecanismo de Entrega de Glicose em Diferentes Condições Metabólicas.** A. Situação Saudável: A insulina liberada pelo pâncreas se liga aos receptores de insulina nas células musculares e adiposas, facilitando a entrada de glicose nas células para produção de energia. B. Diabetes Mellitus Tipo 1: Devido à destruição autoimune das células beta pancreáticas, há uma deficiência na produção de insulina. Como resultado, a glicose permanece na corrente sanguínea, levando à hiperglicemia. C. Diabetes Mellitus Tipo 2: Apesar da produção de insulina pelo pâncreas, a resistência à insulina nos tecidos periféricos impede a entrada eficaz de glicose nas células. Isso resulta em níveis elevados de glicose no sangue, característicos de hiperglicemia.

Fonte: Adaptado do BioRender (*Scientific Image and Illustration Software* | BioRender, 2024).

### 2.1.1 Diabetes Mellitus tipo 1

O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença autoimune crônica que geralmente se manifesta na infância ou adolescência, embora possa ocorrer em qualquer idade. A incidência e prevalência do DMT1 têm aumentado globalmente e, segundo a *International Diabetes Federation (IDF)* (IDF et al., 2021), estima-se que cerca de 1,1 milhão de crianças e adolescentes com menos de 20 anos vivem com DMT1 no mundo. O DMT1 é caracterizado pela destruição autoimune das células beta do pâncreas, responsáveis pela produção de insulina. Esta destruição é mediada por células T autorreativas que atacam as células beta, resultando em deficiência absoluta de insulina. Fatores genéticos e ambientais, como infecções virais e exposição a certos alimentos na infância, estão implicados na patogênese da doença (Banday, Sameer and Nissar, 2020b).

O DMT1 é caracterizado por várias alterações físico-químicas devido à deficiência absoluta de insulina. Essa deficiência resulta em hiperglicemia, onde os níveis de glicose no sangue permanecem cronicamente elevados (Atkinson and Eisenbarth, 2001). A insulina é

crucial para o transporte de glicose para dentro das células, e sua ausência impede a utilização eficaz da glicose, levando a uma acumulação no sangue. Esse excesso de glicose é filtrado pelos rins, causando glicosúria e resultando em um efeito osmótico que promove poliúria e desidratação. Em resposta à falta de glicose intracelular, o corpo aumenta a lipólise, liberando ácidos graxos livres e glicerol, que são convertidos em corpos cetônicos no fígado, culminando em cetoacidose diabética, uma condição caracterizada por acidose metabólica e níveis elevados de cetonas no sangue (Battelino *et al.*, 2019). A hiperglicemia crônica e a cetoacidose promovem um ambiente de estresse oxidativo e inflamação, que são prejudiciais aos tecidos e contribuem para o desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares a longo prazo. Essas alterações físico-químicas afetam a homeostase metabólica e estão associadas a sintomas como fadiga, sede excessiva, fome intensa e perda de peso (Daneman, 2006).

Os pacientes podem necessitar de terapia de reposição de insulina inicialmente, mas a necessidade da terapia pode não ser absoluta e pode variar de acordo com os padrões episódicos de insulinopenia e cetoacidose característicos dessas formas de DMT1 (Banday, Sameer and Nissar, 2020a). O tratamento do DMT1 envolve a administração de insulina exógena para manter os níveis de glicose no sangue dentro de uma faixa normal. As opções de insulina incluem insulinas de ação rápida, curta, intermediária e longa. Recentemente, avanços na tecnologia de bombas de insulina e sistemas de monitoramento contínuo de glicose (CGM) têm melhorado significativamente o manejo do DMT1 (Bahal *et al.*, no date). Ensaios clínicos estão explorando o uso de imunomoduladores para retardar ou prevenir a progressão do DMT1 em indivíduos em risco. Além disso, avanços na medicina regenerativa, como o uso de células-tronco para regenerar células beta funcionais, representam uma esperança promissora para o futuro tratamento do DMT1 (Salama *et al.*, 2024).

O diabetes mellitus tipo 1 continua sendo um desafio significativo para a saúde pública, com uma crescente incidência global. O manejo eficaz da doença requer um entendimento abrangente de sua patogênese, diagnóstico precoce e terapias avançadas. Pesquisas em andamento oferecem esperança para novas abordagens terapêuticas que podem melhorar a qualidade de vida dos pacientes e, eventualmente, levar à cura do DMT1 (Warshauer, Bluestone and Anderson, 2020; Nagy *et al.*, 2022).

### **2.1.2 Diabetes Mellitus tipo 2**

O diabetes mellitus tipo 2 é a forma mais comum de diabetes, representando cerca de 90-95% de todos os casos de diabetes. A prevalência global do DMT2 tem aumentado

dramaticamente nas últimas décadas, impulsionada por fatores como urbanização, envelhecimento populacional, dieta inadequada e sedentarismo. Segundo a *International Diabetes Federation*, em 2021, mais de 537 milhões de adultos viviam com diabetes, e estima-se que esse número possa chegar a 783 milhões até 2045. No Brasil, a prevalência do DMT2 também tem crescido, refletindo as tendências globais e os desafios locais de saúde pública (International Diabetes Federation, 2021).

O diabetes mellitus tipo 2 é marcado por uma série de alterações físico-químicas devido à resistência à insulina e subsequente disfunção das células beta pancreáticas (Stumvoll, Goldstein and van Haeften, 2005). A resistência à insulina impede que a glicose seja eficientemente transportada para dentro das células, resultando em hiperglicemia persistente. Diferentemente do DMT1, onde há uma deficiência absoluta de insulina, no DMT2, os níveis de insulina podem ser normais ou até elevados, mas a sinalização defeituosa impede sua ação efetiva. A hiperglicemia crônica leva ao aumento da produção de insulina pelas células beta, que eventualmente se exaurem, resultando em disfunção progressiva dessas células e insuficiência insulínica relativa. Essa resistência à insulina e subsequente hiperglicemia estão associadas a processos de glicação avançada, que alteram a estrutura e a função de proteínas e lipídios, contribuindo para complicações microvasculares e macrovasculares. Além disso, a hiperglicemia crônica promove um ambiente pró-inflamatório e de estresse oxidativo, exacerbando o dano tecidual. As alterações físico-químicas na DMT2 incluem dislipidemia, com níveis elevados de triglicerídeos e baixos de HDL, promovendo a aterosclerose. Essas mudanças comprometem a homeostase metabólica e estão associadas a sintomas como sede excessiva, poliúria, fadiga e aumento do risco de doenças cardiovasculares e neuropatias (Kaze *et al.*, 2021).

Na fase inicial, o corpo compensa a resistência à insulina aumentando a produção de insulina. Com o tempo, essa compensação falha, resultando em hiperglicemia. Fatores genéticos desempenham um papel significativo, mas os fatores ambientais, como obesidade e inatividade física, são os principais impulsionadores da doença. A inflamação crônica de baixo grau e a deposição de gordura ectópica em órgãos como fígado e músculos esqueléticos contribuem para a resistência à insulina (Antar *et al.*, 2023a).

O diagnóstico de DMT2 é geralmente feito por meio de testes de glicose no sangue, como a glicemia de jejum, o teste de tolerância à glicose oral e a hemoglobina glicada (HbA1c). A *American Diabetes Association* recomenda um diagnóstico de DMT2 com níveis de HbA1c iguais ou superiores a 6,5%, glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL ou glicemia de 2 horas pós-carga igual ou superior a 200 mg/dL ('Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus', 2010). A detecção precoce é crucial para o manejo eficaz da doença e a prevenção

de complicações. O tratamento do DMT2 envolve mudanças no estilo de vida e medicamentos. A modificação do estilo de vida inclui dieta saudável, aumento da atividade física e perda de peso. Medicamentos como metformina são frequentemente a primeira linha de tratamento farmacológico e insulina (Davies *et al.*, 2018).

Está em foco a investigação sobre a eficácia de novos medicamentos, bem como intervenções de estilo de vida e tecnologias de monitoramento contínuo de glicose. Além disso, há um interesse crescente na medicina personalizada, onde tratamentos são adaptados com base em perfis genéticos e metabólicos individuais. Ensaios clínicos estão explorando o uso de imunomoduladores e terapias celulares para restaurar a função das células beta (2023). O diabetes mellitus tipo 2 representa um desafio significativo para a saúde pública global, com uma crescente prevalência e um impacto substancial na morbidade e mortalidade. O manejo eficaz do DMT2 requer uma abordagem multifacetada que inclua prevenção, diagnóstico precoce, mudanças no estilo de vida e tratamentos farmacológicos avançados (Davies *et al.*, 2018).

## **2.2 Distúrbios Metabólicos e Declínio Cognitivo**

Doenças neurodegenerativas são condições caracterizadas pela degeneração progressiva do sistema nervoso, afetando principalmente os neurônios no cérebro e na medula espinhal (Gadhavé *et al.*, 2024). Essas doenças resultam em uma perda gradual de funções cognitivas, motoras e comportamentais, impactando severamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Entre as doenças neurodegenerativas mais conhecidas estão a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a doença de Huntington. A etiologia dessas doenças é multifatorial, incluindo fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida, o que torna o estudo e o tratamento dessas condições particularmente desafiadores (Jucker and Walker, 2013).

A relação entre distúrbios metabólicos e declínio cognitivo tem sido amplamente estudada nas últimas décadas, com o diabetes mellitus emergindo como um fator de risco significativo para o desenvolvimento de demência (S. Roriz-Filho *et al.*, 2009; Feinkohl *et al.*, 2015; Biessels and Despa, 2018a; Mohamed-Mohamed *et al.*, 2023). O diabetes mellitus, especialmente o tipo 2, está associado a uma série de complicações que contribuem para o comprometimento cognitivo. Estudos mostram que a hiperglicemia crônica, característica do diabetes, provoca alterações neurovasculares e neuroinflamatórias que podem predispor os indivíduos a várias formas de demência, incluindo a doença de Alzheimer e a demência vascular (Chatterjee *et al.*, 2016; Nagar *et al.*, 2022). As anormalidades ligadas à resistência progressiva

à ação da insulina no tecido cerebral, com consequente comprometimento dos processos centrais de sinalização de insulina, acúmulo de neurotoxinas, estresse neuronal e neurodegeneração, têm sido associadas ao chamado Diabetes Mellitus tipo 3 (Nguyen *et al.*, 2020a).

A relação entre diabetes mellitus e o declínio cognitivo, incluindo a Doença de Alzheimer, envolve vários mecanismos fisiopatológicos complexos e inter-relacionados. Um dos principais mecanismos é a resistência à insulina, que ocorre tanto na periferia quanto no cérebro (Biessels and Despa, 2018a). A insulina no cérebro é crucial para a sinalização neural e a homeostase energética. A resistência à insulina cerebral pode levar a disfunções na sinalização neural, comprometendo a plasticidade sináptica e a memória, contribuindo assim para o declínio cognitivo observado na DA (Talbot *et al.*, 2012).

A hiperglicemia crônica, característica da DMT2, resulta em níveis elevados de glicose no sangue, que podem levar à formação de produtos de glicação avançada (AGEs). Esses AGEs se acumulam no cérebro, promovendo inflamação e estresse oxidativo, ambos prejudiciais aos neurônios (De Felice and Ferreira, 2014a). A hiperglicemia também causa disfunção endotelial, que compromete a barreira hematoencefálica, permitindo a entrada de substâncias tóxicas no cérebro e exacerbando a neurodegeneração (Takeuchi and Yamagishi, 2008). Além disso, tanto a DMT2 quanto a DA estão associadas a um estado inflamatório crônico. No DMT2, a inflamação sistêmica pode levar à ativação de células microgлияis e astrócitos no cérebro, resultando em neuroinflamação, um fator chave na patogênese da DA. O estresse oxidativo resultante da inflamação pode causar danos ao DNA, lipídios e proteínas neuronais, contribuindo para a degeneração neuronal e o declínio cognitivo (De Felice and Ferreira, 2014a).

A dislipidemia caracteriza-se por níveis elevados de triglicerídeos e colesterol LDL, e baixos níveis de colesterol HDL. Essa condição pode levar à aterosclerose, reduzindo o fluxo sanguíneo cerebral e resultando em isquemia cerebral, afetando negativamente a função cognitiva. A disfunção mitocondrial, outra consequência do diabetes, leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos neuronais e sinápticos que contribuem para o declínio cognitivo (Sims-Robinson *et al.*, 2010).

A resistência à insulina também interfere na degradação da proteína amiloide-beta ( $A\beta$ ), resultando em seu acúmulo no cérebro, uma característica patológica da DA. Além disso, pode aumentar a fosforilação da proteína tau, contribuindo para a formação de emaranhados neurofibrilares, outro marco da DA. Essas alterações patológicas são exacerbadas pela inflamação e pelo estresse oxidativo associados à diabetes, criando um ciclo vicioso que promove a neurodegeneração e o declínio cognitivo (Biessels and Despa, 2018a). Esses

mecanismos inter-relacionados destacam a importância do controle glicêmico rigoroso e da gestão de fatores de risco metabólicos na prevenção do declínio cognitivo e na redução do risco de desenvolver doenças neurodegenerativas como a DA.

A demência vascular é particularmente prevalente entre pessoas com diabetes, devido à alta incidência de aterosclerose e microangiopatia diabética (Li *et al.*, 2023). A inflamação sistêmica e o estresse oxidativo contribuem para a disfunção endotelial e a formação de placas ateroscleróticas, que podem levar a eventos cerebrovasculares e isquemia cerebral crônica (An *et al.*, 2023). Esses fatores comprometem a perfusão cerebral e podem resultar em áreas de infarto silencioso ou lacunar, promovendo a degeneração cognitiva.

Uma teoria comum, para o envelhecimento e para a patogênese dessa disfunção cerebral no diabetes, relaciona também a morte celular ao estresse oxidativo mediado por radicais livres (An *et al.*, 2023). Assim, a hiperglicemia reduz os níveis de antioxidantes e aumenta concomitantemente a produção de radicais livres. Esses efeitos contribuem para o dano tecidual no diabetes mellitus, levando a alterações no potencial redox da célula com subsequente ativação de genes sensíveis ao redox (Muriach *et al.*, 2014). No entanto, a possível fonte de estresse oxidativo na lesão cerebral também inclui a autooxidação da glicose, a peroxidação lipídica e a diminuição das concentrações teciduais de antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutatona reduzida (GSH). Além disso, nessas condições patológicas, o estresse celular desencadeia dano oxidativo mitocondrial, que pode resultar em apoptose e/ou necrose. A compreensão da complexa relação entre diabetes e declínio cognitivo é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento (Gudala *et al.*, 2013). A gestão multifacetada do diabetes, incluindo controle rigoroso da glicemia, tratamento de comorbidades como hipertensão e dislipidemia, e intervenções para reduzir a inflamação e o estresse oxidativo, podem ser essenciais para proteger a função cognitiva em pacientes com diabetes. Pesquisas futuras devem continuar a explorar as interações biológicas entre diabetes e demência, com o objetivo de identificar novas abordagens terapêuticas que possam mitigar o impacto desses distúrbios metabólicos no declínio cognitivo.

Além destes fatos, as taupatias, o diabetes mellitus e a doença de Alzheimer, compartilham mecanismos fisiopatológicos relacionados ao metabolismo energético e à disfunção proteica. A hiperfosforilação da proteína tau, que leva à formação de emaranhados neurofibrilares, é uma característica central das taupatias e da DA, enquanto no DM, a resistência à insulina cerebral e a hiperglicemia crônica promovem processos inflamatórios e estresse oxidativo que exacerbam o acúmulo de tau anormal (De Felice and Ferreira, 2014b). A interação entre esses fatores sugere que o DM pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de taupatias.

O estresse oxidativo e a inflamação crônica também são mecanismos comuns entre essas condições. Como mencionado, a hiperglicemia leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, que danificam proteínas e lipídios celulares, contribuindo para a degeneração neuronal. Na DA e nas taupatias, o estresse oxidativo é um dos principais fatores que impulsionam o acúmulo patológico de tau e a disfunção sináptica. A neuroinflamação, mediada por ativação crônica da micróglia e liberação de citocinas pró-inflamatórias, é amplificada pela resistência à insulina e pela deposição de proteínas neurotóxicas (Heneka *et al.*, 2015).

O estudo das conexões entre taupatias, diabetes mellitus e doença de Alzheimer é fundamental para compreender os mecanismos comuns que levam à neurodegeneração e buscar novas abordagens terapêuticas. A partir dessa perspectiva, explorar os processos biológicos compartilhados pode abrir caminhos para intervenções precoces e estratégias terapêuticas inovadoras que não apenas retardem a progressão da neurodegeneração, mas também ofereçam novas possibilidades para o tratamento integrado de doenças metabólicas e neurodegenerativas.

### **2.3 AFM e Espectroscopia Raman no Estudo de Tecidos e Células Cerebrais**

A Microscopia de Força Atômica é uma técnica que permite a obtenção de imagens de alta resolução da topografia de superfícies biológicas em nível nanométrico. Nos últimos anos, o AFM vem sendo utilizado para investigar as propriedades mecânicas de células e tecidos cerebrais, como os estudos mostrados a seguir, o que é crucial para entender as alterações estruturais associadas a doenças neurodegenerativas e outros tipos de doenças. Neste sentido, a técnica tem se destacado como uma ferramenta poderosa nesta área de estudo, proporcionando *insights* cruciais para a compreensão de doenças neurodegenerativas. Porém, destaca-se a ausência de estudos na literatura que visem explorar o tecido cerebral hiperglicêmico, e correlacionar os efeitos da hiperglicemia com declínio cognitivo, que é um dos objetivos deste trabalho.

A Microscopia de Força Atômica tem se mostrado uma ferramenta valiosa na investigação das propriedades mecânicas de tecidos cerebrais. Por exemplo, o estudo de Liu e colaboradores (Liu *et al.*, 2024), utilizando AFM, revelou que tecidos corticais de pacientes com doença de Alzheimer apresentam menor rigidez em comparação com tecidos saudáveis, possivelmente devido a edema e desmielinização. Além disso, Bouchonville e colaboradores (Bouchonville *et al.*, 2016) utilizaram o AFM para mapear as propriedades elásticas de tecidos cerebrais, identificando gradientes de rigidez na escala de micrômetros. Para alcançar esse objetivo, os autores realizaram medições de indentação *in vitro* em tecidos seccionados da glândula pituitária humana, ou hipófise, utilizando AFM. Este estudo mostrou que variações

mecânicas podem influenciar significativamente o comportamento celular, incluindo o ciclo de vida, diferenciação e potencial tumorigênico. Recentemente, o AFM foi combinado com técnicas de fluorescência para explorar as propriedades mecânicas de regiões cerebrais normais e isquêmicas em modelos de camundongos, no estudo de Fuhs e colaboradores (Fuhs *et al.*, 2023). Essa abordagem integrada permitiu uma análise mais detalhada das alterações biomecânicas associadas a condições patológicas, oferecendo *insights* valiosos para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas.

A Espectroscopia Raman também tem se mostrado uma ferramenta promissora na análise de células e tecidos cerebrais, oferecendo uma abordagem não invasiva para estudar as mudanças bioquímicas e estruturais associadas a diversas condições neurológicas. Esta técnica baseia-se na dispersão inelástica da luz para fornecer uma "impressão digital" molecular dos tecidos, permitindo a detecção de alterações patológicas em nível celular e subcelular (Ryzhikova *et al.*, 2021). No estudo das doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, a Espectroscopia Raman tem sido utilizada para identificar e caracterizar depósitos de beta-amiloide e agregados de proteína tau, fornecendo *insights* sobre os mecanismos de formação e progressão desses agregados patológicos (Ramos and Lee, 2024). Além disso, estudos recentes aplicaram a Espectroscopia Raman para investigar os efeitos do diabetes mellitus no corpo humano, como diminuição da intensidade das bandas de triptofano ( $545\text{ cm}^{-1}$ ), fenilalanina ( $605\text{ cm}^{-1}$ ), polissacarídeos ( $714\text{ cm}^{-1}$ ) no tecido sanguíneos em pacientes com diabetes mellitus, revelando mudanças nas assinaturas vibracionais que refletem a resistência à insulina e outras disfunções metabólicas associadas ao declínio cognitivo (Loyola-Leyva *et al.*, 2020). A capacidade da Espectroscopia Raman de fornecer informações detalhadas sobre a composição molecular dos tecidos cerebrais faz dela uma ferramenta valiosa na pesquisa de doenças neurodegenerativas e metabólicas, potencialmente contribuindo para o desenvolvimento de novos biomarcadores diagnósticos e terapias direcionadas.

No que diz respeito à utilização da espectroscopia Raman em tecidos cerebrais, em um dos primeiros estudos realizados, Chen e colaboradores (Chen *et al.*, 2009a) investigaram o tecido do hipocampo cerebral de animais afetados pela doença de Alzheimer. Os autores encontraram alterações bioquímicas no tecido do hipocampo cerebral doente, incluindo o depósito de  $\beta$ -amilóide, relacionado ao modo em  $1670\text{ cm}^{-1}$ , permitindo uma primeira abordagem dessa vertente de estudo. Mais recentemente, Hashimoto e colaboradores (Hashimoto *et al.*, 2018) usaram a espectroscopia Raman para diferenciar células neuronais excitatórias e inibitórias intactas devido às diferenças em suas atividades elétricas. Os autores observaram que as bandas de hidroxiprolina e prolina são observadas nos coeficientes de

regressão ponderados, sugerindo que os neurônios excitatórios e inibitórios têm diferenças nas estruturas de seus filamentos intermediários que compõem seus citoesqueletos.

O estudo de Sudworth e Krasner (Sudworth and Krasner, 2004) demonstrou que a espectroscopia Raman é uma técnica eficaz para diferenciar entre tecidos cerebrais saudáveis e aqueles afetados pela doença de Alzheimer. Eles observaram que os espectros Raman dos tecidos afetados apresentavam assinaturas moleculares distintas, particularmente relacionadas a alterações na composição de proteínas e lipídios, especialmente em termos de intensidade de pico e a presença de uma banda de amida I mais forte na região de  $1667\text{ cm}^{-1}$  que ocorre mais proeminentemente no tecido doente. Os autores destacaram o potencial da espectroscopia Raman como uma ferramenta complementar na pesquisa de biomarcadores e no desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas para a doença.

Neste mesmo sentido, a espectroscopia Raman foi aplicada por Rivas-Arancibia e colaboradores (Rivas-Arancibia *et al.*, 2017) para evidenciar alterações na banda amida I nos espectros de hipocampos de ratos submetidos à exposição crônica ao ozônio, considerado um possível fator de risco para a doença de Alzheimer. Foi observado um aumento no conteúdo de folhas  $\beta$ , indicado por um crescimento no pico localizado em aproximadamente  $1670\text{ cm}^{-1}$  na banda de amida I.

Kopec e colaboradores (Kopec *et al.*, 2024) utilizaram a Espectroscopia Raman para investigar alterações metabólicas causadas pela glicose em células cerebrais humanas normais (astrócitos) e cancerosas (astrocitoma e glioblastoma). Foram identificados biomarcadores metabólicos em gotículas lipídicas, mitocôndrias e núcleo, analisando vibrações específicas. A análise revelou diferenças vibracionais que distinguem células normais e cancerosas, suplementadas ou não com glicose, correlacionando concentrações de citocromo, lipídios e proteínas ao grau de malignidade.

Observa-se na literatura alguns trabalhos que estudam, de forma isolada, tecidos e células cerebrais com doenças neurodegenerativas. Entretanto, não há estudos que abordam a relação entre hiperglicemia e demência, do ponto de vista biofísico e vibracional. Esta tese apresenta uma vasta revisão na literatura acerca do uso do AFM em tecidos, células e proteínas que estão envolvidas no contexto das taupatias, além de apresentar uma abordagem inovadora do estudo da correlação entre demência e hiperglicemia no tecido do hipocampo, possibilitando contribuições pertinentes em uma área que ainda carece de estudos utilizando técnicas que são ferramentas essenciais na pesquisa de doenças neurodegenerativas. Para isso, fez-se uso da Microscopia de Força Atômica e a Espectroscopia Raman como ferramentas para análise de propriedades vibracionais e ultraestruturais, como topografia, rugosidade, área e volume, além do estudo de propriedades nanomecânicas, como adesão e módulo de Young, de tecido de

hipocampo hiperglicêmicos e normoglicêmicos. Esta análise é pioneira, contribuindo para novos conhecimentos acerca da relação entre demência e Diabetes.

## **Parte I**

### **MICROSCOPIADE FORÇA ATÔMICA APLICADA AO ESTUDO DE TAUPATIAS**

**Artigo de revisão publicado na revista ASC Chemical Neuroscience**

**Doi:** <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.3c00819>

## Capítulo 3

### 3.1 Introdução

A Microscopia de Força Atômica é uma técnica versátil e robusta de Microscopia de Varredura por Sonda (SPM) desenvolvida em 1986 por Binnig, Quate e Gerber (Binnig, Quate and Gerber, 1986a). Métodos de SPM revolucionaram o campo da microscopia ao utilizar sondas afiadas para mapear as superfícies em estudo, em vez de usar luz como mecanismo de sondagem (Bian *et al.*, 2021a). O primeiro AFM comercial foi introduzido em 1989. A técnica permite a análise de qualquer tipo de material, orgânico ou não, fornecendo informações sobre suas propriedades mecânicas e ultraestruturais em escala atômica (Marrese, Guarino and Ambrosio, 2017). Esta técnica impulsionou avanços significativos na biofísica e na ciência dos materiais.

Desde seu desenvolvimento, a técnica que utiliza o AFM tem sido usada na caracterização de superfícies de materiais não biológicos (Kasas and Dietler, 2008). Embora suas principais aplicações também sejam focadas em estudos de nanotecnologia e ciência dos materiais, a AFM ganhou popularidade para estudar materiais biológicos desde sua invenção (Kasas and Dietler, 2008; Last *et al.*, 2010). Nesse sentido, o uso desse equipamento na biologia e na medicina está se tornando cada vez mais fundamental, contribuindo significativamente nessa área (Chang *et al.*, 2012).

Weisenhorn e colaboradores (Weisenhorn *et al.*, 1993) empregaram medições de curvas de força versus distância no AFM para analisar células macias em uma de suas primeiras aplicações em sistemas biológicos, demonstrando a capacidade de quantificar a elasticidade local e a nanoindentação de tais amostras. Este trabalho provou que a altura de uma amostra macia nas imagens de AFM é frequentemente baixa devido à deformação da amostra e à superestimação da força aplicada. Na mesma direção, o estudo de Radmacher (Rianna and Radmacher, 2017) demonstrou como usar o AFM para mapear a rigidez de vários materiais biológicos, incluindo células vivas, utilizando a grande sensibilidade e precisão desse equipamento, revelando novas percepções sobre processos de migração e diferenciação celular. Explorando diferentes propriedades em células, o AFM foi empregada por Goldmann e colaboradores (Goldmann *et al.*, 1996) no estudo da adesão celular, focando no envolvimento da proteína vinculina, apresentando uma visão integrada do papel dessa proteína na matriz. O estudo reológico de células e tecidos foi realizado por Alcaraz e colaboradores (Alcaraz *et al.*, 2003) através do AFM, mostrando uma abordagem inovadora para estudar a viscoelasticidade de sistemas biológicos. Os resultados reológicos mostraram, em resumo, que células alveolares

e brônquicas exibem comportamento elástico em baixas frequências, e células epiteliais pulmonares exibiram uma resposta semelhante à de materiais vítreos macios. Isso possibilitou estudar as características fundamentais da organização celular de tais sistemas.

O trabalho de Lekka e colaboradores (Lekka *et al.*, 1999) utilizando o AFM demonstrou que o módulo de Young de células normais era quase uma ordem de magnitude maior do que o das células cancerígenas nas aplicações iniciais. Isso se deve a diferenças no arranjo dos citoesqueletos celulares. O AFM mostrou ser uma ferramenta versátil, permitindo que biomoléculas individuais sejam visualizadas e até modificadas ao extrapolar as aplicações de uma abordagem de imagem. Drake e colaboradores (Drake *et al.*, 1989), por exemplo, observaram a polimerização da fibrina, o bloco de construção dos coágulos sanguíneos, demonstrando a capacidade da AFM de expor características delicadas dos processos biológicos em tempo real. Esses estudos mudaram o uso do AFM na biologia e inspiraram inúmeras investigações subsequentes no campo.

O uso do AFM no estudo de sistemas biológicos cresceu significativamente, demonstrando que o uso dessa técnica para nanotecnologia contribuiu para o avanço da medicina moderna, favorecendo a compreensão dos mecanismos moleculares de várias doenças, sua patogênese e o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos. A forma e a mecânica dos tecidos, por exemplo, são críticas para regular a função dos órgãos. O AFM pode capturar imagens de alta resolução e conectá-las com propriedades mecânicas e viscoelásticas, tornando-a uma ferramenta ideal para estudar células sanguíneas (Amorim *et al.*, 2022a), células cancerígenas (Rianna and Radmacher, 2017; Diniz Filho *et al.*, 2023) e partículas virais (de Araujo Dorneles *et al.*, 2022a), entre outros sistemas biológicos (Rates *et al.*, 2022a). Vale ressaltar que a AFM pode ser utilizada nas circunstâncias fisiológicas de células ou biomoléculas. Ela não exige preparação complexa da amostra, o que justifica sua aplicação em sistemas biológicos.

Dessa forma, o AFM e sua capacidade de caracterização nanomecânica de amostras biológicas emergem como uma ferramenta poderosa para estudar vários sistemas biologicamente relevantes, destacando-se as taupatias. Taupatias são definidas como grupos heterogêneos de doenças neurodegenerativas onde depósitos da proteína tau mal dobrada se acumulam em células neuronais e/ou gliais, resultando eventualmente em morte celular precoce acompanhada de demência e/ou parkinsonismo (Zhang *et al.*, 2022). A doença de Alzheimer destaca-se como a taupatia mais prevalente atualmente (Tahami Monfared *et al.*, 2022).

No cérebro, a proteína tau é predominantemente encontrada em neurônios. No entanto, ela também pode ser encontrada na glia e na matriz extracelular, mesmo em baixos níveis e com funções ainda elusivas (LoPresti *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 2014). O papel fisiológico

mais bem compreendido da proteína tau é aquele que a associa aos microtúbulos, montando e regulando a instabilidade dinâmica dos microtúbulos em axônios neuronais, garantindo sua integridade estrutural (Mandelkow and Mandelkow, 2012; Barbier *et al.*, 2019). Além disso, a tau é essencial para a alongação, maturação e transporte axonal (Knops *et al.*, 1991; Stamer *et al.*, 2002).

Portanto, este trabalho visa destacar as aplicações mais recentes do AFM no estudo das taupatias, explorando as principais contribuições que esta técnica pode oferecer para entender as alterações celulares em nível nanoscópico e os mecanismos fisiopatológicos dessas doenças, bem como métodos diagnósticos. Esperamos mostrar as vertentes dos estudos utilizando o AFM, demonstrando que essa técnica ainda permitirá muitas descobertas notáveis com impactos relevantes nos estudos das taupatias e outras doenças neurodegenerativas.

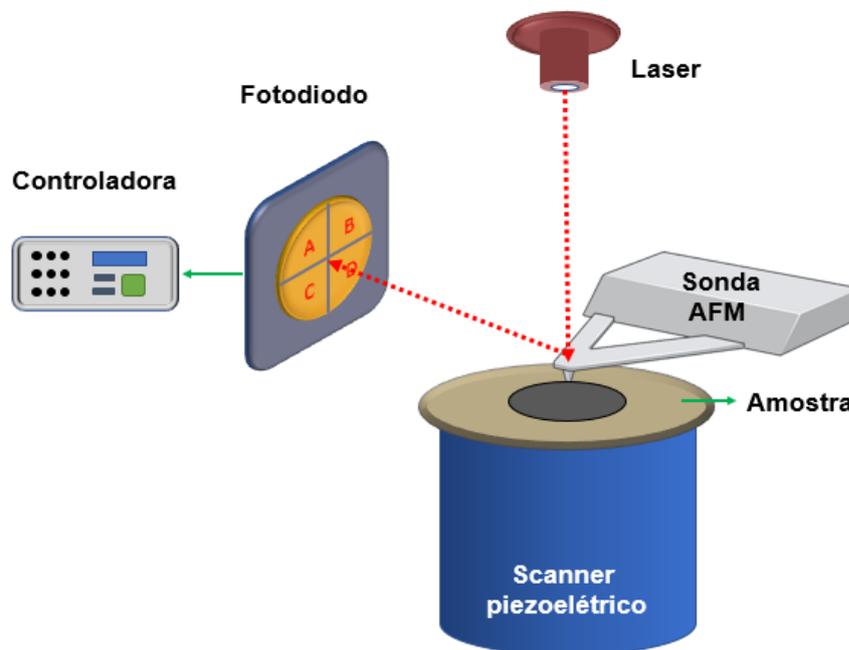
### **3.2 Microscopia de Força Atômica**

Uma linha do tempo da evolução das técnicas de microscopia de varredura por sonda começa com a criação da Microscopia de Varredura por Túnel (STM), uma técnica precursora desenvolvida por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer em 1981, ambos laureados com o Prêmio Nobel de Física em 1986. O STM utiliza o princípio de tunelamento quântico dos elétrons e atua medindo os valores de corrente entre a ponta da sonda e a amostra em estudo (Binnig *et al.*, 1982). Devido à limitação do STM, que analisa apenas amostras condutivas, foi considerada uma mudança de abordagem. Assim, a força entre a ponta da sonda e os átomos da amostra começou a ser medida. Esta nova técnica foi chamada de Microscopia de Força Atômica. Esta técnica tornou possível o estudo de todos os tipos de materiais, pois não utiliza correntes de tunelamento, mas sim forças para estudar superfícies. Além disso, a excelente relação sinal-ruído em resolução nanométrica levou ao desenvolvimento de diversas abordagens relacionadas ao AFM, permitindo também o estudo de amostras em diferentes ambientes. Estas abordagens utilizam uma variedade de sondas e modos de operação para detectar, por exemplo, interações físicas, químicas e biológicas localmente (Xia and Youcef-Toumi, 2022).

AFM baseia-se na medição de forças entre uma pequena ponta (normalmente de alguns nanômetros de tamanho) e a superfície da amostra e, posteriormente, na sua transformação em uma imagem que revela as características topográficas tridimensionais da superfície da qual são extraídas propriedades mecânicas, elétricas e magnéticas (Sarid, 1994a). As sondas geralmente são feitas de silício, dióxido de silício ou nitreto de silício, que são produzidos por meio de processos de nanofabricação (Tortone, 1997; Dzedzickis *et al.*, 2023a). Neste cenário, as

forças de interação podem ser de van der Waals, eletrostáticas, magnéticas ou outras interações dependendo da natureza da amostra e da ponta (Sarid, 1994a). Os principais componentes que compõem um AFM são uma sonda (cantilever e ponta), scanner piezoelétrico, que movimentam a amostra ou cantilever em três direções, laser, fotodetector e computador para controle do sistema, armazenamento dos dados produzidos pelo fotodetector e conversão desses dados em mapas topográficos tridimensionais (Voigtländer, 2019a). A disposição desses componentes está esquematizada na Figura 3.1.

Inicialmente, a sonda é colocada próxima à superfície da amostra. Quando a distância é pequena o suficiente para que dipolos elétricos sejam induzidos ou para que dipolos existentes interajam, forças elétricas atrativas entre a sonda e os átomos da amostra se manifestam. A atração aumenta até atingir um limite máximo, o que ocorre quando a sonda chega muito perto da amostra. Após certa distância, uma força repulsiva proveniente da superposição eletrônica dos átomos do par sonda/amostra passa a atuar, impedindo a superposição espacial dos átomos destas superfícies. A repulsão é consequência do princípio de exclusão de Pauli, fenômeno físico que impede que dois elétrons ocupem simultaneamente o mesmo estado quântico.



**Figura 3.1: Esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica com seus componentes.** A sonda AFM varre fibras de proteína tau com o auxílio do scanner piezoelétrico. A detecção da deflexão do cantilever é avaliada pela reflexão do laser na parte traseira do cantilever, que é enviado ao detector de 4 quadrantes, identificando variações horizontais e verticais do sinal. Os sinais são convertidos em mapas topográficos a partir dos quais são obtidas as propriedades físicas da superfície.

A ponta é fixada na parte inferior do cantilever, no lado oposto da superfície refletora. Sob forças atrativas e repulsivas, o cantilever deforma-se, alterando o ângulo da superfície espelhada e, conseqüentemente, o ângulo de reflexão do laser. Um detector de quatro fotocélulas independentes capta a luz do laser, produzindo uma diferença de potencial (PDD) através do efeito fotovoltaico. Conforme visto na Figura 3.1, as duas fotocélulas superiores são rotuladas como A e C, e as duas inferiores são rotuladas como B e D. A diferença entre a soma das duas células superiores menos a soma das duas células inferiores é utilizada para rastrear a deflexão vertical do cantiléver. Quando o ponto do laser percorre o detector, o sistema de feedback ajusta o atuador piezoelétrico ao longo do eixo Z para corrigir o desvio da deflexão do cantilever em relação ao ponto de ajuste predefinido. Cada pixel é detectado como um deslocamento vertical do scanner, gerando um mapa topográfico da amostra (Voigtländer, 2019b).

Conforme mencionado, o AFM mede as forças entre o par sonda-amostra. Estas forças dependem da natureza deste par, da distância entre eles, da geometria da ponta e de qualquer contaminação na superfície da amostra. Durante o processo de digitalização, os átomos na extremidade da ponta interagem com aqueles na superfície da amostra, imediatamente abaixo ou perto dela. Como o cantilever funciona como uma mola, a força aplicada por ele obedece à lei de Hooke:  $F = kd$ , onde  $k$  é a constante elástica do cantilever e  $d$  é sua deflexão (Sarid, 1994a). Dada a constante de mola de um cantilever, as deflexões medidas são convertidas para forças de ponta/amostra. Portanto, o primeiro passo para fazer medições precisas de força é determinar a constante de mola do cantilever a ser usada. Os métodos Sader e de ruído térmico são as opções mais populares (Sumbul *et al.*, 2020). O método de ruído térmico baseia-se na análise das flutuações térmicas espontâneas do cantilever, causadas pelo movimento browniano. Essas oscilações são registradas por meio da densidade espectral de potência (PSD) e ajustadas a um modelo de oscilador harmônico amortecido. Aplicando a equipartição da energia térmica, é possível determinar  $k$  com alta precisão, sem necessidade de contato ou forças externas. O método de Sader estima a constante de mola  $k$  do cantilever com base na hidrodinâmica de placas oscilantes em meio fluido. Ele utiliza a frequência de ressonância ( $f_0$ ) e o fator de qualidade ( $Q$ ) do cantilever, além de suas dimensões (comprimento, largura e espessura). A partir desses parâmetros e da impedância do fluido, aplica-se a equação de Sader para determinar a constante de mola. Esse método é particularmente útil para cantilevers operando em meios gasosos ou líquidos, evitando contato físico e possíveis danos ao dispositivo. Sua principal vantagem é a não interferência direta na amostra, garantindo medições mais seguras. No entanto, a precisão depende da exatidão na medição das dimensões

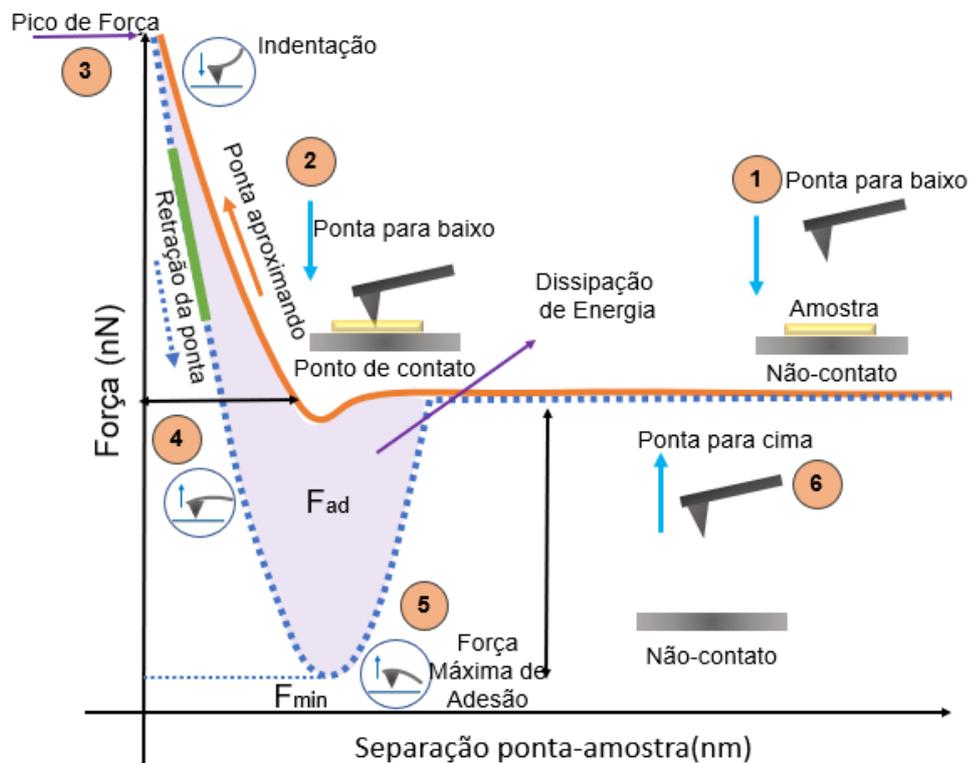
do cantilever e da correta modelagem dos efeitos hidrodinâmicos. Pequenos erros na caracterização do fluido ou nas propriedades geométricas podem levar a desvios nos valores de  $k$ . (Song *et al.*, 2015; Voigtländer, 2019c). A ponta e o cantilever podem ser modificados para usos mais complexos. Por exemplo, a forma e o material da ponta podem ser alterados para imagens de amostras de alta proporção com ponta afiada, nanoindentação com ponta esférica, revestimento reflexivo de ouro para melhorar a detecção de laser ou mapear propriedades elétricas com ponta condutiva, e até mesmo ser funcionalizado com material biológico para verificar interações específicas, como determinadas proteínas (Stamer *et al.*, 2002; Ebner, Wildling and Gruber, 2019).

### 3.2.1 Curvas de Força

A curva de força é a principal ferramenta para medir as características físicas das amostras examinadas pelo AFM. As curvas força-distância podem ser medidas deslocando o cantilever para uma frequência bem abaixo de sua ressonância fundamental (fora de ressonância) ou para uma frequência que coincide ou está muito próxima de sua ressonância fundamental (em ressonância) (Garcia, 2020). As forças podem ser atrativas ou repulsivas dependendo da distância entre a ponta e a amostra. Interações como as forças de van der Waals são predominantes em longas distâncias, resultando em forças de atração. Os orbitais de elétrons entre a ponta e a amostra se sobrepõem em distâncias curtas, resultando em forças repulsivas (Bergmann *et al.*, 2013).

Várias informações podem ser obtidas a partir da relação entre a distância sonda-amostra e as forças predominantes nessas distâncias, como característica de hidrofobia, hidrofília, características eletrostáticas, módulo de Young, dissipação de energia e muitas outras características físicas da superfície da amostra podem ser obtidas a partir de uma curva de força (Garcia, 2020). As curvas força-distância (separação ponta-amostra) obtidas através de uma medição de espectroscopia de força AFM evidenciam o comportamento da interação ponta-amostra. A Figura 3.2 mostra a representação esquemática de uma curva de força genérica durante cada ponto de um ciclo de aproximação-retirada da sonda AFM da superfície da amostra e como se pode identificar a partir desta curva algumas das forças de interação que podem estar presentes, como adesão, forças elásticas e dissipativas. O eixo horizontal mostra a distância de separação entre a sonda e a amostra. Em contraste, a força cantilever é plotada no eixo vertical e a distância aumenta à medida que a sonda se aproxima da amostra.

Durante o processo de aquisição de uma curva de força, a sonda aproxima-se da superfície da amostra (curva laranja) desde uma certa distância (tamanho da rampa) até atingir a superfície da amostra (onde se inicia o regime de forças repulsivas). A partir desse ponto, a sonda aplica uma força previamente determinada na superfície da amostra (força de disparo), atingindo o pico de força ao iniciar o ciclo de retração (curva pontilhada azul). Quando a sonda se retrai da superfície da amostra, ela eventualmente encontra resistência para sair dela, o que induz uma deflexão do cantilever para baixo (valores de força negativos). Esta região de forças negativas da curva de força corresponde às forças adesivas (área roxa). A força máxima de adesão corresponde ao valor mais negativo da força ( $F_{min}$ ).



**Figura 3.2:** Esquema gráfico de uma curva típica de força/separação, mostrando a curva de aproximação em laranja e a curva de retração, linha pontilhada em azul. No ponto 1, a sonda está na região sem contato, aproximando-se da amostra. No ponto 2 ocorre o contato entre a sonda e a superfície. No ponto 3, encontra-se o ponto de pico de força, onde a sonda recua na amostra. A partir do ponto 4, a sonda se afasta da superfície devido ao predomínio de forças repulsivas. No ponto 5, encontra-se o ponto de força mínima e a região de adesão máxima, onde a sonda se desprende da amostra. A região roxa representa a histerese e é a soma das forças dissipativas e de adesão. No ponto 6 a sonda está na região sem contato, afastando-se da superfície da amostra.

Geralmente, as forças de adesão estudadas no AFM combinam forças eletrostáticas, de van der Waals, capilares e devidas a ligações químicas (Sadegh Hassani, Daraee and Sobat, 2021). Na obtenção do valor das forças de adesão das amostras, observa-se que, durante a retração, o cantilever, sofre uma deflexão negativa até que sua força total supere as forças de adesão, perdendo contato com a superfície da amostra. Utilizando estas características gerais, a adesão das amostras pode ser deduzida quantitativamente de duas maneiras diferentes: i) tomando o valor máximo da força de adesão entre a ponta e a amostra (valor mais negativo da deflexão) e ii) calculando o trabalho realizado pelas forças adesivas. O trabalho é obtido calculando-se a área da curva de deflexão/deslocamento em sua porção de deflexão negativa (parte correspondente às forças adesivas) (Voigtländer, 2019d; Sadegh Hassani, Daraee and Sobat, 2021).

Estas curvas também calculam propriedades como elasticidade e viscosidade aparente, fornecendo mapas quantitativos destas magnitudes. Para investigar o módulo de elasticidade das curvas de força, a literatura (Dimitriadis *et al.*, 2002; Dokukin and Sokolov, 2012; Hermanowicz, 2021) considera diferentes modelos, como Hertz, Sneddon, Oliver Phar ou DTM. Para amostras viscoelásticas, que é o caso da maioria das amostras biológicas, a resposta da força que atua no cantilever é composta por um componente elástico e um componente viscoso ( $F_T = F_{el} + F_v$ ), de modo que o trabalho realizado pelo cantilever é parcialmente perdido por atrito interno do próprio material, gerando uma histerese no ciclo de aproximação/retração da curva de força (Sadegh Hassani, Daraee and Sobat, 2021).

### 3.2.2 AFM em Sistemas Biológicos

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) permite a investigação de sistemas biológicos em nanoescala e com alta resolução, sendo uma importante ferramenta em biofísica com diversas aplicações. Quantificar as características biofísicas de sistemas biológicos complexos ainda é um desafio devido às suas características heterogêneas e altamente dinâmicas, como montagem de proteínas em membranas celulares, adesão celular e migração. Além disso, como os sistemas biológicos são sensíveis a vários parâmetros, como temperatura, umidade, pressão, eletrólitos, pH e oxigênio (Voigtländer, 2019d), uma análise necessita de modificações minuciosas nas condições ambientais. Como afirmado anteriormente, as propriedades do AFM tornam-no um instrumento crucial no estudo de sistemas biológicos, permitindo a análise biomecânica de tais sistemas.

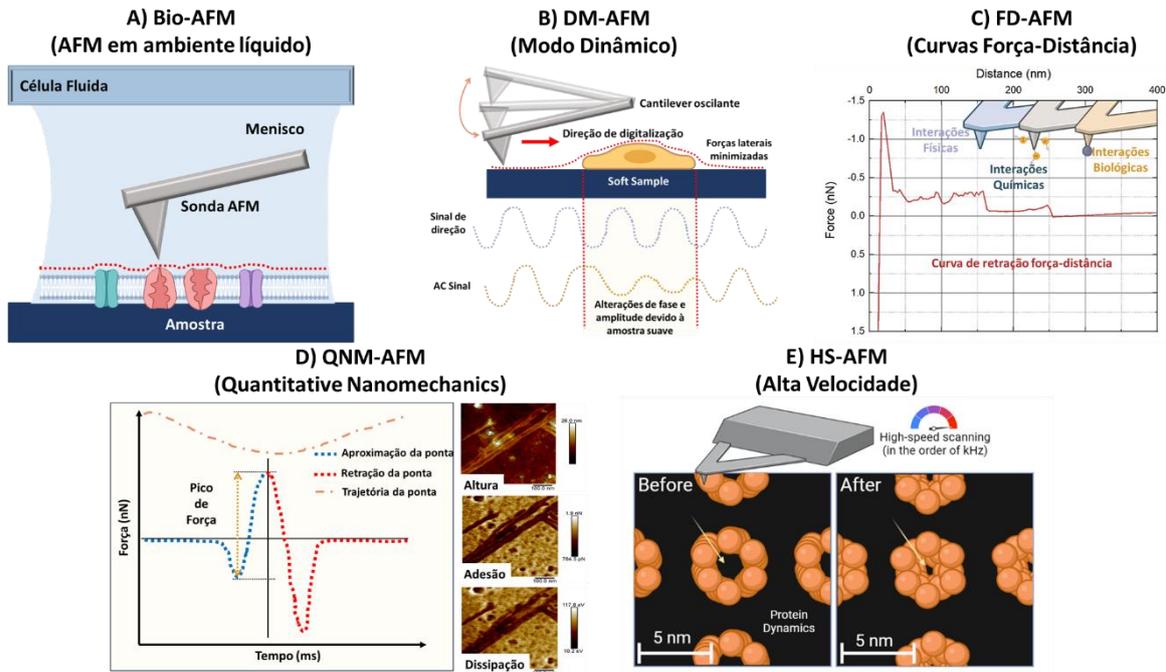
O AFM permite a caracterização de amostras biológicas, incluindo células, tecidos, proteínas, DNA e outras biomoléculas, com resolução em nanoescala (Dufrêne *et al.*, 2017).

Isso fornece *insights* sobre a topografia de sua superfície, estrutura, propriedades mecânicas e outras propriedades físicas, críticas para a compreensão de suas funções e comportamentos em processos biológicos. Além disso, o AFM permite estudos em tempo real e *in situ* de amostras biológicas em seus ambientes nativos, inclusive em condições líquidas ou fisiológicas. Isso permite a investigação de processos biológicos dinâmicos com alta resolução espacial e temporal, como adesão celular (Goldmann *et al.*, 1996), interações de membrana (Lopes, no date), dobramento de proteínas (Yang *et al.*, 2021) e reconhecimento molecular (Amyot and Flechsig, 2020). O AFM também pode ser usado para estudar os efeitos de vários estímulos externos, como temperatura (Heath and Scheuring, 2019), pH (Magazzù and Marcuello, 2023) e tratamentos químicos (Busnel *et al.*, 2007), em amostras biológicas, fornecendo informações valiosas sobre suas respostas e propriedades. Curiosamente, o AFM pode ser combinado com outras técnicas espectroscópicas e de imagem, como microscopia de fluorescência (Becerra *et al.*, 2021), espectroscopia Raman (Bussetti *et al.*, 2023) e espectroscopia no infravermelho (Dazzi *et al.*, 2012), para fornecer informações complementares sobre amostras biológicas. Isso permite a correlação das propriedades estruturais, mecânicas e químicas das amostras biológicas, caracterizando de forma abrangente suas propriedades e funções.

Para caracterizar as superfícies em estudo, o AFM possui diferentes modos, com e sem contato. No modo de contato, a deflexão do cantilever é medida quando a ponta do AFM está em contato físico com a amostra na região de forças repulsivas (Sadegh Hassani, Daraee and Sobat, 2021). Neste modo, o cantilever oscila próximo à superfície da amostra e a frequência de ressonância é ligeiramente menor que a frequência de oscilação. Esse último modo não seria adequado para amostras biológicas, pois estariam sujeitas a forças de cargas elevadas (Xia and Youcef-Toumi, 2022). No modo conhecido como modo de deflexão contínua ou modo de força constante, o sistema de *feedback* altera a altura  $z$  para manter uma deflexão constante e uma força de carregamento para imagens de amostras suaves. Além disso, a altura do cantilever pode ser modificada dependendo da frequência de ressonância do cantiléver, utilizando o modo de toque, amplamente utilizado no estudo de biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios. Assim como o modo de deflexão de contato, o modo de toque gera imagens de erro de altura e amplitude (Stan and King, 2020). No que diz respeito ao estudo e caracterização de sistemas biológicos, alguns outros modos de operação do AFM foram importantes para o avanço desta área de pesquisa.

A Figura 3.3 mostra alguns painéis representativos dos modos de operação do AFM que são úteis para o estudo de sistemas biológicos. Uma das melhorias mais significativas nesta tecnologia direcionada a aplicações biológicas, por exemplo, combina um sistema de detecção óptica e célula de fluido que permite a operação em modo de contato AFM em solução aquosa

(Bio-AFM) (Amyot and Flechsig, 2020), conforme mostrado na Figura 3.3A. Outra técnica importante desenvolvida foi o Modo AFM Dinâmico (DM-AFM) (Song and Bhushan, 2008), que oscila a ponta do AFM para reduzir as forças laterais enquanto contorna a amostra biológica, conforme ilustrado na Figura 3.3B. Este método pode permitir a investigação de amostras biológicas delicadas e não fortemente aderidas a um substrato, por exemplo. Medições de AFM baseadas na curva força-distância (FD-AFM) (Garcia, Guerrero and Garcia, 2020) é outra técnica importante para explorar as propriedades de amostras biológicas, que contorna a superfície de um sistema biológico enquanto registra uma curva força-distância completa pixel por pixel, sendo uma das mais utilizadas (Figura 3.3C). A partir daqui, características como viscoelasticidade e adesão poderiam ser investigadas local e quantitativamente (Ganser *et al.*, 2018). Porém, uma limitação desse modo de operação é o longo tempo de aquisição das curvas de força, resultando em mapas de força com baixa resolução. Superando essa limitação, o modo Nanomecânica Quantitativa de Força de Pico (QNM-AFM) (Xu *et al.*, 2018) é uma técnica não destrutiva, proporcionando controle extremamente preciso do pico em curvas de força-distância, minimizando forças laterais, combinando modo dinâmico e técnicas de curva de força, com um frequência de aquisição de curvas da ordem de kHz, permitindo a aquisição de um grande número de curvas em menor tempo, resultando em mapas de força de alta resolução, ideais para investigação de processos biológicos (Figura 3.3D). Na mesma direção, o AFM de alta velocidade (HS-AFM) (Casuso, Redondo-Morata and Rico, 2020), que acelera o tempo de aquisição de imagens em aproximadamente 1000 vezes, fornece acesso a processos dinâmicos em processos biológicos, como a dinâmica dos canais proteicos (Heath and Scheuring, 2019), conforme mostrado na Figura 3.3E.



**Figura 3.3:** Esquema dos principais modos de operação do AFM utilizados no estudo de sistemas biológicos. A) AFM Biológico (Bio-AFM). B) Modo AFM Dinâmico (DM-AFM). C) Curva força-distância (FD-AFM). D) *Peak Force Quantitative Nanomechanics* (QNM-AFM). E) AFM de alta velocidade (HS-AFM).

Com esses aspectos variados, o AFM tem sido amplamente utilizado em estudos biofísicos para investigar diversos processos e fenômenos biológicos, incluindo adesão celular, dinâmica de membrana, interações proteína-proteína, dobramento e desdobramento de proteínas, interações DNA-proteína, e muitos outros. Os dados derivados de AFM podem ser usados para obter medições quantitativas, como curvas de força-distância, mapas de rigidez e forças de adesão, que podem ser usadas para desenvolver e testar modelos e teorias biofísicas. Em particular, destaca-se aqui a capacidade do AFM de estudar a superfície de sistemas biológicos que operam em meios líquidos e sob condições fisiológicas. A técnica também permite a obtenção de dados com resolução nanométrica, possibilitando o estudo de proteínas isoladas, por exemplo, sem fixação química ou marcação (Yang *et al.*, 2021). O Microscópio de Força Atômica também permite aos usuários alterarem os modos de operação para estudar uma propriedade mecânica de interesse. Por exemplo, o AFM foi usado para analisar o módulo de Young de várias células (Fujii *et al.*, 2019; Ansardamavandi *et al.*, 2020; Garcia, Guerrero and Garcia, 2020; Offroy *et al.*, 2020). O módulo de Young e outros parâmetros físicos estão ligados a marcadores biomecânicos da função celular saudável. Qualquer alteração leva a uma melhor compreensão da patologia.

Também enfatiza a função crítica da análise da curva força-distância na investigação de materiais biológicos, onde podem ser obtidas propriedades mecânicas quantitativas dos sistemas em estudo. Nesse sentido, a rigidez das células tumorais na mama e nos tecidos adjacentes foi investigada para compreender melhor a mecânica celular e tecidual dos tumores malignos (Pratt, Lee and Martin, 2020). De acordo com os achados deste estudo, os tecidos tumorais são substancialmente mais rígidos do que as células tumorais isoladas. Isto demonstra a capacidade da AFM de explorar doenças do ponto de vista biofísico. Tang, Ruan, Zeng, Chen, Wang e Yang (Yang *et al.*, 2021) investigaram as propriedades biomecânicas de tecidos tumorais de próstata utilizando AFM nesta linha de pesquisa. Os pesquisadores confirmaram que a elasticidade e a viscosidade dos tecidos diminuem à medida que aumenta o grau da doença. Esses estudos demonstram como o uso da curva de força AFM para compreender as características biomecânicas dos tecidos doentes pode fornecer um parâmetro para a distinção clínica e o diagnóstico do tecido tumoral. A este respeito, o estudo de Viljoen e colegas (Viljoen *et al.*, 2021) indica uma estreita relação entre força, mecânica e função em células vivas, contribuindo para o desenvolvimento da mecanobiologia. O artigo também descreve como usar a espectroscopia de força baseada em AFM para investigar a estabilidade e a dinâmica da adesão celular do nível celular ao molecular.

Experimentos com microrreologia de altas frequências são outra ferramenta interessante para examinar a resposta viscoelástica celular. Esta técnica permite a compreensão da dinâmica celular incomum. Rigato e colaboradores (Rigato *et al.*, 2017) utilizaram uma faixa de frequência de 1 Hz a 100 kHz para esse método. Eles investigaram a viscoelasticidade de tipos celulares distintos que foram influenciados pela terapia medicamentosa do citoesqueleto. A resposta viscoelástica das células varia substancialmente dependendo da condição organizacional do citoesqueleto. Células cancerígenas benignas e malignas formaram uma impressão digital mecânica discreta com leis de escala significativamente divergentes em altas frequências.

A detecção precoce de doenças humanas é uma tarefa importante para estudos biomédicos. Os estudos de diagnóstico baseados em nanotecnologia que empregam métodos de detecção molecular estão em ascensão. AFM é uma ferramenta atraente nesta área e pode ser utilizada para detecção altamente sensível de moléculas, auxiliando no diagnóstico e compreensão da gênese da doença. Exemplificando o exposto, sabe-se que o diagnóstico laboratorial da Dengue por meio de testes sorológicos e virológicos é caro, requer vários dias para incubação e ainda apresenta diversas reações cruzadas (por exemplo, Covid-19 e Zika vírus), levando a resultados falso-positivos ou negativos (Kao *et al.*, 2005; Langerak *et al.*, 2019; Harapan *et al.*, 2021). Levando isso em consideração, os pesquisadores fabricaram um

dispositivo a partir de um conjunto de nanofios de silício piezoresistivos (SiNWs) para detecção de oligômeros de DNA do vírus da Dengue utilizando a técnica de Oxidação Anódica Local do Microscópio de Força Atômica (AFM-LAO) (Yusoh and Yaacob, 2021). Neste estudo, os autores investigaram a influência da rugosidade superficial na sensibilidade dos dispositivos. Dispositivos gravados com diferentes concentrações de álcool isopropílico (IPA) produziram SiNWs com rugosidade e dimensões superficiais. Em seguida, os SiNWs foram funcionalizados com glutaraldeído, ácido nucleico peptídico (PNA) e (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) para testar o DNA da Dengue. Os resultados mostraram que o dispositivo SiNW mais sensível ao DNA da Dengue possui a superfície menos rugosa que foi atacada pela adição de 10% em volume de IPA. Este resultado ilustra a potencialidade do AFM como uma ferramenta de diagnóstico precoce e mais rápida do que os métodos tradicionais.

Aplicações recentes em biomedicina também envolvem o uso de AFM para estudar a arquitetura e a dinâmica do envelope bacteriano em escala microscópica. A técnica foi utilizada por Viljoen, Foster, Fantner, Hobbs e Dufrene (Dufrene *et al.*, 2017) no estudo de membranas isoladas e células vivas em condições fisiológicas, rastreando *in vitro* a resposta ao crescimento ou a fármacos com potencial aplicação farmacológica, observando a dinâmica estrutural da superfície em análise. Kristi, Gafur, Kong, Ma, Ye e Wang (Kristi *et al.*, 2020) mostram que o AFM também tem sido usado para identificação de células cancerígenas e imunoterapia. O objetivo é mostrar perspectivas biológicas e químicas para verificar quais substratos moleculares estão associados ao sistema imunológico e quais podem potencialmente eliminar as células cancerígenas. O AFM é capaz de quantificar as propriedades mecânicas de uma amostra com precisão nanométrica devido às suas capacidades multifuncionais e pode ser utilizado para a finalidade mencionada acima.

Quando utilizado para pesquisar sistemas biológicos, o AFM pode medir diretamente as forças de contato em uma superfície sob condições fisiológicas, permitindo a determinação de forças de adesão em escalas de piconewton e a detecção de locais de interação específicos. Esta vantagem permite o estudo das interações da sonda entre uma única molécula (um ligante ligado à sonda AFM ou um receptor incorporado na membrana celular), conforme demonstrado por Knops e colaboradores (Knops *et al.*, 1991), ou mesmo entre a superfície do substrato, conforme demonstrado por Prauzner-Bechcicki (Prauzner-Bechcicki *et al.*, 2015). Como resultado da capacidade de ajustar a sonda de varredura e manipular moléculas específicas, o AFM mostrou ser um instrumento apropriado para aplicações biológicas e biomédicas (Lopes, no date). Esta capacidade do AFM pode auxiliar na identificação de biomarcadores diagnósticos e na diferenciação de diversos fenótipos associados a diversos graus de interação, bem como na descoberta de alvos moleculares que auxiliarão diretamente na fabricação de medicamentos.

Em relação à análise ultraestrutural, o AFM fornece um quadro diferenciado de características como rugosidade, área e volume, demonstrando que esses marcadores superficiais podem revelar alterações precoces no sistema em estudo. A investigação de Amorim e colaboradores (Amorim *et al.*, 2022a) revelou alterações precoces na área e no volume celular dos eritrócitos de indivíduos com anemia hemolítica em células morfológicamente preservadas. O estudo de Inhatouski e colaboradores (Inhatouski *et al.*, 2020) teve como objetivo avaliar alterações na rugosidade superficial da cartilagem articular em pacientes com osteoartrite para células vivas de cartilagem saudável. Como resultado, descobriram que as propriedades únicas da superfície permitiam a detecção da evolução da osteoartrite na escala milimétrica através do exame de rugosidade, o que sugere que o AFM é uma ferramenta adequada para exame superficial de materiais biológicos.

O tecido cerebral, um sistema complexo, pode ser difícil de investigar em escala milimétrica devido à sua estrutura complexa. Apesar disso, Babu e Radmacher (Viji Babu and Radmacher, 2019a) estabeleceram efetivamente o desempenho do AFM na investigação do tecido cerebral, apresentando o mapeamento mecânico desse sistema e demonstrando novos desafios para a pesquisa das características biofísicas do tecido cerebral utilizando o AFM. Matrizes celulares em microescala e visualização da matriz extracelular (ECM) em imagens de tecido cerebral são muito procuradas, com o objetivo de melhor compreender o desenvolvimento de diversas doenças, como doenças neurodegenerativas, por meio do estudo da topografia e mecânica cerebral (Soria *et al.*, 2020). Experimentos usando AFM em neurônios do hipocampo (Zhang *et al.*, 2017), por exemplo, demonstram que as características mecânicas da rede actina-espectrina estão ligadas à detecção de sinais mecânicos e à proteção contra impactos. Além disso, observou-se que os neurônios periféricos são mais resistentes ao trauma mecânico do que os neurônios centrais.

Conforme evidenciado até agora, o AFM é uma ferramenta biofísica poderosa que permite imagens de alta resolução, caracterização e manipulação de amostras biológicas em nanoescala, fornecendo informações valiosas sobre suas propriedades, funções e interações. Revolucionou a nossa compreensão dos sistemas biológicos e tem aplicações em vários campos, incluindo biologia celular, biologia molecular, bioquímica, biofísica e nanomedicina. Assim, focamos agora em estudos recentes nos quais o AFM foi utilizado como principal técnica para investigação de taupatias, mostrando os trabalhos mais recentes que utilizaram o AFM para caracterizar a mecânica das proteínas (Ruggeri *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2016; Maeda, Sato and Takashima, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Chowdhury and Lu, 2019; Al-Hilaly *et al.*, 2020; Esmaeili *et al.*, 2020; Makky *et al.*, 2020b; Banerjee and Ghosh, 2021; Venkatramani *et al.*, 2022), células (Gao *et al.*, 2019; Perini *et al.*, 2019; Woo *et al.*, 2020) e tecidos patológicos

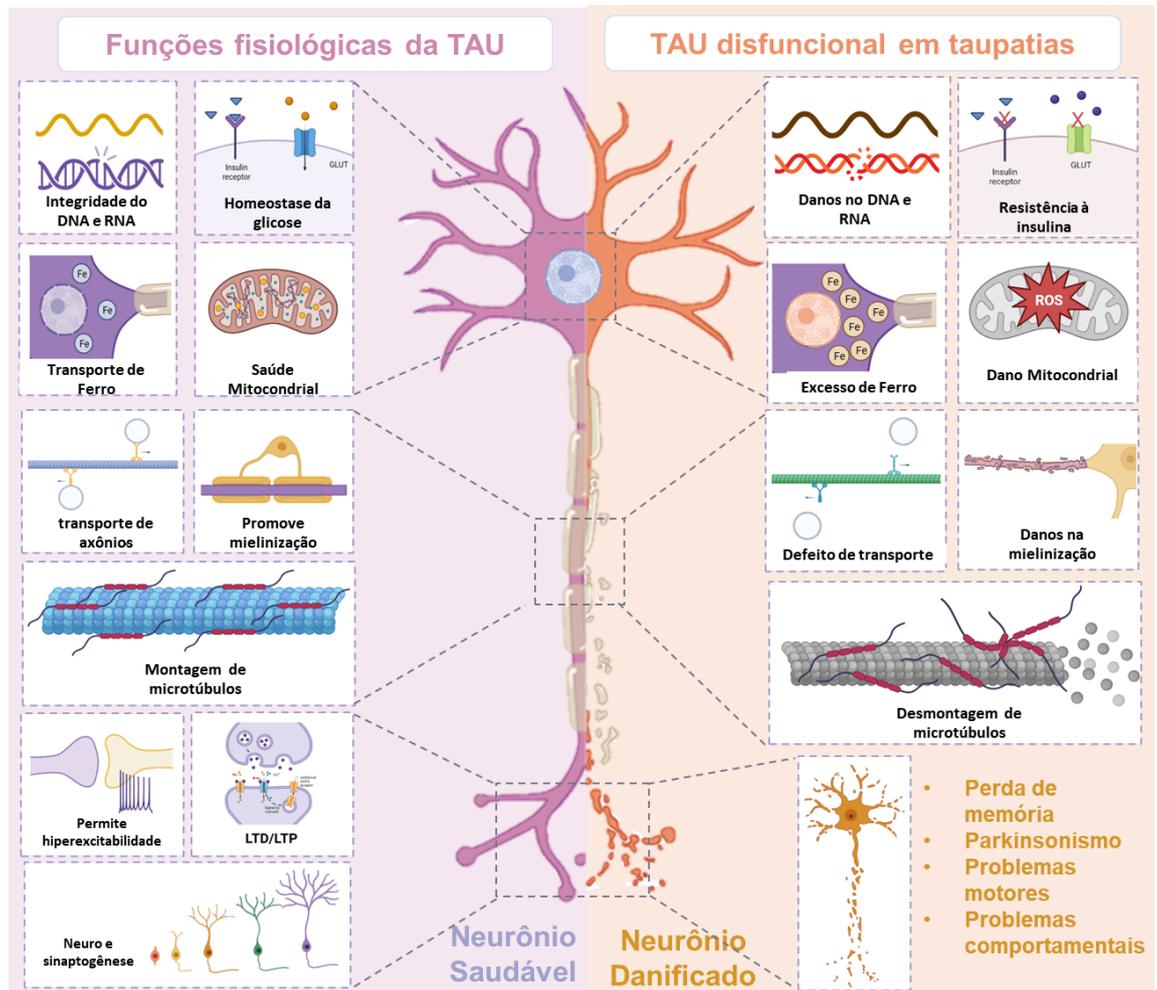
(Menal *et al.*, 2018; Kihan Park *et al.*, 2019), destacando os principais resultados que contribuem para a compreensão desta patologia e mostrando as perspectivas dos estudos que derivam destes trabalhos.

### 3.3 Taupatias: aspectos clínicos e moleculares

O estudo das taupatias começou há mais de cem anos, quando o Dr. Alois Alzheimer descreveu pela primeira vez uma série de alterações morfológicas e a presença de duas estruturas aberrantes no nível cortical em uma mulher idosa com demência progressiva (Alzheimer *et al.*, 1995). Essas estruturas foram mais tarde chamadas de placas senis (SP) e emaranhados neurofibrilares (NFT). A partir disso, foram aprofundados estudos sobre emaranhados neurofibrilares. Quase 80 anos depois, descobriu-se que esses emaranhados eram compostos por agregados de filamentos helicoidais emparelhados de proteína tau hiperfosforilada (Grundke-Iqbal, Iqbal, Quinlan, *et al.*, 1986; Grundke-Iqbal, Iqbal, Tung, *et al.*, 1986). Atualmente sabe-se que diversas doenças estão associadas à presença desses achados aberrantes e são agrupadas como taupatias.

A proteína tau é codificada pelo gene da proteína tau associada aos microtúbulos (MAPT) em seis isoformas com a presença de três ou quatro domínios de ligação aos microtúbulos (MTBDs), que são essenciais para a ligação dos microtúbulos e determinantes para sua classificação como 3R tau ou 4R tau, respectivamente (Shi *et al.*, 2021). Inicialmente, a tau foi identificada como uma proteína associada a microtúbulos axonais. No entanto, muitas novas funções fisiológicas em diferentes compartimentos celulares foram descobertas posteriormente. Em relação aos microtúbulos, a tau é fundamental para a montagem e estabilidade do seu feixe, regulação do transporte axonal (Nam and Epureanu, 2017; Siahaan *et al.*, 2019) e proteção contra clivagem (Qiang *et al.*, 2006). No que diz respeito à atividade sináptica, a tau atua na potenciação e depressão a longo prazo (Ahmed *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2014), na regulação da atividade neuronal hiperexcitabilidade (Pallas-Bazarra *et al.*, 2016), neuro e sinaptogênese (Chen *et al.*, 2012) e, por último, aprendizagem e memória (Chen *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014; Pallas-Bazarra *et al.*, 2016). Além disso, a tau também desempenha um papel no processo de mielinização (Yi *et al.*, 2019), na saúde mitocondrial (Szabo, Eckert and Grimm, 2020), na integridade do DNA genômico e do RNA citoplasmático e nuclear (Sultan *et al.*, 2011; Siano *et al.*, 2019), na regulação do transporte de ferro (Wan *et al.*, 2019), na homeostase da glicose nos neurônios (Wan *et al.*, 2019), no controle da ansiedade e da insônia (Ahmadian *et al.*, 2018) e na função motora (Lei

*et al.*, 2014). As funções mencionadas estão esquematizadas na Figura 3.4, e para mais detalhes, leia a revisão (Kent, Spires-Jones and Durrant, 2020) de Kent.



**Figura 3.4:** Papéis fisiológicos da tau no sistema nervoso e da Tau disfuncional nas taupatias.

Como mencionado acima, as taupatias abrangem aproximadamente 26 tipos diferentes de distúrbios neurodegenerativos semelhantes entre si, acumulando a forma altamente fosforilada da proteína tau associada aos microtúbulos nos neurônios e na glia, levando à neurotoxicidade seguida de demência, parkinsonismo e alterações comportamentais (Sexton *et al.*, 2022). O perfil desses domínios os classifica principalmente em 3R- (por exemplo, doença de Pick), 4R- (por exemplo, degeneração corticobasal, paralisia supranuclear progressiva e doença de grãos argirofílicos) ou taupatia 3R/4R mista (por exemplo, doenças de Alzheimer e Huntington e doenças frontotemporais e demência com parkinsonismo) (Höglinger, Respondek and Kovacs, 2018). No cérebro adulto normal, existem níveis semelhantes de 3R e 4R tau, mas

na neurodegeneração, esta proporção é frequentemente alterada (Williams, 2006). Embora não existam estudos específicos, as taupatias destacam-se facilmente como as doenças neurodegenerativas mais prevalentes em todo o mundo quando agrupadas. Na verdade, só a doença de Alzheimer afeta cerca de 416 milhões de pessoas ou 22% de todas as pessoas com 50 anos ou mais a nível mundial (Gustavsson *et al.*, 2023).

A compreensão da gênese da neurodegeneração, mediada pela tau instável nas taupatias, ainda não está totalmente explicada. Não obstante, em alguns casos, a agregação da tau parece estar relacionada com mutações do gene MAPT (por exemplo, demência frontotemporal com parkinsonismo). Ainda assim, as taupatias são frequentemente distúrbios multifatoriais (por exemplo, doença de Alzheimer) com múltiplos genes e fatores ambientais responsáveis pela sua gênese. Independentemente da causa, há um consenso de que a hiperfosforilação da Tau e a formação de emaranhados neurofibrilares atuam como um ponto de inflexão para o aparecimento de sintomas cognitivos e motores (Spillantini and Goedert, 2013). A tau pode inicialmente se desdobrar mal nas taupatias, tornando-se um excelente substrato alvo para enzimas quinases e um pobre para fosfatases. Essas interações podem resultar na hiperfosforilação da tau e no seu desprendimento dos microtúbulos (Fan *et al.*, 2022). Embora o processo de fosforilação seja o maior responsável pela agregação da tau, outras modificações pós-traducionais também podem ser observadas, como acetilação, glicação, glicosilação com N acetilglucosamina ligada a O (O-GlcNAcylation), ubiquitinação e truncamento (Ledesma *et al.*, 1994; Arnold *et al.*, 1996; Cripps *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2011; Irwin, 2016).

Após esses processos de alterações, as funções fisiológicas da tau são perdidas, resultando em danos celulares como perda da dinâmica e clivagem dos microtúbulos, "engarramento" de proteínas de transporte axonal, incapacidade de propagar potenciais de ação nos neurônios, perda de plasticidade e morte neuronal precoce, desmielinização, estresse oxidativo, acúmulo tóxico de ferro no citoplasma e resistência central à insulina. Esses fatores resultam progressivamente em perdas de aprendizagem e memória, alterações comportamentais e parkinsonismo (Kent, Spires-Jones and Durrant, 2020) (Figura 3.4).

Amnésia anterógrada, bradicinesia, oftalmoplegia, rigidez simétrica ou axial, afasia, desinibição social, comportamento compulsivo, apatia, comprometimento das funções sensoriais e atrofia cortical estão entre os sintomas cognitivos, motores, comportamentais e neurológicos mais comuns entre as taupatias. Vale ressaltar que as taupatias caracterizadas por emaranhados neurofibrilares isolados parecem levar a maiores danos motores e, de forma mais branda, a perdas cognitivas. Em contrapartida, a associação de emaranhados neurofibrilares com placas senis parece diminuir o dano motor, mas, por outro lado, piora consideravelmente o comprometimento cognitivo (Williams, 2006).

Na doença de Alzheimer, marcada por depósitos amiloides e agregados de tau no cérebro, sabe-se que os emaranhados neurofibrilares aparecem mais cedo que as placas senis, sendo responsáveis por desencadear perdas cognitivas em indivíduos ainda não idosos (em alguns casos, pacientes com até 30 anos de idade). Os emaranhados neurofibrilares inicialmente se acumulam no locus coeruleus e se espalham para o córtex entorrinal e depois para outras regiões do cérebro. Esta distribuição está subjacente aos chamados estágios de Braak das taupatias, que variam de 1 a 6. Os estágios 1 a 2 referem-se à fase prodrômica, caracterizada por comprometimentos cognitivos (memória episódica) e funcionais leves, mas perceptíveis; estágios 3 a 4 com comprometimento cognitivo moderado e alterações de comportamento; e estágios 5 a 6 com comprometimento cognitivo grave, despersonalização e morte por fraqueza motora (Takeda, 2019).

Mesmo com todos esses achados e alterações intracelulares promovidas direta ou indiretamente por danos à proteína tau, o conhecimento sobre alterações ultraestruturais em células neuronais com taupatias ainda é incipiente. As técnicas de AFM e de mapeamento adquirem destaque significativo para lançar luz sobre este campo obscuro.

### **3.4 AFM em Taupatias**

Estudar Proteínas Intrinsecamente Desordenadas (PDI) associadas a patologias pode fornecer novos conhecimentos sobre o mecanismo molecular após dano neuronal ligado a alterações estruturais destas proteínas. Com esse objetivo, Perini, Ciasca, Minelli, Papi, Palmieri, Maulucci, Nardini, Latina, Corsetti e Florenzano (Perini *et al.*, 2019) utilizaram o AFM para estudar as propriedades biomecânicas de neurônios incubados com tau26-44 e sua contraparte reversa. Um resultado importante deste estudo foi a confirmação da plasticidade neural como um evento precoce antes do dano celular evidente, contribuindo para alterações degenerativas. Isto foi verificado com neurônios incubados brevemente (até 4 h) com espécies não letais. Os autores conjecturaram que o tau26-44 inicialmente altera a morfologia da superfície celular, modificando as propriedades elásticas da membrana plasmática. Este processo começa depois que seu íon é adsorvido no lado externo da membrana neural.

Conseqüentemente, isso poderia desencadear a transdução da sinalização neural de “morte”. Somente mais tarde (até 48 horas) esse peptídeo é capturado/internalizado pelos neurônios, gerando alterações nos componentes intracelulares levando à perda de sinapses, retração de neuritos e déficit mitocondrial. Estes resultados podem ajudar a definir os mecanismos neurotóxicos exercidos por uma das espécies de proteína tau secretada mais

patologicamente relevantes, que está relacionada com o aparecimento de numerosas taupatias degenerativas humanas.

Outro estudo relevante utilizando AFM foi desenvolvido por Menal, Jorba, Torres, Montserrat, Gozal, Colell, Piñol-Ripoll, Navajas, Almendros e Farré (Menal *et al.*, 2018), que mostrou a redução da rigidez do tecido cerebral associada à doença de Alzheimer em camundongos sob normóxia (AR) e condições hipóxicas, motivadas pelo interesse em avaliar as propriedades mecânicas do cérebro, como a rigidez. O modelo animal da DA é caracterizado pela deposição de placas amiloides cerebrais e alterações neurocognitivas detectáveis na idade dos camundongos utilizados neste estudo, que compreende entre 6 e 8 meses. O resultado mostrou que o tecido da amostra com DA era mais macio do que o da amostra controle (que não foi significativamente alterado pela exposição a condições hipóxicas). O Módulo de Young foi de  $402 \pm 97$  Pa em normóxia e  $651 \pm 138$  Pa para amostras de DA e controle, respectivamente. Após exposições à hipóxia, o Módulo de Young foi de  $316 \pm 78$  Pa e  $637 \pm 115$  Pa para DA e controle, respectivamente.

A diminuição do módulo de Young na amostra DA foi explicada pelo edema, avaliado pelo aumento do peso do córtex e pela desmielinização. Assim, o aumento da água e a diminuição da mielina são atribuídos como mecanismos que podem explicar as diferentes propriedades mecânicas dos cérebros com DA, conforme relatado neste estudo. Assim, os autores destacaram que o aumento da quantidade de água no tecido reduz a sua rigidez. Além disso, a desmielinização observada em cérebros com DA, característica desta doença, contribui ainda mais para a redução da rigidez tecidual.

Estudos de Park, Lonsberry, Gearing, Levey e Desai (Kihan Park *et al.*, 2019) procuraram investigar as propriedades viscoelásticas do tecido cerebral humano através de nanoindentação para encontrar biomarcadores viáveis para a doença de Alzheimer. Os autores descobriram que o tecido cerebral afetado pela DA apresentava orifícios aumentados e com distribuição irregular, ao contrário do tecido saudável. As observações apoiam o critério neuropatológico para o diagnóstico da DA, onde os tecidos cerebrais afetados pela DA estão cheios de placas e emaranhados que rompem o neurópilo. Este fato motivou o estudo da rugosidade superficial em ambos os tecidos, no qual foram calculadas as médias aritméticas dos valores absolutos dos desvios da altura superficial medidos a partir do plano médio das amostras de tecido (rugosidade média). O valor médio da rugosidade para o tecido cerebral normal foi de  $256 \pm 78$  nm, enquanto o valor médio da rugosidade para o tecido cerebral afetado pela DA é medido em  $367 \pm 102$  nm, evidenciando que o tecido cerebral afetado pela DA possui uma superfície mais rugosa que o tecido cerebral normal.

No experimento de nanoindentação deste mesmo estudo, foram realizadas 1.200 indentações em 20 regiões alvo por amostra, na substância cinzenta e branca, com 6 frequências de carga diferentes por região alvo para 10 indivíduos. Vale ressaltar que os tecidos cerebrais se comportam como um material mais rígido quando uma frequência de carga mais alta é aplicada. Esta é uma das características bem conhecidas das superfícies macias. Além disso, os tecidos cerebrais com DA apresentaram inclinações moderadas na fase de pré-carga em comparação com os tecidos cerebrais normais e maior histerese na fase de carga sinusoidal. Isso leva à conclusão de que ocorreu maior dissipação de energia durante o ciclo. Este resultado mostra que os tecidos cerebrais afetados pela DA apresentam uma resposta mais viscosa quando submetidos a frequências de carga mais baixas do que os tecidos cerebrais normais.

A proteína  $A\beta_{1-42}$  é altamente tóxica para as células nervosas e está frequentemente presente no cérebro de pessoas com doença de Alzheimer. Com essa motivação, Gao, Fang, Zhang, Wong, Chan, Wong, Yung e Lai (Gao *et al.*, 2019) usaram AFM para monitorar mudanças na mecânica celular sob toxicidade induzida por  $A\beta_{1-42}$  para entender a neurotoxicidade associada à sua presença. Eles incubaram células de neuroblastoma humano (SH-SY5H) com o oligômero  $A\beta_{1-42}$  em diferentes concentrações. O módulo de Young foi utilizado para entender o comportamento celular na presença de  $A\beta_{1-42}$ . Como resultado principal, os autores destacam a dinâmica de dois estágios de mudança na mecânica celular durante a neurodegeneração. No primeiro estágio, o módulo de Young das células tratadas aumentou rapidamente, associado a alterações na tensão superficial, polimerização da actina e pressão osmótica. Posteriormente, à medida que as células continuaram a ser expostas a uma alta concentração de  $A\beta_{1-42}$ , o módulo de Young diminuiu gradualmente. Esta segunda etapa foi atribuída principalmente à desmontagem dos microtúbulos. Este estudo mostrou que a observação de mudanças na mecânica celular pode oferecer uma visão mais abrangente da neurodegeneração de células expostas ao oligômero  $A\beta_{1-42}$ .

O parkinsonismo também é classificado como uma taupatia e é a segunda doença neurodegenerativa mais comum. A  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn), uma proteína presináptica intrinsecamente desordenada, está associada ao desenvolvimento desta doença. Portanto, estudos dessas proteínas podem contribuir para a compreensão da gênese da DP de várias maneiras, embora existam outras proteínas envolvidas na DP. A DP está associada a lesões patológicas no cérebro chamadas corpos de Lewy, que consistem em  $\alpha$ -syn auto-organizada. Zhang, Hashemi, Lv, Williams, Popov, Dokholyan e Lyubchenko (Zhang *et al.*, 2018) estudaram a flexibilidade estrutural da  $\alpha$ -sinucleína em um ambiente de solução aquosa por meio da Microscopia de Força Atômica de Alta Velocidade (HS-AFM). Neste estudo, os autores descobriram que o monômero de  $\alpha$ -sinucleína assume uma conformação globular e

pode formar rapidamente protrusões em forma de cauda. Inicialmente, o monômero tem uma conformação globular (0 s) e transita para uma cauda (13,8 s, 26,0 s, 33,6 s e 125,6 s), duas caudas (27,4 s, 62,6 s, 129,6 s e 132,6 s) e conformações estendidas (130,4 s e 136,6 s). Também é notável que há intercalações com as outras conformações, onde o monômero retorna a uma conformação globular (16,8 s e 100,2 s). A doença de Parkinson ainda não possui métodos de tratamento eficazes, então estudos envolvendo a caracterização da  $\alpha$ -syn podem ajudar os pesquisadores a encontrar mais explicações sobre a patogênese da doença de Parkinson e fornecer uma direção para os pesquisadores explorarem o tratamento desta tauopatia.

Uma enzima desubiquitinante da família OTU, juntamente com a  $\alpha$ -sinucleína, também está presente nos corpos de Lewy de indivíduos com doença de Parkinson e em placas amiloides na DA. Com essas informações, estudos de Xie, Li, Shen, Cao, Ning, Yuan, Ji, Wang e Ke (Xie *et al.*, 2016) mostraram que a OTU desubiquitinase ubiquitina aldeído-ligante 1 (OTUB1) é um agente que atenua a apoptose de células neuronais após hemorragia intracerebral. Além disso, OTUB1 também atua diretamente na acumulação de tau e tau fosforilada. Dessa forma, sua presença no cérebro sugere que ela desempenha um papel vital nas funções neuronais. Ademais, sua presença nos corpos de Lewy e sua relação com a proteína tau também fornecem evidências de que ela pode ser um elemento-chave na evolução das doenças neurodegenerativas. Nesse sentido, Kumari, Kumar, Kumar, Singh, Hanpude, Jangir e Maiti (Kumari *et al.*, 2020) buscaram estudar OTUB1 e sua interação com células neurais utilizando AFM.

O oligômero OTUB1 exibiu uma estrutura anelar, que foi ainda mais evidenciada pela confirmação dos cientistas usando a técnica AFM, que mostrou que OTUB1 inicialmente cria espécies oligoméricas de geometria especificada que subsequentemente se transformam em fibras semelhantes a amiloides. Esta descoberta é significativa porque o acúmulo de proteínas amiloidogênicas nas células provoca mudanças no citoesqueleto em doenças neurodegenerativas. Após o tratamento de células neuronais com oligômeros de OTUB1, eles notaram uma deterioração na rugosidade da superfície da membrana. Isso sugeriu que os oligômeros de OTUB1 também afetam o citoesqueleto das células neuronais, semelhante a outras proteínas amiloides oligoméricas. Em conclusão, OTUB1 tem uma forma molecular única que amplifica a toxicidade neuronal, a desorganização do citoesqueleto, a rápida liberação de espécies reativas de oxigênio e o dano mitocondrial.

As mutações na proteína tau podem causar doenças neurodegenerativas conhecidas como demências frontotemporais com parkinsonismo, que estão associadas à região do cromossomo 17, onde se acumulam filamentos de tau, sugerindo uma conexão tênue entre os filamentos de tau e a neurodegeneração. Ainda não se sabe como as mutações relacionadas às demências frontotemporais com parkinsonismo afetam a formação de oligômeros, mas o

aparecimento dos filamentos de tau pode estar associada à neurodegeneração. No entanto, são os oligômeros ou monômeros de tau, e não os filamentos de tau, que causam neurotoxicidade.

Assim, Maeda, Sato e Takashima (Maeda, Sato and Takashima, 2018) sugeriram a possibilidade de que as mutações associadas às demências frontotemporais com parkinsonismo promovam a formação de oligômeros de tau. Eles utilizaram AFM para avaliar a agregação de tau em mutações de demências frontotemporais com parkinsonismo, tanto em métodos de teste *in vitro* quanto *in vivo*. Este trabalho mostrou que os oligômeros de tau P301L formam oligômeros menores do que outros oligômeros e que as mutações relacionadas às demências frontotemporais com parkinsonismo promovem o desenvolvimento de oligômeros de tau. Esses resultados sugerem que as demências frontotemporais podem usar a forma oligomérica de tau com mutações de parkinsonismo para causar neurodegeneração. Além disso, eles argumentam que uma mutação específica, P301L, aumenta a produção de oligômeros de tau ao reduzir a quantidade de tau que precisa estar presente em cada partícula. Esses resultados estão alinhados com estudos que demonstram estruturas intermediárias de tau tóxicas, mas não os próprios filamentos.

As diferentes sequências mais curtas podem explicar os vários tamanhos de oligômeros para agregação e o número de moléculas de tau integradas nos oligômeros. Os autores sugeriram que as agregações de tau são diferentes entre as taupatias. Portanto, é razoável que os agrupamentos de P301L e outras mutações sejam diferentes. Isso é relevante para um fato essencial: outras taupatias, além da DA, são causadas pela mutação P301L. Como resultado, os autores demonstraram que as demências frontotemporais com mutações de tau ligadas ao parkinsonismo causam um aumento na formação de oligômeros de tau, confirmando que essas mutações são cruciais no desenvolvimento dessa tauopatia. Este trabalho também mostrou que o tau P301L e outras construções de tau formaram diversos oligômeros, sugerindo que abordagens alternativas podem ser necessárias para prevenir a agregação de tau em várias taupatias.

A formação de amiloides, que são grupos de proteínas fibrilares insolúveis, também está associada a várias doenças, incluindo taupatias. A Nanotecnologia de Espectroscopia no Infravermelho, que emprega Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia no Infravermelho (AFM/IR), pode revelar as mudanças estruturais dessas proteínas durante a agregação em escala nanométrica. Ruggeri e colaboradores (Ruggeri *et al.*, 2015 ) visaram caracterizar as espécies oligoméricas e fibrilares formadas especificamente durante a agregação amiloide. Suas medições de morfologia mostraram que a fibrilação segue um processo comum de nucleação chamado oligomerização. De acordo com seus dados de volume-força, a rigidez das espécies amiloidogênicas aumenta com a maturidade da fibrilação. Oligômeros semelhantes a fibrilas

formam fibrilas maduras com uma estrutura rica em  $\beta$  e propriedades mecânicas comuns aos amiloides. Essa característica nos permite identificar a impressão digital espectral da transição de  $\alpha$  para  $\beta$  que proteínas nativas experimentam durante a fibrilação em escala nanométrica. Os autores enfatizam que suas descobertas demonstraram pela primeira vez na escala de espécies amiloides individuais que o conteúdo de folhas  $\beta$  amiloides é um parâmetro importante para determinar o aumento da rigidez amiloide. Portanto, o nanoIR pode ter muitas vantagens, pois é uma ferramenta única para estudar a via de agregação de proteínas e até mesmo ajudar a propor modelos de moléculas que podem prevenir a agregação amiloide.

Da perspectiva deste estudo, as distribuições estruturais em agregados de tau em estágio inicial foram examinadas no estudo mais recente de Banerjee e colaboradores (Banerjee and Ghosh, 2021). Os autores também examinaram espectros em nanoescala de fibrilas de tau individuais em diferentes estágios de agregação usando a técnica AFM-IR. Eles encontraram a presença de vários polimorfos fibrilares, que apresentam outras estruturas secundárias. Como mencionado, o AFM-IR combina a resolução espacial do AFM e a resolução química do infravermelho para examinar estruturas em nanoescala com detalhes químicos nunca antes vistos. A principal conclusão foi que as fibrilas de tau podem apresentar variações estruturais significativas, especialmente nos estágios iniciais de agregação. Polimorfos com morfologia semelhante, mas estruturas secundárias diferentes, são exemplos de heterogeneidade. Em particular, pode-se notar uma estrutura transitória de folhas paralelas ordenadas nas primeiras fibrilas; após a maturação, transforma-se em uma estrutura fibrilar mais desordenada que contém lâminas antiparalelas. Estes resultados reforçam a necessidade de combinar a espectroscopia com uma técnica versátil e precisa como o AFM.

Utilizando espectroscopia de força compressiva, o trabalho desenvolvido por Chowdhury (Chowdhury and Lu, 2019) forneceu informações adicionais sobre a flexibilidade e rigidez das proteínas tau. Os experimentos mostraram que a força compressiva de aproximadamente 5 a 125 pN causou rupturas repentinas e espontâneas da proteína tau. Além disso, descobriram que esta resposta estrutural de uma proteína à força compressiva está intimamente relacionada com o ambiente eletrostático local. Em outras palavras, um desequilíbrio de íons específicos pode alterar a reação de uma estrutura proteica a mudanças na resistência à compressão, resultando em emaranhados protéicos. Esta pesquisa também mostra que a ruptura espontânea e simultânea de numerosas proteínas adjacentes pode resultar num terceiro estado de emaranhamento de proteínas.

Usando AFM de alta resolução (HR-AFM) em ar e tampão, seis isoformas fibrilares distintas da proteína tau foram montadas *in vitro* no trabalho de Makky e colaboradores (Makky *et al.*, 2020b). Foram também estudadas as suas características morfológicas e nanomecânicas.

Os pesquisadores descobriram que as estruturas de todas as fibrilas tau se assemelham a filamentos helicoidais emparelhados formados por duas protofibrilas separadas por um sulco raso. Em comparação com fibrilas amilóides feitas de outras proteínas, os valores dos módulos de Young axial e radial derivados dos comprimentos de persistência encontrados através de experimentos de nanoindentação foram baixos. Esta descoberta foi explicada pelo destaque da fraca interação intermolecular entre folhas  $\beta$  emparelhadas dentro das fibrilas de tau. Este resultado foi importante porque a associação, dinâmica, persistência e propagação do tau podem depender dele.

Alguns estudos mostram que produtos naturais como a shikonina, um medicamento fitoterápico com diversas atividades biológicas, demonstraram apresentar capacidade neuroprotetora (Chen *et al.*, 2003). Com essas informações sobre sua capacidade neuroprotetora, Venkatramani e colaboradores (Venkatramani *et al.*, 2022) procuraram determinar os efeitos da shikonina na agregação da proteína tau. Usando AFM e outras técnicas de microscopia, eles investigaram como a shikonina afetava os filamentos pré-formados de tau. Verificou-se que a shikonina suprimiu a fibrilação da tau e encurtou os filamentos da tau. O comprimento médio dos filamentos diminuiu de  $1,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$  na ausência de shikonina para  $0,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$  e  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$  na presença de  $5 \mu\text{M}$  e  $10 \mu\text{M}$  de shikonina, respectivamente. Os autores sublinham que as descobertas mostram que a shikonina inibiu várias etapas da via de agregação da tau, particularmente as fases iniciais, como a separação das fases líquido-líquido. A shikonina também degradou os filamentos de tau e protegeu as células do neuroblastoma dos oligômeros de tau. Os autores sublinham neste estudo que são necessárias mais pesquisas para compreender como a shikonina exerce o seu impacto neuroprotetor. As descobertas sugerem que a shikonina pode ser um candidato promissor a um medicamento para tratar taupatias, e esta é uma área promissora a ser investigada.

O ácido quinolínico, um metabólito neuroativo em altas concentrações, está frequentemente associado ao aparecimento e desenvolvimento de uma variedade de doenças neurológicas, incluindo a doença de Alzheimer. Rahman e colaboradores demonstraram que o ácido quinolínico aumenta os neurônios e co-localiza-se com a tau em secções corticais de pacientes com DA (Rahman *et al.*, 2009). Também está presente no perímetro de placas senis e emaranhados neurofibrilares. Como resultado, o ácido quinolínico induz a fibrilação da tau, que pode ser outro mecanismo de toxicidade ou dano neuronal. Compreender essas vias distintas é de enorme valor clínico. Para confirmar a produção de fibrilas da isoforma tau 1N4R na presença de ácido quinolínico, Esmaeili e colaboradores (Esmaeili *et al.*, 2020) empregaram AFM para avaliar a incubação da proteína tau com ácido quinolínico, observando a criação de pequenos aglomerados oligoméricos curtos que se assemelhavam a agregados oligoméricos

amorfos. A compreensão da ligação do ácido quinolínico na tau pode ajudar na compreensão do processo básico de formação da tau amiloide. De acordo com os pesquisadores, como é muito provável que o ácido quinolínico crie emaranhados neurofibrilares nos cérebros de pacientes com DA *in vivo*, a enzima metabolizadora do ácido quinolínico pode ser vista como um local prospectivo para métodos terapêuticos da DA.

Para formar os filamentos helicoidais emparelhados constituintes presentes nas taupatias, a tau requer a adição de cofatores aniônicos, como a heparina. O objetivo do trabalho desenvolvido por Al-Hilaly e colaboradores (Al-Hilaly *et al.*, 2020) foi demonstrar com AFM, juntamente com outras técnicas, que um fragmento central proteoliticamente estável de filamentos helicoidais emparelhados, tau 297-391, conhecido como "dGAE", forma espontaneamente filamentos helicoidais emparelhados com filamentos retos e cruzados em condições fisiológicas. Eles realizaram análise *in vitro* e comparação das estruturas dos filamentos formados pelo dGAE com aqueles depositados no cérebro de pacientes com DA. Como resultado, demonstraram que o dGAE produz PHFs com estrutura molecular semelhante à presente no tecido cerebral. As imagens AFM mostraram que os filamentos formados pelo dGAE apresentam torção para a esquerda. Este é o mesmo comportamento observado para PHFs na doença de Alzheimer. Medições de periodicidade, com média de  $72,7 \pm 1,6$  nm, mostram que os filamentos truncados de tau compartilham características macromoleculares com os PHFs encontrados *in vivo*. Este estudo teve como objetivo enfatizar a capacidade dos dGAEs de servir como um sistema modelo para estudar a montagem do domínio central, a seleção de inibidores da agregação de tau e apoiar o desenvolvimento de maior conhecimento sobre taupatias.

A degeneração lobar frontotemporal, também caracterizada como taopatia, é uma das principais causas de demência no mundo. Depois de descobrir que a proteína  $\beta$ -arrestina2 é encontrada em altas concentrações no cérebro humano e é responsável pelo acúmulo de emaranhados patológicos de tau, Woo e colaboradores (Woo *et al.*, 2020) decidiram investigar seu papel na oligomerização usando AFM e outros métodos experimentais. Os resultados da AFM mostraram que a  $\beta$ -arrestina2 oligomerizada, mas não monomérica, aumenta a tau, bloqueando a autointeração do receptor de carga autofágico, evitando assim o fluxo da autofagia, o processo de regeneração natural. Reforça-se que o aumento de  $\beta$ -arrestina2 em células com superexpressão de tau e cérebros com degeneração lobar frontotemporal humana sugere que este pode ser um método útil para entender a patogênese e encontrar um ponto de interdição terapêutica.

A Tabela 1 resume o uso das técnicas de microscopia de força atômica no estudo das taupatias e os resultados encontrados na literatura nos últimos dez anos, servindo como um guia

rápido para investigações em taupatias utilizando técnicas de AFM. Também mostra os modos de operação utilizados em cada pesquisa e detalhes sobre o ambiente de digitalização, sonda utilizada e a abordagem utilizada para obter os resultados.

**Tabela 1.** Tabela apresentando resultados de pesquisas dos últimos cinco anos utilizando a técnica AFM no estudo das taupatias. São apresentados os modos de operação, as especificações da sonda, a abordagem e os principais resultados obtidos.

MODO DE OPERAÇÃO	ABORDAGEM	RESULTADOS	REFERÊNCIA
Os estudos foram conduzidos em ambiente líquido utilizando cantilevers de silício com constante de mola nominal de 0,05 N/m e razão de ponta de 10 nm.	Estudo do efeito da incubação de curto prazo de tau26-44 e sua contraparte reversa nas propriedades biomecânicas dos neurônios de controle e de DA.	- Maior dureza do axônio em relação à soma celular. -Os axônios neuronais tornam-se mais rígidos após a incubação in vitro com tau26-44.	(Perini <i>et al.</i> , 2019)
As amostras foram analisadas em condições ambientes (ar) a uma temperatura controlada de 37°C. As curvas de força foram medidas usando um cantilever de nitreto de silício revestido de ouro com uma constante de mola nominal de 0,01 N/m.	Caracterização da rigidez do tecido cerebral em camundongos induzidos pela doença de Alzheimer em comparação com camundongos selvagens sob condições de normóxia (AR) e hipóxia (HI).	- O estresse oxidativo causado pela apneia obstrutiva do sono (AOS) não provoca alterações na rigidez do córtex cerebral de ratos acometidos pela DA.	(Menal <i>et al.</i> , 2018)
Os testes de indentação foram realizados utilizando pontas com diferentes geometrias. Dez regiões do tecido cerebral foram analisadas com seis pontos de indentação em cada uma. A temperatura ambiente e a umidade relativa foram mantidas durante o experimento em 21°C e 48%, respectivamente.	Investigação das propriedades viscoelásticas do tecido cerebral humano na DA usando nanoindentação	- O tecido cerebral afetado pela DA apresentava orifícios aumentados e distribuição irregular. - O tecido cerebral da DA tem uma superfície mais áspera do que o tecido cerebral de controle. - Os tecidos cerebrais comportam-se como um material mais rígido ao aplicar uma carga de frequência mais elevada. - Em comparação com tecidos cerebrais saudáveis, os tecidos afetados pela DA são mais	(Kihan Park <i>et al.</i> , 2019)

		viscosos em frequências de carga mais baixas.	
O experimento foi conduzido no modo QNM em condições ambientais (ar) para obtenção de imagens de células neurais e em ambiente líquido para ensaios de nanoindentação. Para a análise ao ar foi utilizada uma sonda com cantilever de silício e constante de mola nominal de 2 N/m. Para análise em líquido foi utilizada uma sonda com cantilever de nitreto de silício e constante de mola nominal de 0,7 N/m.	Monitoramento de mudanças dinâmicas na mecânica das células neurais sob toxicidade induzida por drogas por Beta-amilóide ( $A\beta_{1-42}$ ).	- O módulo de Young das células incubadas com $A\beta_{1-42}$ aumentou nas primeiras horas. - O módulo de Young diminuiu gradualmente, atribuído principalmente à desmontagem dos microtúbulos.	(Gao <i>et al.</i> , 2019)
As amostras foram analisadas no modo AFM de alta velocidade (HS AFM) utilizando sondas com constantes de mola entre 0,1 e 0,2 N/m e frequência de ressonância entre 400-700 kHz. Varreduras de 50 x 50 nm foram realizadas com resolução de 128 x 128 pixels.	Estudo da flexibilidade estrutural da $\alpha$ -sinucleína associada à doença de Parkinson em ambiente de solução aquosa.	-A forma globular do monômero $\alpha$ -syn permite produzir saliências semelhantes a cauda em segundos. -Um monômero globular pode adotar uma conformação totalmente expandida.	(Zhang <i>et al.</i> , 2018)
Os dados morfológicos da proteína OTUB1 foram obtidos em modo de rosqueamento utilizando uma sonda com cantilever de silício com frequência de ressonância entre 300-320 kHz e constante de mola entre 13 - 70 N/m. Para análise celular, as varreduras foram realizadas em modo de contato usando uma sonda cantilever de silício revestida de ouro com uma	Estudo de OTUB1 e sua interação com células neurais na Doença de Parkinson	- OTUB1 gera inicialmente espécies oligoméricas com determinado formato, que posteriormente se desenvolvem em fibras semelhantes a amiloide. - Comprometimento da rugosidade da superfície da membrana em células neuronais tratadas com oligômeros OTUB1.	(Xie <i>et al.</i> , 2016)

<p>constante de mola nominal de 0,1 N/m.</p>			
<p>O experimento foi conduzido em modo de rosqueamento em ambiente aquoso usando sondas em balanço com constante de mola de 0,2 N/m, frequência de ressonância de 9kHz e raio de ponta de 20nm.</p>	<p>Avaliação da agregação de tau em mutações de FTDP-17 na doença frontotemporal em sistemas in vitro e in vivo.</p>	<p>- Mutações no FTDP-17 aumentam a formação de oligômeros tau. - Os oligômeros tau P301L formam oligômeros menores que os demais.</p>	<p>(Maeda, Sato and Takashima, 2018)</p>
<p>As medições foram realizadas à temperatura ambiente sob atmosfera controlada de nitrogênio com umidade abaixo de 5%. Os mapas AFM foram adquiridos com resolução entre 2 e 10 nm/pixel. Foi utilizado um cantilever PR-EX-nIR2 revestido com ouro de silício (Anasys, EUA) com um raio nominal de ~ 30 nm e uma constante de mola de cerca de 0, 2 N/m.</p>	<p>Uso de nanoespectroscopia infravermelha para medir diretamente a estrutura e a interação entre espécies <math>\beta</math>-amilóides oligoméricas e fibrilares.</p>	<p>- A fibrilação segue um processo de nucleação comum conhecido como oligomerização. - A rigidez das espécies amiloidogênicas aumenta com a maturidade da fibrilação. -Oligômeros semelhantes a fibrilas formam fibrilas maduras com uma estrutura rica em <math>\beta</math> e propriedades mecânicas comuns aos amilóides.</p>	<p>(Ruggeri <i>et al.</i>, 2015)</p>
<p>A imagem AFM foi realizada em modo de toque à temperatura ambiente com um instrumento Bruker NanoIR3 equipado com um Laser Quantum Cascade de infravermelho médio (MIRcat, Daylight solutions). A frequência de ressonância nominal e a constante de mola do cantilever são <math>75\pm 15</math> kHz e 1-7 N/m, respectivamente. A velocidade de varredura foi mantida entre 0,5-1 Hz. Foram realizadas varreduras de AFM da área (<math>\sim 5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}</math>) de cada amostra.</p>	<p>Aplicação de microscopia IR de força atômica para examinar espectros em nanoescala de fibrilas de tau específicas em vários estágios de agregação.</p>	<p>-As fibrilas Tau podem apresentar variações estruturais significativas, especialmente nos estágios iniciais de agregação. -Presença de uma estrutura de folha paralela ordenada transitória nas fibrilas iniciais. - Após a maturação, a proteína se transforma em uma estrutura fibrilar mais desordenada que contém lâminas antiparalelas.</p>	<p>(Banerjee and Ghosh, 2021)</p>

<p>O experimento foi realizado com uma sonda AFM revestida com Cr-Au com constante de força de 0,03 nN/nm e curvatura menor que 35 nm, em uma área de <math>1 \times 1 \mu\text{m}^2</math> sob foco de laser, onde foi medida a curva de força AFM foi tirada a cada intervalo de 30 nm para garantir que uma proteína estivesse sob a ponta do AFM. As moléculas de proteína foram quebradas sob uma carga de força compressiva, seguida do registro das curvas de força de tração sob uma solução tampão (pH 7,4) com uma velocidade aproximada de 2.000 nm/s.</p>	<p>Espectroscopia de força compressiva via AFM no estudo da flexibilidade e rigidez de proteínas tau.</p>	<p>-Uma força compressiva de aproximadamente 5 a 125 pN causou rupturas repentinas e espontâneas da proteína tau. -A resposta estrutural de uma proteína à força compressiva está relacionada ao ambiente eletrostático local. - A ruptura espontânea e simultânea de várias proteínas próximas pode resultar num terceiro estado de emaranhamento de proteínas.</p>	<p>(Chowdhury and Lu, 2019)</p>
<p>O experimento foi feito em modulação de amplitude AFM (AM-AFM). Foram utilizados cantilevers ACTG de silício revestido de ouro (constante de mola nominal 37 nN/nm, raio da ponta &lt;10 nm). Para cada amostra, um grande número de conjuntos fibrilares foi sistematicamente visualizado em alta resolução (<math>3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}</math> ou <math>5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}</math>).</p>	<p>Estudo morfológico e nanomecânico de seis diferentes isoformas de tau utilizando microscopia de força atômica de alta resolução.</p>	<p>- As estruturas de todas as fibrilas tau assemelham-se a filamentos helicoidais emparelhados. -Em comparação com fibrilas amilóides feitas de outras proteínas, os valores do módulo de Young axial e radial são mais baixos.</p>	<p>(Makky <i>et al.</i>, 2020b)</p>
<p>No modo de toque, as imagens AFM foram adquiridas em um microscópio de força atômica Bio-MFP-3D (Asylum Research). A análise de imagens e a medição do tamanho, altura e comprimento do filamento oligômero foram realizadas utilizando o software WSxM.</p>	<p>Uso de AFM para determinar os efeitos da shikonina na agregação da proteína tau.</p>	<p>- Shikonin suprimiu a fibrilação de tau e encurtou os filamentos de tau. - A shikonina preveniu os estágios da via de agregação da tau, particularmente os estágios iniciais, como a separação das fases líquido-líquido. -</p>	<p>(Venkatrama ni <i>et al.</i>, 2022)</p>

		-A shikonina destruiu os filamentos de tau e evitou que os oligômeros de tau prejudicassem as células do neuroblastoma.	
O AFM foi operado em modo sem contato usando cantilevers de 250 kHz, 15 N/m e raio de ponta de 10 nm.	AFM foi empregada para verificar a formação de fibrilas da isoforma 1N4R tau na presença de ácido quinolínico.	- A incubação de Tau com ácido quinolínico produziu pequenos aglomerados oligoméricos curtos que pareciam agregados oligoméricos amorfos.	(Esmaeili <i>et al.</i> , 2020)
AFM foi usado no modo nanomecânica quantitativa de força de pico. Sondas Bruker ScanAsyst-Air (constante de mola nominal 0,4 N m <sup>-1</sup> e raio nominal da ponta 2 nm) foram usadas para escanear áreas de 5 µm × 5 µm da superfície com uma resolução de 1024 × 1024 pixels.	O AFM foi utilizado no estudo tau 297-391, conhecido como "dGAE", para verificar a formação de PHFs em condições fisiológicas.	-dGAE produz PHFs com estrutura molecular semelhante à do tecido cerebral. -As imagens de AFM mostraram que os filamentos formados por dGAE apresentam torção para a esquerda, mesmo comportamento observado para PHFs na DA. -As medições de periodicidade mostram que os filamentos truncados de tau compartilham características macromoleculares com os PHFs encontrados in vivo.	(Al-Hilaly <i>et al.</i> , 2020)
O AFM foi utilizado em modo contato / modo toque com cantilever de revestimento de Au (lado do detector) (nanossensores) com constante de mola nominal de 42 N/m e frequência de ressonância de 330 kHz.	Investigar o papel da β-arrestina2 na oligomerização usando Microscopia de Força Atômica	- A β-arrestina2 oligomerizada, mas não monomérica, aumenta a tau bloqueando a autointeração do receptor de carga autofágica	(Woo <i>et al.</i> , 2020)

### 3.5 Conclusões

Neste trabalho revisamos as aplicações do AFM em sistemas biológicos, especificamente no estudo de taupatias, mostrando a aplicação desta técnica como um método eficaz de diagnóstico e elucidação da gênese de algumas doenças neurodegenerativas. Por conta disso, vale ressaltar que o desenvolvimento do AFM trouxe novas possibilidades para o estudo de sistemas biológicos em nanoescala. Sua capacidade de obter topografias tridimensionais com alta resolução atômica tornou-se uma técnica indispensável quando se considera nanociência e nanotecnologia.

Foi enfatizado que o AFM poderia fornecer novas informações sobre as propriedades superficiais de diversos sistemas, como adesão e propriedades viscoelásticas, e determinar o Módulo de Young e as propriedades magnéticas ou eletrostáticas das superfícies. Além disso, o AFM pode analisar qualquer amostra em qualquer meio. Todas essas características do AFM fazem dele uma ferramenta única para avaliar superfícies de células, tecidos e membranas, por exemplo, em nanoescala. Portanto, abre novas janelas no estudo de diferentes campos, como o estudo das taupatias.

Esta revisão mostra como a poderosa técnica de microscopia foi utilizada no estudo de células neurais isoladas, antes e depois da interação com a proteína tau, em tecidos cerebrais da doença de Alzheimer e Parkinson, entre outros estudos. A compreensão das funções adicionais da tau é essencial para elucidar a gênese das taupatias, mas também é necessária para determinar a estratégia terapêutica mais adequada. Portanto, é necessário dedicar mais atenção a esta classe de doenças.

Além disso, nota-se que também é necessário voltar a atenção para outras taupatias, embora o número de incidências seja menor. Ficou claro que a técnica AFM pode ajudar de diversas maneiras no tratamento de materiais biológicos associados a diversas doenças. Portanto, estender esta técnica para outras aplicações em taupatias é importante uma vez que ainda há pouco na literatura que busca outras formas de unir os conhecimentos já adquiridos até o momento.

**Parte II**

**DIABETES E DECLÍNIO COGNITIVO: UMA ABORDAGEM INOVADORA PARA ANÁLISE DAS PROPRIEDADES BIOFÍSICAS E VIBRACIONAIS DO HIPOCAMPO**

**Artigo publicado na revista ACS Ômega**

**DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c05869>**

## Capítulo 4

### 4.1 Introdução

Doenças neurodegenerativas são distúrbios progressivos do sistema nervoso que afetam a função e a manutenção de populações neuronais específicas. O Instituto Nacional de Distúrbios Neurológicos e Derrame (NIH) (*Home | NHI Disorders and Stroke*, 2024) descreve mais de 600 distúrbios neurológicos. Ele destaca as doenças de Alzheimer e Parkinson como as doenças neurodegenerativas com maior incidência epidemiológica no mundo (Lamprey *et al.*, 2022). Em 2020, estimou-se que 47 milhões de pessoas em todo o mundo viviam com demência, tornando-a uma das principais causas de dependência e incapacidade. O número de pessoas com demência deve aumentar nos próximos 30 anos devido ao rápido envelhecimento da população (Wolters *et al.*, 2020). A neurodegeneração está associada à disfunção da sinapse e da rede neural e à deposição de variantes proteicas alteradas fisioquimicamente no cérebro, como tau e beta amiloide (Wilson *et al.*, 2023).

Por outro lado, o diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, fisiologicamente caracterizada por altos níveis de glicose no sangue, causados principalmente pela produção insuficiente de insulina ou pela falta de resposta à insulina pelo corpo (Antar *et al.*, 2023b). A Federação Internacional de Diabetes (IDF) estima que 537 milhões de adultos (20–79 anos) têm diabetes e projeta que até 2030, haverá 643 milhões, e até 2045, haverá 783 milhões (*Diabetes*, no date).

De acordo com estudos recentes (Hanyu, 2019; Barbiellini Amidei *et al.*, 2021; Savelieff *et al.*, 2022), há uma correlação entre diabetes e declínio cognitivo, com pacientes com diabetes sendo mais predispostos a desenvolver demência do que indivíduos saudáveis, particularmente com muitos casos de doença de Alzheimer. Além disso, evidências estatísticas e biológicas sugerem uma conexão entre demência e diabetes (Celis-Morales *et al.*, 2022; Janoutová *et al.*, 2022), possivelmente devido a vias celulares e moleculares semelhantes. Entre várias comorbidades, o diabetes mellitus (DM) tem a maior influência no desenvolvimento da doença de Alzheimer (Santiago and Potashkin, 2021). A hiperglicemia crônica e a doença microvascular também contribuem para a disfunção cognitiva no diabetes tipo 1 e tipo 2. Ambos os tipos de diabetes estão associados à lentidão mental e motora, bem como reduções semelhantes nas medidas de atenção e funcionamento executivo (Moran *et al.*, 2022; Gupta *et al.*, 2023). Além disso, ambos os tipos de diabetes são caracterizados por lentidão neural, aumento da atrofia cortical e anormalidades microestruturais nos tratos da substância branca (Biessels and Despa, 2018b).

A Doença de Alzheimer pode representar uma forma específica de Diabetes no cérebro, que seria chamada de Diabetes Mellitus Tipo 3 (de la Monte, Tong and Wands, 2018; Nguyen *et al.*, 2020b; Janoutová *et al.*, 2022; Michailidis *et al.*, 2022). Neste contexto, há uma atenção crescente sobre o papel das proteínas  $\beta$ -amiloide e tau no sistema nervoso periférico e na indução da resistência à insulina (Jarosz-Griffiths *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado que a Doença de Alzheimer e o DM2 compartilham mecanismos fisiopatológicos comuns associados à resistência à insulina, como estresse oxidativo, distúrbio de sinalização da insulina, disfunção mitocondrial, neuroinflamação, Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) e síndrome metabólica (Michailidis *et al.*, 2022; Carvalho and Moreira, 2023). A relação entre Diabetes e demência ainda é pouco compreendida. Uma melhor compreensão das associações metabólicas entre DM e declínio cognitivo pode fornecer uma compreensão mais profunda do início das doenças e da relação entre elas, explicando, pelo menos em parte, suas causalidades. Esse entendimento pode ser alcançado com a ajuda de técnicas experimentais que fornecem informações detalhadas sobre a ultraestrutura e as propriedades biofísicas e vibracionais dos sistemas biológicos, como a Microscopia de Força Atômica e a Espectroscopia Raman.

AFM é uma técnica de sonda de varredura desenvolvida por Gerd Binnig; sendo uma ferramenta útil para análise em nanoescala devido às forças interatômicas que atuam entre a sonda e a superfície da amostra, variando de 10 pN a 10  $\mu$ N para pequenas separações. Devido às forças atrativas de longo alcance, a resolução vertical da AFM é menor que um nanômetro, enquanto a resolução horizontal é de cerca de 1 nm a 5 nm (Bian *et al.*, 2021b). A vantagem da AFM sobre seus predecessores é a possibilidade de estudar materiais condutores e isolantes em temperaturas ambientes e sistemas biológicos em condições fisiológicas, como tecidos, células e vírus (Amorim *et al.*, 2022b; de Araujo Dorneles *et al.*, 2022b; Dias Rates *et al.*, 2024a; do Nascimento Amorim *et al.*, 2024). Por esse motivo, a AFM tem sido amplamente utilizada em pesquisas que estudam o tecido cerebral (Elkin, Ilankovan and Morrison, 2010; Viji Babu and Radmacher, 2019b).

A espectroscopia Raman é outra técnica versátil e não destrutiva que analisa a interação entre a luz e diferentes sistemas. Esta técnica foi desenvolvida após estudos do físico indiano Chandrasekhar Venkata Raman e seu aluno Krishnan (Raman and Krishnan, 1928). Na espectroscopia Raman, um feixe de luz monocromático é direcionado a uma amostra, e a luz espalhada é coletada e analisada. A maior parte da luz espalhada tem a mesma energia que a luz incidente, conhecida como espalhamento elástico, mas uma pequena fração da luz muda de energia devido à interação com as vibrações moleculares da amostra, conhecida como espalhamento inelástico ou espalhamento Raman (Orlando *et al.*, 2021). Essas mudanças de energia, chamadas de deslocamentos Raman, fornecem informações valiosas sobre vibrações

moleculares e ligações químicas na amostra, resultando em picos característicos que podem ser usados para identificar compostos químicos, determinar a estrutura molecular e monitorar reações químicas *in situ* (Chen *et al.*, 2009b).

Apesar da aplicabilidade dessas técnicas e da relevância do comprometimento cognitivo no DM, nenhum estudo aborda a relação entre hiperglicemia e demência do ponto de vista biofísico e vibracional. Este trabalho apresenta uma abordagem inovadora para estudar a correlação entre hiperglicemia e declínio cognitivo.

## 4.2 Materiais e Métodos

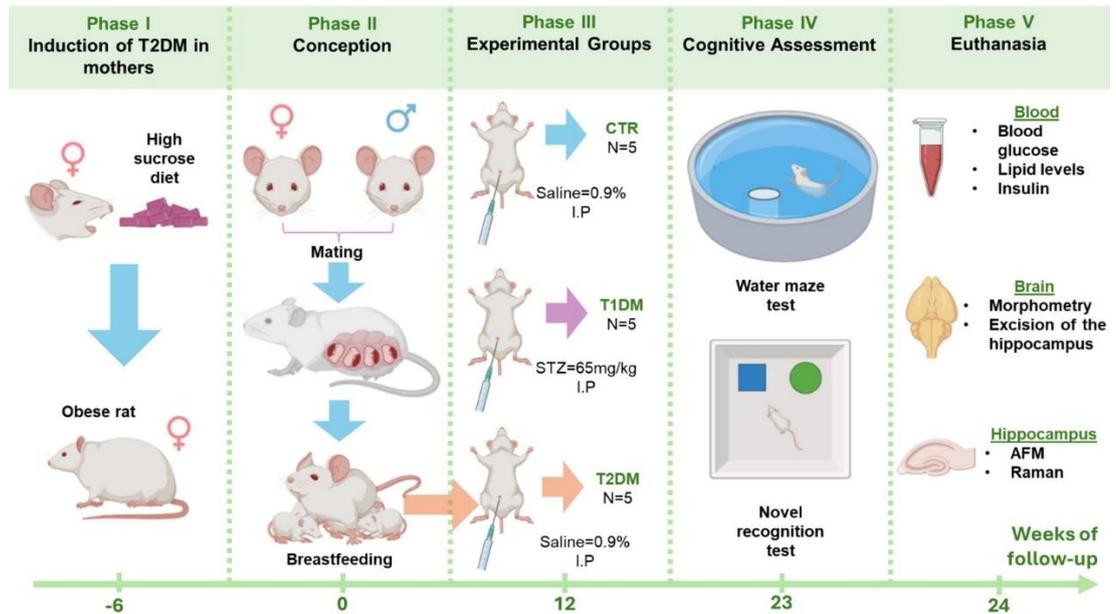
### 4.2.1 Desenho experimental

Ratos Wistar obtidos do biotério da Universidade Federal do Maranhão foram alojados em ambiente controlado (enriquecido com estímulos ambientais,  $22 \pm 2$  °C, umidade a 60%, ciclo claro/escuro de 12 horas), com acesso *ad libitum* à água e ração padrão. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso e Bem-Estar Animal da Universidade Federal do Maranhão, sob o número de parecer 23115.000747/2022-90.

A Figura 4.1 inclui um gráfico de linha do tempo descrevendo as dietas e intervenções usadas, o que ajuda a entender melhor os experimentos. Ratas Wistar fêmeas (n=6; 21 dias de idade) foram categorizadas por peso em dois grupos: ratos alimentados com ração padrão (Nuvital®, Nuvilab, Brasil) e ratos alimentados com uma dieta rica em sacarose (HSD) para induzir diabetes mellitus tipo 2 em seus descendentes. Conforme descrito anteriormente, a HSD foi fabricada adicionando-se à dieta padrão leite condensado e açúcar refinado (Sousa *et al.*, 2018). Após seis semanas de monitoramento, as fêmeas foram alojadas individualmente para acasalamento monogâmico, e os machos foram alimentados exclusivamente com ração padrão. Após a confirmação da gestação, as fêmeas foram separadas dos machos e mantidas com a prole até o desmame.

O experimento foi conduzido ao longo de 24 semanas e dividido em cinco fases, conforme mostrado na Figura 4.1. Na Fase I (semanas -6 a 0), ratas fêmeas foram alimentadas com uma dieta rica em sacarose para induzir obesidade e diabetes tipo 2. O acasalamento ocorreu na Fase II (semana 0), e ratas prenhes amamentaram seus filhotes. Na Fase III (semana 12), os filhotes foram divididos em três grupos: controle (CTR) recebendo solução salina, grupo DMT1 1 induzido pela droga estreptozotocina (STZ) (65 mg/kg) e grupo DMT2 que continuou a receber solução salina. Na Fase IV (semana 23), os ratos foram submetidos a testes cognitivos

como o labirinto aquático e testes de reconhecimento de objetos. Finalmente, na Fase V (semana 24), os ratos foram sacrificados, e amostras de sangue e cérebro foram coletadas para análises bioquímicas e morfométricas, incluindo análises hipocâmpais por AFM e espectroscopia Raman.



**Figura 4.1: Desenho experimental para obter amostras de controle, diabetes tipo 1 e tipo 2 em ratos.** Na Fase I, ratas fêmeas foram induzidas ao DMT2 usando uma dieta rica em sacarose. Após o acasalamento e amamentação (Fase II), os filhotes foram divididos em grupos experimentais (Fase III): controle (CTR), DMT1 induzido por STZ e DMT2. Na Fase IV, os ratos foram submetidos a testes cognitivos. Na Fase V, a eutanásia foi realizada para coletar amostras de sangue e cérebro para análises bioquímicas e estruturais do hipocampo.

A exposição materna a dietas obesogênicas, particularmente aquelas ricas em gorduras saturadas e açúcares adicionados, durante a gestação e lactação tem sido cada vez mais associada ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 na prole (Thompson and DeBosch, 2021). Essa associação está enraizada no conceito de Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (DOHaD), que postula que fatores ambientais durante períodos críticos do desenvolvimento inicial podem ter impactos duradouros na saúde de um indivíduo. A literatura mostra consistentemente o modelo roedor de síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose (HSD) para estudar os efeitos metabólicos prejudiciais no final da vida da exposição precoce a açúcares simples (Kereliuk, Brawerman and Dolinsky, 2017).

Após o desmame, os filhotes machos foram segregados e alocados em três grupos, conforme a seguir: grupo controle (CTR; n=5), composto por filhotes de mães controle que não passaram por nenhuma intervenção por 24 semanas; grupo diabetes mellitus tipo 1 (DMT1; n=5), composto por filhotes de mães controle que, na 12ª semana de vida, receberam uma dose

única de estreptozotocina (65 mg/kg; i.p.; tampão citrato; pH 4,5; após jejum de 12 horas) e foram então mantidos por mais 12 semanas; e, finalmente, grupo diabetes mellitus tipo 2 (DMT2; n=5), composto por filhotes de mães que receberam HSD antes e durante a gestação para induzir DM2, mas foram alimentadas exclusivamente com ração padrão por 24 semanas.

Durante todo o período de acompanhamento pós-indução (12 semanas), avaliações semanais do peso corporal foram conduzidas. Na 11ª semana, os animais passaram por um período de jejum de 8 horas antes da administração de 2 g/kg de glicose intraperitoneal para avaliar a tolerância à glicose (teste GTT). Amostras de sangue da veia da cauda foram coletadas imediatamente antes (tempo 0) e 15, 30, 60 e 120 minutos após o bólus de glicose para medição de glicose usando um glicosímetro (Accu-check Active®, Roche). Os dados são expressos como a área sob a curva dos níveis glicêmicos (Flister *et al.*, 2018). Além disso, na 11ª semana, os grupos foram submetidos a testes cognitivos - reconhecimento de novos objetos (Ennaceur and Meliani, 1992) e labirinto aquático (Morris, 1984).

Por fim, na 12ª semana, os animais foram submetidos a jejum de 8 horas, anestesiados e tiveram seus comprimentos naso-anal medidos para avaliar a obesidade pelo índice de Lee (Bernardis and Patterson, 1968). Posteriormente, foram eutanasiados por punção da aorta descendente e submetidos à laparotomia para coleta de gordura retroperitoneal, periepididimal e mesentérica. Adicionalmente, os animais foram submetidos à craniotomia para retirada do cérebro e isolamento do tecido hipocampal.

O sangue coletado foi deixado coagular e então centrifugado (3500 rpm, 10 minutos) para separação do soro, que foi utilizado para determinação dos níveis de glicose e triglicerídeos (Labtest®, Brasil) e insulina (Sigma-Aldrich®, Alemanha) de acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante do kit. A partir dessas dosagens, a resistência à insulina foi determinada pelo HOMA-IR (Matthews *et al.*, 1985; Guerrero-Romero *et al.*, 2010). Os órgãos coletados foram pesados para avaliação morfométrica, enquanto os hipocampos foram dissecados para avaliações subsequentes.

#### **4.2.2 Testes cognitivos**

Os animais foram submetidos a um teste de labirinto aquático para avaliar o aprendizado espacial e a memória dependentes do hipocampo (Morris, 1984). O aparelho era composto por uma piscina circular de fibra de vidro cheia de água (22 °C), dividida em quatro quadrantes e com pistas visíveis nas paredes para orientação. Uma plataforma de escape escondida foi posicionada 1,5 cm abaixo da superfície da água em um quadrante predefinido. Ao longo de três dias consecutivos, os animais foram submetidos a quatro testes por dia. Eles

foram liberados individualmente na água de um dos quatro quadrantes, de frente para uma parede do labirinto, e tiveram 60 segundos para localizar a plataforma escondida. Os ratos que não conseguiram encontrar a plataforma dentro desse tempo foram gentilmente guiados até ela e permaneceram lá por 30 segundos. A latência para encontrar a plataforma escondida foi registrada como um indicador de aprendizado espacial, expressa como o intervalo entre os testes diários. No quarto dia, a plataforma foi removida e os animais foram liberados no centro da piscina para nadar por 120 segundos. O tempo gasto no quadrante onde a plataforma estava localizada anteriormente foi registrado como uma medida de retenção de memória de curto prazo.

Concomitantemente, a memória episódica foi avaliada usando o teste de reconhecimento de novos objetos (Ennaceur and Meliani, 1992), consistindo em três estágios: habituação, familiarização e teste. Durante a habituação, os animais foram colocados em uma caixa quadrada (2.500 cm<sup>2</sup>), idêntica à usada nos estágios subsequentes, e tiveram permissão para explorar por 5 minutos livremente. Após um intervalo de 24 horas, o estágio de familiarização começou. Dois objetos semelhantes foram posicionados em quadrantes opostos dentro da caixa. Os animais foram então introduzidos individualmente no centro da caixa por 5 minutos de exploração livre, durante os quais o tempo de exploração para cada objeto foi registrado. Após um atraso de 1 hora, a fase de teste começou. Um dos objetos foi substituído por um novo de formato diferente. Os animais foram reintroduzidos na caixa e receberam 5 minutos para exploração, com o tempo de exploração para cada objeto registrado. A avaliação da memória episódica foi baseada no tempo gasto pelo animal explorando o novo objeto em relação ao tempo total de exploração.

#### **4.2.3 Preparação de amostras**

Após a eutanásia, os cérebros foram rapidamente removidos e colocados em nitrogênio líquido para minimizar a degradação do tecido. Este processo preserva a estrutura nativa do tecido sem introduzir fixadores químicos que podem alterar as propriedades mecânicas do tecido. As seções foram preparadas usando um criostato, que permite o corte de amostras congeladas em seções ultrafinas (tipicamente entre 10-50 micrômetros de espessura), conforme empregado por outros autores (Vinckier and Semenza, 1998; Dufrene, 2008; Plodinec *et al.*, 2012). A temperatura do criostato foi mantida entre -20 °C e -30 °C para garantir cortes precisos e evitar a deformação do tecido. As seções de tecido foram montadas em lâminas de vidro para análise de AFM e espectroscopia Raman. As lâminas com seções de tecido foram secas ao ar em temperatura ambiente. Todas essas etapas garantem a mais alta preservação do tecido,

proporcionando maior confiabilidade e fidelidade em dados quantitativos, pois ocorreu intervenção mínima.

#### 4.2.4 Configuração de AFM

A Microscopia de Força Atômica foi analisada usando um AFM *Multimode 8* (Bruker, Santa Barbara, CA, EUA) no modo *PeakForce Quantitative Nanomechanics (QNM)*. Sondas qp-HBC (Nanosensors™) com uma constante de mola nominal de 0,5 N/m e um raio de ponta de < 10 nm foram usadas para todas as medições. Toda a aquisição de dados foi feita em um ambiente de ar (temperatura de 23 °C e 44% de umidade) com parâmetros de varredura de taxa de varredura de 0,3 Hz e área de varredura de 25 × 25 μm<sup>2</sup> para análise de tecido. Cada grupo de amostra tinha três seções hipocâmpais, e nove regiões foram analisadas para cada seção hipocâmpal, totalizando 27 mapas por grupo de amostra. As regiões analisadas compreendiam CA2 e CA3 do hipocampo.

O modo *Peak Force Quantitative Nanomechanics (PF-QNM)* na microscopia de força atômica permite a caracterização, em nanoescala, detalhada das propriedades mecânicas dos materiais, incluindo rigidez, adesão e dissipação de energia (Li, Xi and Liu, 2021). Durante a varredura, a ponta do AFM faz contato periódico com a superfície da amostra. Em cada ciclo de contato, a ponta se aproxima da superfície, aplica força crescente até atingir um valor máximo (pico de força) e então se retira, registrando uma curva força-distância em cada contato. Esta curva mede a força como uma função da distância entre a ponta e a superfície, fornecendo insights sobre as propriedades nanomecânicas da amostra. A curva de força é essencial para analisar as características da superfície e pode ser medida fora da ressonância ou perto da ressonância fundamental do cantilever (Garcia, 2020).

#### 4.2.5 Configuração de Espectroscopia Raman

Foi utilizado um espectrômetro Raman triplo (modelo T64000, Horiba), operando no modelo *single* com resolução menor que 2 cm<sup>-1</sup>. O instrumento possui um detector de dispositivo de carga acoplada (CCD) resfriado por N<sub>2</sub> líquido. Para excitação foi utilizada luz verde de 532,0 nm (LAS-532-100-HREV) operando a 14 mW. Os espectros foram adquiridos em cinco pontos diferentes da superfície para cada grupo amostral após cinco aquisições de 30 s cada em cada faixa do grau de dispersão espectral. Assim como nas medidas de AFM, as regiões analisadas compreenderam CA2 e CA3 do hipocampo, mantendo-se sempre a região analisada para cada amostra, com prévia visualização em microscópio óptico.

#### 4.2.6 Análise de Dados

Para análise dos dados estatísticos de rugosidade, o parâmetro escolhido consiste na altura de cada pixel dos mapas de altura através da rugosidade quadrática média  $R_q$ , pois representa um desvio padrão da distribuição de alturas na superfície, segundo a metodologia utilizada por Rates e colaboradores (Rates *et al.*, 2022b). Em resumo, antes da análise de rugosidade, os mapas foram pré-tratados com ajuste polinomial de terceira ordem, permitindo que diferenças de altura mais significativas, promovidas especialmente pela preparação da amostra, fossem minimizadas, resultando em topografia com contribuições mais substanciais das estruturas da superfície do hipocampo. Mapas topográficos medindo  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$  de área foram analisados nesta etapa. Dados de adesão nanomecânica e módulo de Young foram calculados a partir de curvas de força obtidas por meio de experimentos de espectroscopia de força. Dados de módulo de Young puderam ser extraídos de ajustes das curvas de força em uma faixa de deflexão utilizando o modelo de um indentador em forma de cone, proposto por Derjaguin Muller Toporov (DMT) (Derjaguin, Muller and Toporov, 1975a), que considera as forças de adesão em medidas de AFM. De acordo com a metodologia de Cardoso-Lima e colaboradores (Cardoso-Lima *et al.*, 2021), a força de adesão foi calculada a partir das curvas de retração, considerando o valor mínimo de deflexão do cantilever. Este valor representa a resistência da sonda em deixar a superfície do tecido hipocampal. A área da superfície do tecido é computada por triangulação de superfície simples usando análise estatística do software Gwyddion 2.60 (Gwyddion user guide, 2024). O volume do tecido foi calculado como a integral da altura da superfície sobre a área escaneada usando o mesmo software (Gwyddion user guide, 2024).

O processamento de dados de espectroscopia Raman foi realizado usando o software LabSpec6. Os picos estreitos causados por raios cósmicos foram removidos em sequência, e a variação do fundo de fluorescência e o substrato de vidro foram estimados usando o ajuste polinomial de quinta ordem e subtraídos. A técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada ao conjunto de dados espectrais, usando um método estatístico capaz de reduzir a dimensionalidade dos dados, mantendo os valores com maior variação presente nos dados originais. A análise de variância é usada nas pontuações dos dez componentes principais para identificar quais componentes principais apresentam diferenças significativas nas pontuações médias entre os dois grupos de células (Ong, Lim and Liu, 2012). Esta análise foi conduzida usando o software OriginLab.

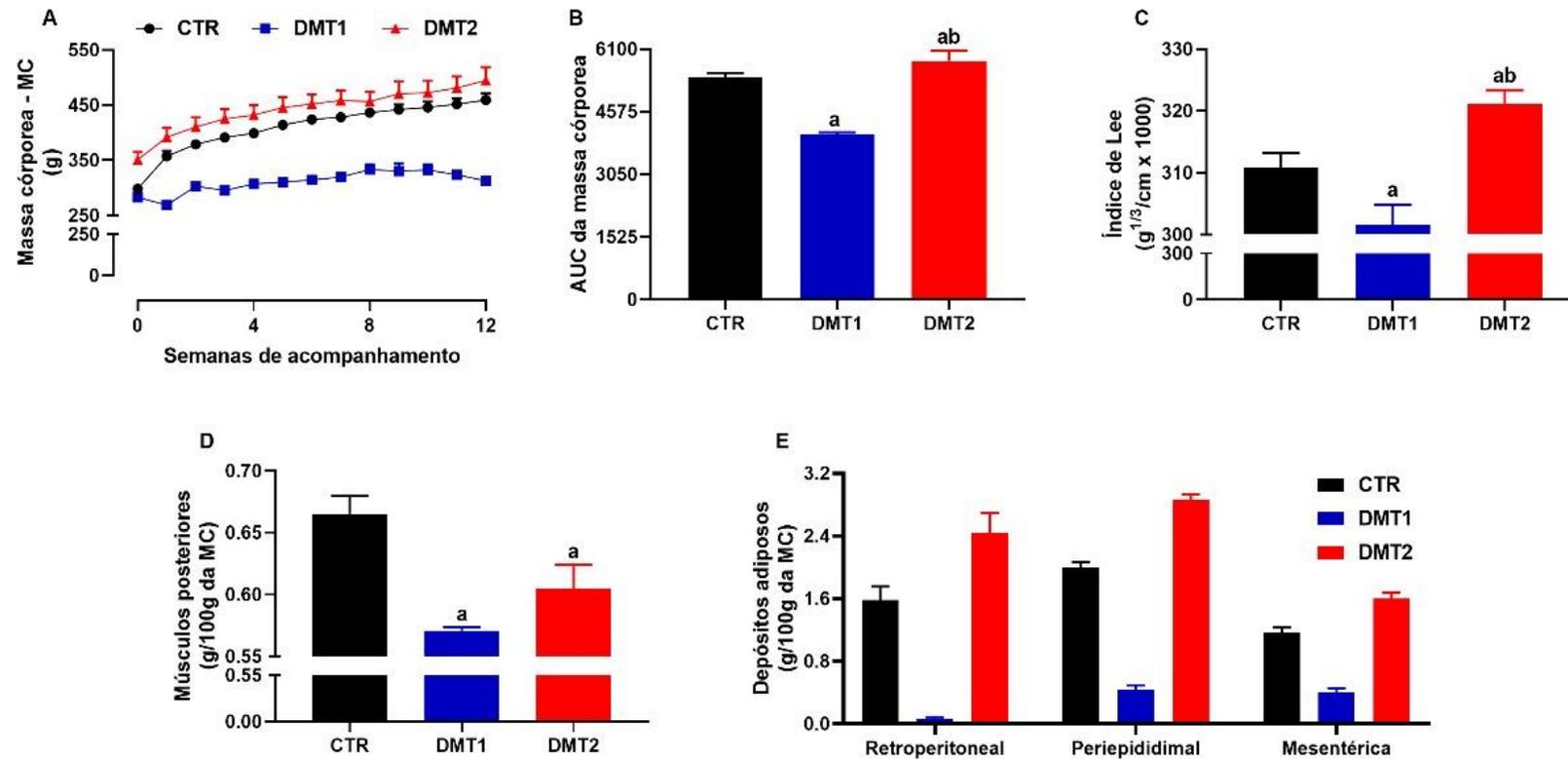
#### 4.2.7 Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida usando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., EUA) e o software Origin 2024 (Originlab Inc., EUA). Os dados dos testes em animais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e submetidos a um teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido por ANOVA unidirecional (pós-teste Tukey) para um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) (Schaarschmidt, Ritz and Hothorn, 2022). Temos um valor associado a cada curva de força para dados nanomecânicos envolvendo adesão e módulo de Young, totalizando 65.536 curvas de força por mapa. Para dados de rugosidade, um único valor  $R_q$  é adquirido por mapa, considerando cada pixel da imagem em altura (256 x 256 pixels). O erro calculado foi o desvio padrão (DP) em todos os dados.

### 4.3 Resultados e Discussões

#### 4.3.1 Caracterização do Diabetes

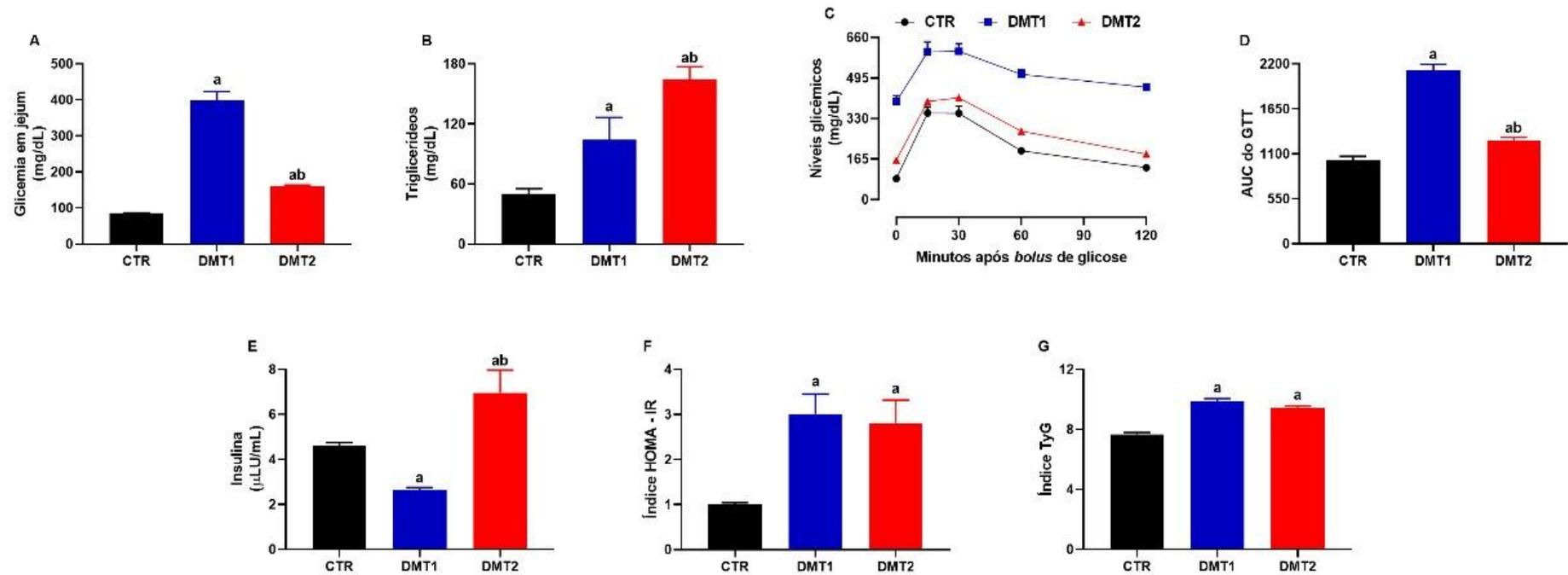
Inicialmente, foi determinado o estado metabólico geral dos animais CTR, DMT1 e DMT2 (Figura 4.2). Animais do grupo DMT2 exibiram maior massa corporal que CTR, enquanto ratos DMT1 apresentaram massa corporal reduzida. Consistente com os dados de massa corporal, os animais com DMT1 pareciam magros (Figura 4.2C), exibiam sarcopenia (Figura 4.2D) e experimentaram uma redução significativa na massa adiposa (Figura 4.2E). Por outro lado, os animais com DMT2 apresentaram sinais de obesidade central (Figura 4.2C), sarcopenia obesogênica (Figura 4.2D) e acúmulo de tecido adiposo visceral e não visceral (Figura 4.2E).



**Figura 4.2: Diferenças morfométricas entre os tipos de Diabetes mellitus.** A, peso corporal (g); B, área sob a curva (AUC) do peso corporal; C, índice de Lee (g<sup>1/3</sup>/cm·1000); D, peso relativo (g/100g de PC) dos músculos posteriores (sóleo e gastrocnêmio); E, peso relativo (g/100g de PC) dos coxins adiposos retroperitoneais, periepídimalis e mesentéricos avaliados em ratos controle (CTR, n=5), ratos diabéticos tipo 1 (DM T1, n=5) e ratos diabéticos tipo 2 (DMT2, n=5). Pontos e barras representam média ± SEM (Anova-Tukey unidirecional). a representa p < 0,05 quando comparado ao CTR, enquanto b representa p < 0,05 quando comparado ao DMT1.

As diferenças nos estados metabólicos observadas entre os grupos de estudo (CTR, DMT1 e DMT2) refletem as características distintas dos quadros de diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2, com implicações metabólicas e fisiológicas evidentes. O DMT1 é uma condição autoimune caracterizada pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas, levando à deficiência de insulina e consequente incapacidade de utilização eficiente da glicose como fonte de energia (Antar *et al.*, 2023a). Esse quadro contribui para a redução da massa corporal, como observado nos animais do grupo DMT1, e é frequentemente associado à sarcopenia, que representa a perda de massa e força muscular (Mankhong *et al.*, 2020). A diminuição da massa adiposa também é esperada, já que a lipólise aumenta em condições de deficiência de insulina, resultando no esgotamento dos estoques lipídicos (Holt *et al.*, 2021). Por outro lado, o DMT2 está associado à resistência à insulina e a uma produção compensatória de insulina pelo pâncreas, levando ao acúmulo de gordura corporal e obesidade central (Celis-Morales *et al.*, 2022, p. 2). Os dados apresentados indicam sinais de sarcopenia obesogênica nos animais com DMT2, o que está de acordo com a literatura, pois o excesso de gordura visceral frequentemente coexiste com a redução da massa muscular, especialmente em estados de inflamação crônica de baixo grau característicos dessa condição (Stumvoll, Goldstein and van Haeften, 2005, p. 2). Além disso, a redistribuição da gordura para compartimentos viscerais e não viscerais é uma característica marcante do DMT2, frequentemente associada ao aumento do risco de complicações metabólicas e cardiovasculares (DESPRÉS, 2012). Essas alterações evidenciam a interação entre metabolismo lipídico e resistência à insulina, exacerbando o acúmulo de tecido adiposo nos depósitos centrais.

Em relação ao eixo glicose-insulina, o grupo DMT1 apresentou hiperglicemia grave em jejum (Figura 4.3A), níveis elevados de triglicerídeos (Figura 4.3B), intolerância à glicose (Figura 2C-D), hipoinsulinemia (Figura 2E) e resistência à insulina, tanto periférica quanto hepática (Figura 4.3F-G). Embora o grupo DMT2 também apresentasse níveis glicêmicos aumentados (Figura 4.3A), hipertrigliceridemia considerável (Figura 4.3B) e intolerância à glicose (Figura 4.3C-D) semelhante ao grupo DMT1, demonstrou um padrão oposto em termos de níveis de insulina, mostrando hiperinsulinemia (Figura 4.3E). Finalmente, o grupo DMT2 exibiu graus de resistência à insulina periférica (Figura 4.3F) e hepática (Figura 4.3G) idênticos aos do grupo T1DM. Nossos dados mostram características clássicas de DMT1 e DMT2 nos respectivos grupos de animais.



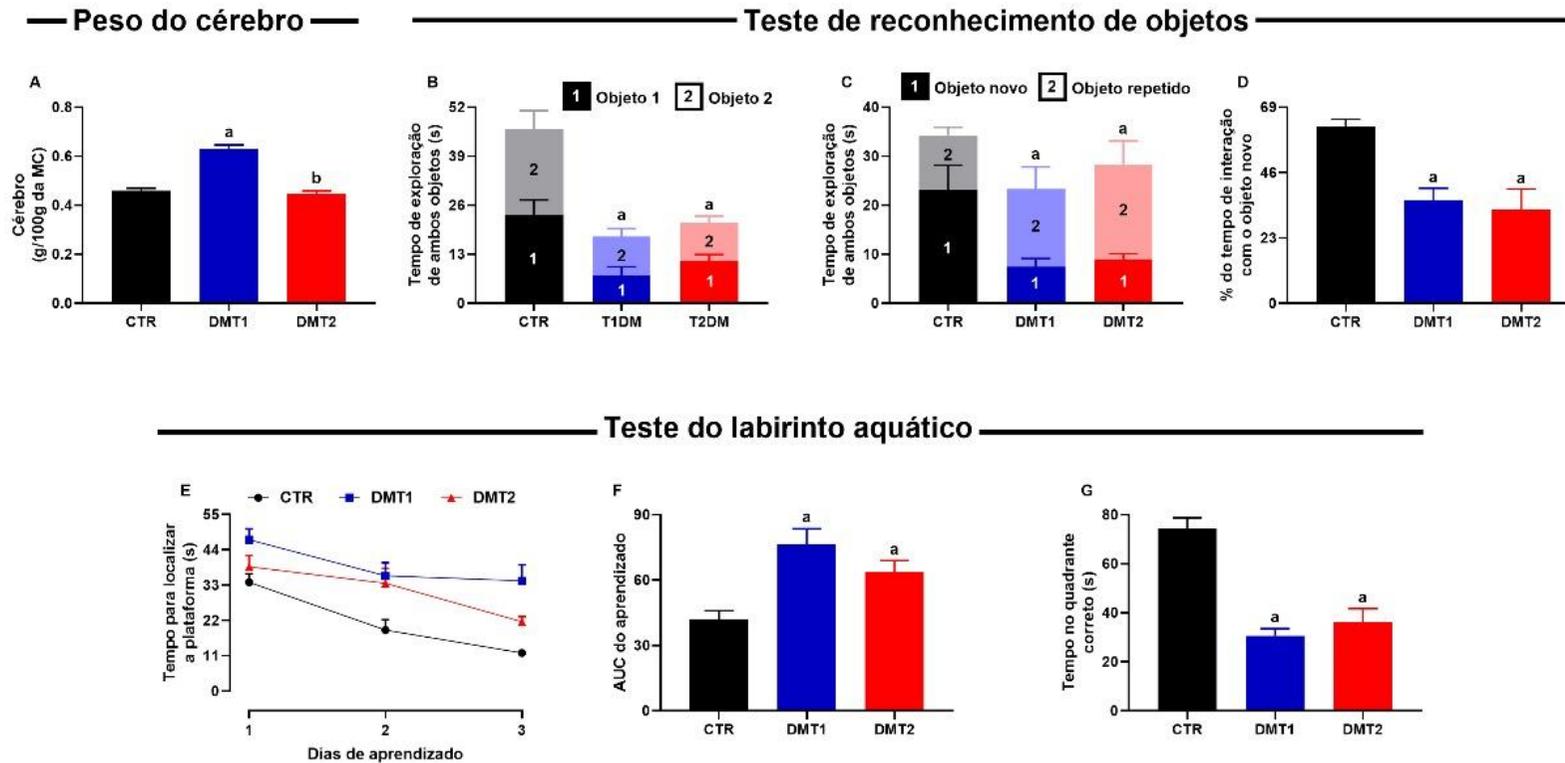
**Figura 4.3. Eixo glicose-insulina e resistência à insulina em diferentes tipos de Diabetes mellitus.** A, Níveis glicêmicos de jejum (mg/dL); B, níveis séricos de triglicerídeos (mg/dL); C, níveis glicêmicos (mg/dL) durante teste de tolerância à glicose – GTT; D, AUC dos níveis glicêmicos durante o GTT; E, níveis séricos de insulina (μLU/mL); F, índice HOMA para estabelecer resistência periférica à insulina; e G, índice TyG para estabelecer resistência hepática à insulina em ratos controle (CTR, n=5), ratos diabéticos tipo 1 (DM T1, n=5) e ratos diabéticos tipo 2 (DMT2, n=5). Pontos e barras representam média ± SEM (Anova-Tukey unidirecional). a representa  $p < 0,05$  quando comparado ao CTR, enquanto b representa  $p < 0,05$  quando comparado ao DMT1.

Como mencionado, o diabetes mellitus tipo 1 é caracterizado pela destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas, levando a uma deficiência absoluta de insulina (Antar *et al.*, 2023a). Essa condição resulta em hiperglicemia grave em jejum, intolerância à glicose e hipoinsulinemia, como observado nos dados apresentados. O déficit de insulina também contribui para a resistência periférica e hepática à insulina, devido à redução do transporte de glicose para os tecidos e aumento da produção hepática de glicose (Matthews *et al.*, 1985). Além disso, os níveis elevados de triglicerídeos refletem o aumento da lipólise e da produção hepática de VLDL, uma característica comum em estados de deficiência de insulina. Por outro lado, o diabetes mellitus tipo 2 é predominantemente uma condição de resistência à insulina, frequentemente associada à hiperinsulinemia compensatória, como evidenciado nos dados do grupo DMT2 (Davies *et al.*, 2018). A hiperglicemia e a intolerância à glicose ocorrem devido à incapacidade dos tecidos periféricos de responder adequadamente à insulina e à produção hepática aumentada de glicose. A hipertrigliceridemia no DMT2 é atribuída ao aumento da lipólise no tecido adiposo visceral e à redução da depuração de triglicerídeos pelas lipoproteínas lipase (Stumvoll, Goldstein and van Haeften, 2005, p. 2)

Portanto, os dados apresentados, que mostram resistência periférica e hepática à insulina tanto no grupo DMT1 quanto no DMT2, são consistentes com a literatura. Enquanto no DMT1 a resistência é secundária à deficiência de insulina, no DMT2 ela é um dos principais mecanismos patogênicos, exacerbada pela inflamação crônica de baixo grau e pela deposição ectópica de lipídios nos tecidos.

#### **4.3.2 Avaliação da Cognição**

Após a confirmação da indução dos diferentes tipos de Diabetes, os grupos foram submetidos a testes de avaliação do desempenho cognitivo. Inicialmente, em relação à avaliação morfométrica dos cérebros coletados, foram observadas diferenças apenas nos cérebros do grupo DMT1, que eram mais pesados (Figura 4.4 A).



**Figura 4.4: Morfometria cerebral e função cognitiva em diferentes tipos de diabetes mellitus.** A, peso relativo (g/100g de PC) do cérebro total; B, tempo total (s) gasto explorando os dois objetos idênticos durante o estágio de familiarização no teste de reconhecimento de novos objetos; C, tempo total (s) gasto explorando objetos novos e familiares durante o teste de reconhecimento de novos objetos; D, tempo relativo de exploração (%) do novo objeto no teste de reconhecimento de novos objetos; E, tempo (s) gasto aprendendo a localização da plataforma de fuga em dias consecutivos de treinamento no teste do labirinto aquático; F, AUC do tempo de aprendizagem no teste do labirinto aquático; G, tempo (s) de exploração até o quadrante alvo no teste do labirinto aquático em ratos controle (CTR, n=5), ratos diabéticos tipo 1 (DM T1, n=5) e ratos diabéticos tipo 2 (DM T2, n=5). Pontos e barras representam média  $\pm$  SEM (Anova-Tukey unidirecional). A representa  $p < 0,05$  em comparação com CTR, enquanto b representa  $p < 0,05$  em comparação com DM1.

Em contraste com os dados morfológicos, as repercussões cognitivas associadas aos diferentes tipos de Diabetes foram semelhantes. No teste de reconhecimento de objetos novos, durante a etapa de familiarização, ambos os grupos apresentaram tempos de exploração mais curtos dos dois objetos (Figura 4.4B). Isso pode ser interpretado como comportamento de ansiedade (Karpha *et al.*, 2022). Além disso, no teste *in situ*, ambos os grupos apresentaram interação reduzida com o objeto desconhecido (Figura 4.4C), indicando prejuízos na memória episódica independente da função do hipocampo. Da mesma forma, os animais diabéticos apresentaram maior dificuldade em aprender a localização precisa da plataforma de fuga com base em pistas ambientais (Figura 4.4D-E), e não conseguiram lembrar o quadrante onde a plataforma estava anteriormente localizada (Figura 4.4F). Esses achados sugerem déficits significativos na aprendizagem dependente do hipocampo e na consolidação da memória. Independentemente do modelo, os ratos diabéticos apresentaram comprometimento cognitivo. Por exemplo, muitos animais diabéticos tinham medo do objeto dentro da caixa, reforçando a relação entre Diabetes e ansiedade (Smith, Deschênes and Schmitz, 2018). Isto é comparável com estudos anteriores. No estudo de Mennenga e colaboradores (Mennenga *et al.*, 2015), animais tratados com Harmine, um psicofármaco, apresentaram deficiências motoras e comportamentais, demonstradas pela falta de competência para realizar os componentes processuais do teste do labirinto aquático. No estudo de Gardner e colaboradores (Gardner *et al.*, 2020), os autores compararam os efeitos do envelhecimento na aprendizagem de diversas tarefas sensíveis ao hipocampo, identificando desempenho prejudicado em uma tarefa de localização de objetos em ratos mais velhos.

Sabe-se que o DMT1 e o DMT2 levam ao comprometimento cognitivo por meio de danos no hipocampo, de acordo com os resultados apresentados na Figura 4.4. Destacamos que no DMT1, déficits cognitivos são frequentemente observados em funções executivas, atenção e memória de trabalho. Episódios frequentes de hipoglicemia podem causar danos neuronais e reduzir a plasticidade sináptica do hipocampo, comprometendo o aprendizado e a memória (Marzelli *et al.*, 2014). Em contraste, o DMT2 está associado a um risco maior de declínio cognitivo progressivo e demência, incluindo Alzheimer. Pacientes com DMT2 frequentemente apresentam dificuldades na memória episódica, funções executivas e velocidade de processamento. Resistência à insulina, inflamação crônica e comorbidades cardiovasculares contribuem para o comprometimento cognitivo e aumentam o risco de neurodegeneração (Biessels and Despa, 2018a).

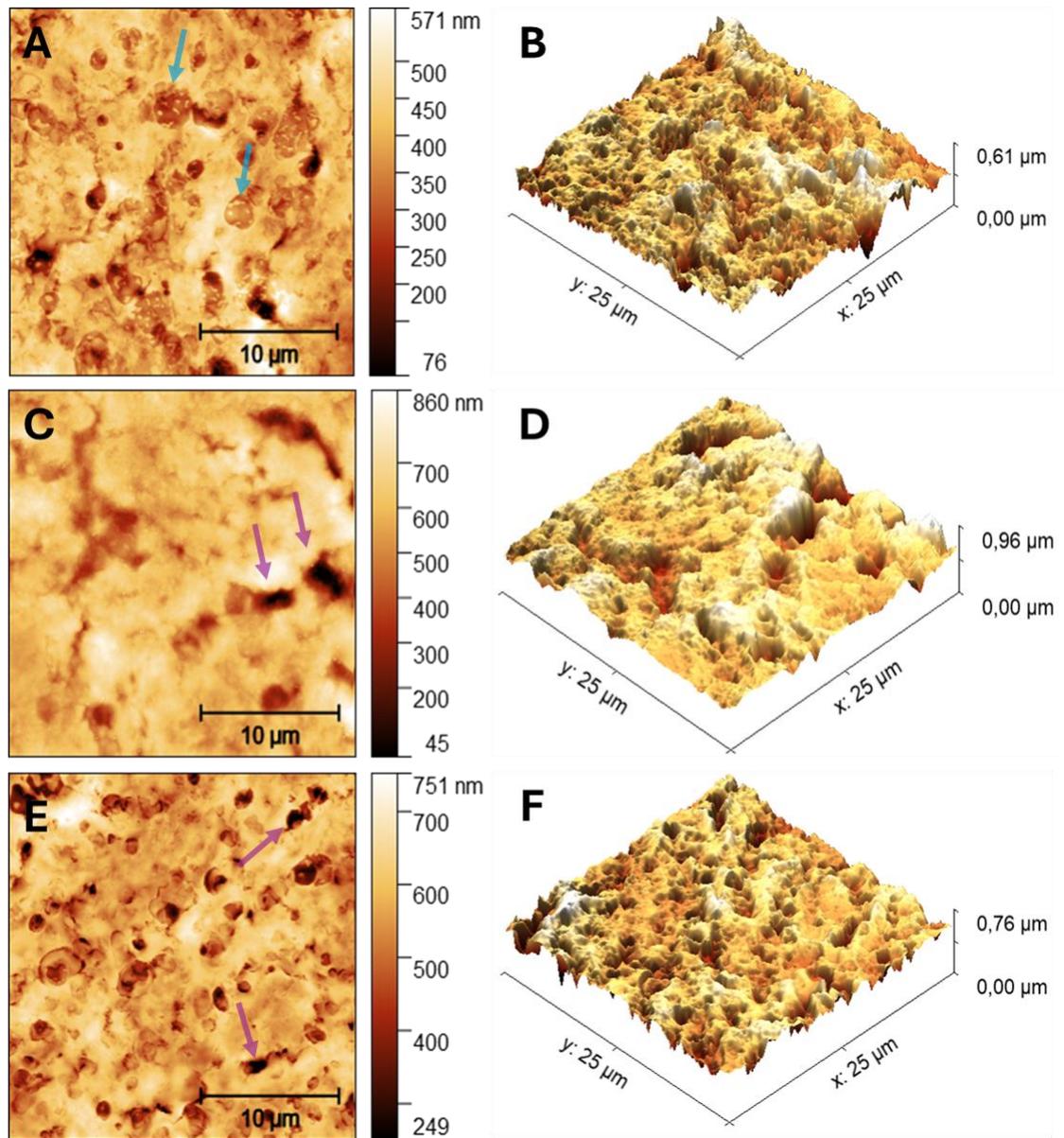
### 4.3.3 Resultados ultraestruturais

Tanto o DMT1 quanto o DMT2 são conhecidos por levar ao comprometimento cognitivo por meio de danos no hipocampo (Karvani *et al.*, 2019). Aqui, mostramos alterações biofísicas fundamentais usando criosecção do hipocampo de ratos com DMT1 e DMT2. De fato, ambos os modelos de ratos diabéticos tiveram cognição prejudicada associada ao aumento da rugosidade do hipocampo, volume, área de superfície e redução das forças de adesão e Módulo de Young (MY). Essas alterações pareciam mais proeminentes em ratos DMT1, indicando danos mais significativos ao hipocampo. No geral, essas alterações biofísicas foram associadas a um desarranjo global desses tecidos, conforme evidenciado pela Espectroscopia Raman. Essas descobertas lançam luz sobre os aspectos biofísicos de como o diabetes prejudica o hipocampo e podem melhorar nossa compreensão do declínio cognitivo associado ao diabetes.

Para avaliar se o declínio cognitivo de ratos com DMT1 e DMT2 estava associado a alterações biofísicas, usamos AFM para estudar as características morfológicas de seu hipocampo. O estudo morfológico dos tecidos cerebrais por meio de técnicas como AFM é de grande importância, pois permite a visualização de estruturas em nanoescala, fornecendo detalhes precisos da morfologia do tecido cerebral, o que pode ser essencial para a compreensão da organização microscópica do cérebro e identificação de alterações estruturais associadas a condições neuropatológicas. Essas descobertas podem ajudar a entender os mecanismos subjacentes dessas doenças e identificar biomarcadores (Farniev *et al.*, 2022). A Figura 4.5 mostra as diferenças na morfologia dos tecidos com DM em comparação ao controle. Primeiramente, ao observar a barra da escala de altura, observa-se que essa escala aumenta para os grupos com DM (Figuras 4.5C/D e E/F) em comparação ao grupo controle (Figuras 4.5A/B), com destaque para a amostra com DMT1, indicando maiores diferenças de altura, possivelmente associadas aos furos observados nesses tecidos (setas roxas). No perfil morfológico do grupo controle, estão presentes estruturas internas aos poros que não são vistas nas amostras dos grupos DM (setas azuis).

Na Figura 5.4A/C/E, vários furos podem ser vistos no perfil morfológico das amostras. Usando o Gwyddion Software, o diâmetro médio e a profundidade dos furos ( $n=30$ ) de cada mapa representativo para as amostras foram quantificados com erro padrão. Os resultados dos diâmetros dos furos para as amostras controle, DMT1 e DMT2 foram, respectivamente,  $1,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ,  $3,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$  e  $2,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Para o cálculo da profundidade, os resultados para as amostras controle, DMT1 e DMT2 foram  $179 \pm 28 \text{ nm}$ ,  $513 \pm 53 \text{ nm}$  e  $454 \pm 32 \text{ nm}$ . Esses

dados indicam um aumento significativo no tamanho e na profundidade dos furos nas amostras DMT1 e DMT2 em comparação com as amostras controle, sugerindo maior dano tecidual em casos de diabetes.



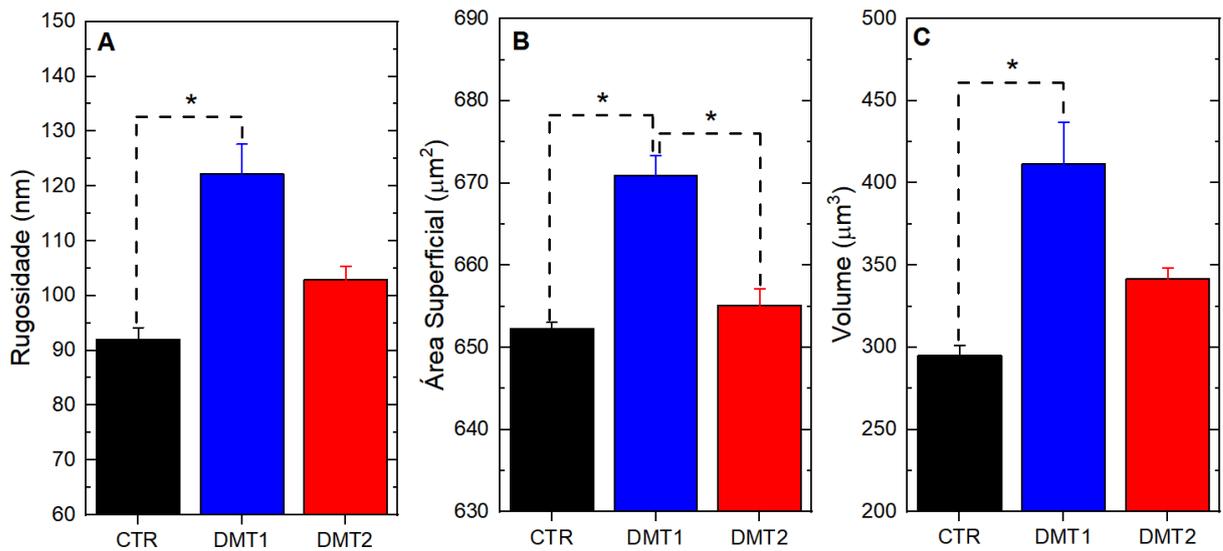
**Figura 4.5: Mapas morfológicos AFM.** A. Mapa de altura do tecido hipocampal controle. As setas azuis apontam para estruturas observadas apenas no tecido hipocampal controle. C. Mapa de altura dos tecidos do grupo DMT1 e D. Grupo DMT2. As setas roxas apontam para buracos no tecido DMT1 e DMT2. As Figuras B, D e F mostram seus respectivos mapas tridimensionais.

Na Figura 4.5, vários buracos podem ser vistos. As mudanças mais marcantes no perfil morfológico observadas podem estar relacionadas à redistribuição de proteínas e rearranjo estrutural celular local decorrente de complicações hiperglicêmicas, como também observado nos resultados do diâmetro e profundidade dos buracos nos tecidos hiperglicêmicos em relação

ao tecido controle. De fato, Magariños e colaboradores (Magariños and McEwen, 2000) mostraram mudanças morfológicas no DMT1 induzido por STZ, incluindo atrofia dendrítica em neurônios piramidais, reorganização sináptica neuronal e aumento da proliferação de astrócitos. Além disso, este mesmo estudo concluiu que houve uma redistribuição de proteínas sinápticas no tecido, o que poderia indicar a interrupção da formação de sinapses contínuas entre neurônios no hipocampo de um modelo animal com Diabetes induzido por estreptozotocina (Grillo *et al.*, 2005).

Em relação ao DMT2, dados do estudo de Wrihten e colaboradores (Wrihten *et al.*, 2009) indicam que o declínio cognitivo devido ao DMT2 pode ser parcialmente atribuível ao rearranjo estrutural e às alterações nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios do hipocampo. Ao mesmo tempo, um estudo de Park e colaboradores (Park *et al.*, 2019) mostrou que o tecido cerebral afetado pela Doença de Alzheimer apresentava orifícios alargados com distribuição irregular, diferentemente do tecido saudável. Esses estudos corroboram nossos resultados de morfologia e convergem com as proposições aqui destacadas, mostrando que alterações na morfologia do hipocampo diabético podem estar associadas a disfunções cognitivas, como memória e aprendizagem, de acordo com os resultados cognitivos, que mostram que animais hiperglicêmicos tiveram memória e capacidade de aprendizagem afetadas negativamente.

A análise morfológica do tecido motivou o estudo de parâmetros ultraestruturais quantitativos do hipocampo, conforme mostrado na Figura 4.6. A Figura 4.6A mostra os resultados da rugosidade quadrática média dos tecidos analisados. Os valores médios de  $R_q$  e seus respectivos erros padrão são  $92 \pm 4$  nm,  $122 \pm 11$  nm e  $103 \pm 5$  nm para os tecidos controle, DMT1 e DMT2. De fato, a rugosidade média é maior para amostras de tecido com Diabetes em comparação com a amostra controle. Esses resultados de rugosidade de superfície foram identificados como um novo biomarcador de superfície de tecido e têm sido amplamente aplicados no estudo de sistemas biológicos, incluindo a caracterização de materiais na nanotecnologia (Nosonovsky and Bhushan, 2008a) .



**Figura 4.6: Dados quantitativos de AFM.** Dados quantitativos sobre propriedades ultraestruturais de tecidos do grupo controle (normoglicêmico) e pacientes com diabetes. (A) Rugosidade, (B) Área de superfície do tecido, (C) Gráficos de volume. Asteriscos indicam diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .

Outros dois dados ultraestruturais importantes que podem ser analisados a partir de medidas de AFM são área de superfície e volume (Figuras 4.6B e C). Os valores de Área de Superfície e seus respectivos erros padrão são  $652 \pm 2 \mu\text{m}^2$ ,  $671 \pm 5 \mu\text{m}^2$  e  $655 \pm 4 \mu\text{m}^2$  para os tecidos controle, DMT1 e DMT2. Pode-se observar um aumento no valor médio da área para os grupos com Diabetes em relação à amostra controle. A Figura 4.6C mostra os resultados de volume dos tecidos analisados, mostrando o aumento de volume para os tecidos com DMT1 e DMT2. Os valores de volume e seus respectivos erros padrão são  $295 \pm 12 \mu\text{m}^3$ ,  $411 \pm 50 \mu\text{m}^3$  e  $342 \pm 14 \mu\text{m}^3$  para os tecidos controle, DMT1 e DMT2.

Em consonância com as alterações morfológicas, encontramos aumento da rugosidade em amostras diabéticas, mostradas na Figura 4.6A. Isso pode ser atribuído ao acúmulo de ácidos graxos livres, produtos de glicação avançada (AGE) e/ou excesso de citocinas e neurotoxinas na superfície do hipocampo. É importante enfatizar que o hipocampo, uma região do cérebro crucial para a cognição, é altamente sensível à insulina e tem uma alta expressão de receptores para esse hormônio (Liu *et al.*, 2022). Essa sensibilidade se deve principalmente ao envolvimento direto da insulina na regulação da neurogênese, sinaptogênese e plasticidade sináptica (Spinelli, Fusco and Grassi, 2019). De fato, condições de hipoinsulinemia, como as observadas no DM1, levam à redução da potenciação de longo prazo (Wang *et al.*, 2022), diminuição da transmissão sináptica (Wang *et al.*, 2022) e degeneração progressiva e morte dos neurônios do hipocampo (Pamidi and Satheesha Nayak, 2012), resultando em graves

comprometimentos cognitivos (Wang *et al.*, 2022). Por outro lado, condições de hiperinsulinemia, associadas à diminuição da resposta à insulina — um contexto distinto do DMT1 e característico do DMT2 — também causam danos neuronais semelhantes (Matsunaga *et al.*, 2016) e deficiências funcionais (Pinto *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2024). Isso destaca que quaisquer alterações nos níveis e na resposta à insulina são prejudiciais à homeostase do hipocampo. O hipocampo é um local-chave para a plasticidade sináptica e formação da memória. A hiperglicemia crônica e a falta de controle glicêmico podem levar à disfunção neuronal e à morte celular no hipocampo, afetando sua estrutura e, possivelmente, a rugosidade da superfície (Horvath *et al.*, 2010). Também é digno de nota que a rugosidade é uma medida nanométrica da altura, o que torna plausível associar esses dados a alterações proteicas e moleculares na membrana. Novamente, a atenção é atraída para as amostras de DMT1, que obtiveram o maior valor médio de rugosidade em comparação aos outros grupos. Curiosamente, Park e colaboradores (Park *et al.*, 2019) encontraram maior rugosidade no tecido cerebral da doença de Alzheimer em comparação aos cérebros de controle. Portanto, a rugosidade aumentada aqui identificada no hipocampo diabético pode estar ligada à neuroinflamação e ao estresse oxidativo, semelhante ao que foi encontrado em um estudo sobre a doença de Alzheimer.

É importante notar que as alterações na rugosidade do hipocampo no diabetes e na doença de Alzheimer podem ser sutis e exigir técnicas de análise sensíveis, como a microscopia de força atômica, que é usada nesta pesquisa, para serem detectadas e quantificadas. Embora existam algumas semelhanças nas consequências das duas condições patológicas no hipocampo, os mecanismos subjacentes são diferentes. A doença de Alzheimer envolve processos neurodegenerativos específicos, enquanto o diabetes mellitus é uma condição metabólica que pode afetar o cérebro de forma mais indireta.

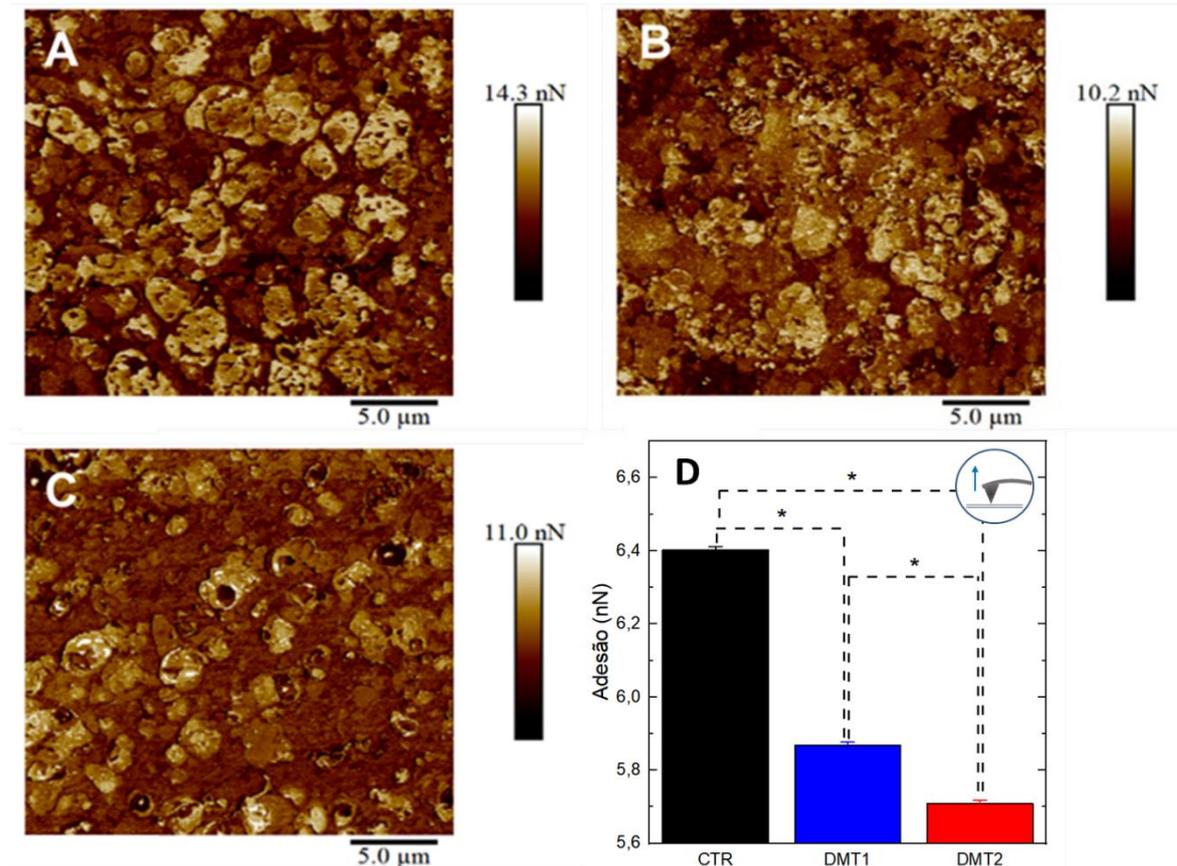
Em condições normoglicêmicas, o diabetes geralmente não está associado ao aumento da área de superfície do hipocampo, como mostrado na Figura 4.6B. Pelo contrário, o diabetes é mais frequentemente associado a efeitos adversos no sistema nervoso, como atrofia cerebral, danos aos neurônios e outras alterações prejudiciais na estrutura do cérebro, incluindo o hipocampo. No entanto, o tamanho da varredura usada nesta pesquisa e a interpretação dos resultados devem ser destacados novamente, considerando que estamos examinando estruturas celulares dentro do tecido. Portanto, para elucidar os dados de área apresentados acima, observamos que, em alguns casos, o diabetes pode causar retenção de fluidos e edema cerebral. Isso pode aumentar temporariamente o volume do cérebro, incluindo o hipocampo. O edema cerebral também pode resultar em um aumento local na área de superfície do hipocampo (Arieff and Kleman, 1973). Um estudo de Song e colaboradores (Song *et al.*, 2003) mostrou que o

conteúdo de água cerebral de animais hiperglicêmicos com edema cerebral aumentou em comparação ao grupo normoglicêmico, o que concorda com o caminho proposto aqui. Nesse sentido, Yuen e colaboradores (Yuen *et al.*, 2008) demonstraram em seu estudo que ratos com DMT1 induzido por STZ apresentaram fenótipo semelhante ao dos nossos animais, além de cetoacidose diabética, hipoperfusão cerebral e edema. Dessa forma, é razoável sugerir que nossos animais provavelmente apresentaram os mesmos distúrbios, corroborando o volume de dados apresentados. Novamente, conforme relatado nos resultados da morfologia, foi observada alteração entre os grupos diabético e controle. A hiperglicemia crônica, característica do Diabetes, pode causar danos oxidativos e inflamação no cérebro, afetando a integridade das células neuronais e das estruturas do hipocampo. Esse fato pode contribuir para alterações na área de superfície.

As principais diferenças entre DMT1 e DMT2 em termos de alterações estruturais no hipocampo estão relacionadas à magnitude e aos mecanismos subjacentes dessas alterações. No DMT1, a maior rugosidade, volume e área do hipocampo podem ser atribuídos a respostas compensatórias mais agressivas a episódios repetidos de glicemia anormal. Em contraste, no DMT2, a remodelação hipocampal é menos pronunciada devido à resistência à insulina e à inflamação crônica, resultando em um aumento estrutural menos significativo. Essas diferenças destacam a necessidade de abordagens terapêuticas distintas para proteger a saúde do cérebro em pacientes com DMT1 e DMT2 (Ryan, Geckle and Orchard, 2003).

#### **4.3.4 Resultados nanomecânicos**

Os mapas de adesão característicos de cada grupo são mostrados na Figura 4.7A-C. O estudo da adesão via AFM em tecidos biológicos é altamente relevante para a compreensão de processos celulares e moleculares, como conformação de proteínas e interações proteicas específicas, e para inferir a distribuição de cargas na superfície sob investigação (Nandi and Ainarapu, 2021). Os valores médios da força de adesão, calculados a partir das curvas de retração no AFM são  $6,4 \pm 0,2$  nN,  $5,9 \pm 0,2$  nN e  $5,7 \pm 0,1$  nN para os tecidos controle, DMT1 e DMT2 (Figura 4.7D). Curiosamente, a amostra controle tem um valor médio de adesão maior do que as amostras DMT1 e DMT2, seguindo uma tendência decrescente nos grupos controle, DMT1 e DMT2. Esta sugestão aponta para mudanças na eletronegatividade entre amostras devido a diferenças nos momentos dipolares ou distribuições de carga (Trought and Perrine, 2021), o que pode ser atribuído a mudanças de proteína na ECM observadas no Diabetes.



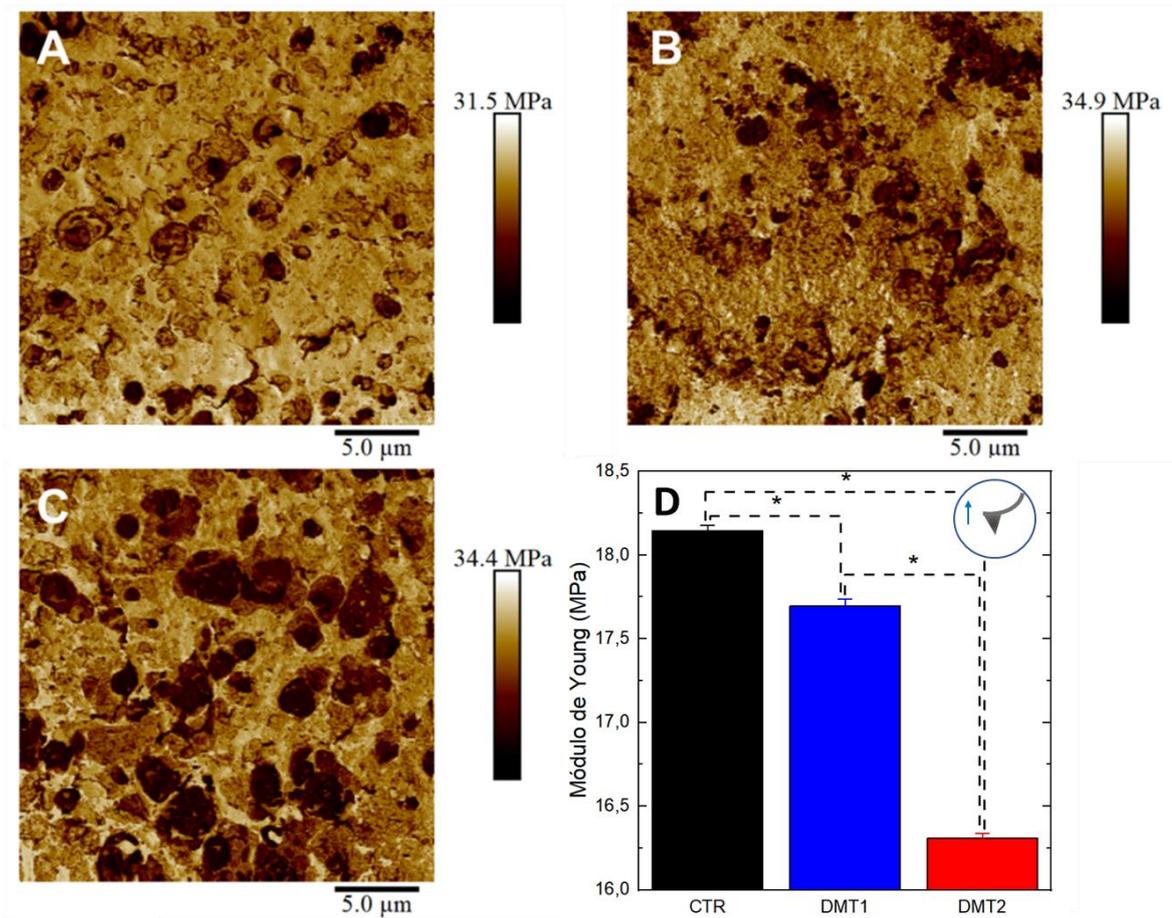
**Figura 4.7: Dados de adesão AFM.** Dados de adesão qualitativos e quantitativos de tecidos do grupo controle e indivíduos DM. (A) Mapa de adesão do controle, (B) T1DM e (C) grupo T2DM. (D) Gráfico de barras das forças de adesão comparando os diferentes grupos. Asteriscos indicam diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .

Em medidas de espectroscopia de força via AFM, forças de adesão podem ser associadas a forças eletrostáticas, de Van der Waals, capilares e forças promovidas pela quebra de ligações químicas (H. J. Butt, Cappella and Kappl, 2005). Em sondas não funcionalizadas (como as que usamos), as forças de adesão são tomadas como interações não específicas, sendo impossível separar a contribuição de cada uma dessas forças. Entretanto, como as sondas usadas aqui para analisar todas as amostras foram feitas do mesmo material e têm as mesmas especificações (modelo, raio da ponta, etc.), assim como os experimentos para todas as amostras foram realizados sob as mesmas condições (temperatura e umidade do ar), diferenças nas forças de adesão entre as amostras podem significar mudanças em suas propriedades físicas resultantes do Diabetes, indicando mudanças na superfície da amostra (Cardoso-Lima *et al.*, 2022). Outra característica marcante das medidas de AFM realizadas no modo QNM (Dias Rates *et al.*, 2024b) é a alta frequência de aquisição da curva de força, permitindo um mapa de alta resolução com 65.536 curvas de força. Essa alta taxa de aquisição de curva pode induzir eletrificação por

atrito do ar nas sondas de AFM. Assim, é consistentemente observado em nossas medições que amostras conhecidas por terem cargas positivas têm interação de adesão mais significativa com a sonda AFM neste modo. O oposto é observado para amostras com carga negativa (Amorim *et al.*, 2022b).

Diferenças na força de adesão observadas no hipocampo com DMT1 e DMT2 em comparação ao hipocampo saudável, quando analisadas via AFM, podem ser atribuídas a várias causas e mecanismos complexos que podem estar relacionados às alterações microestruturais e bioquímicas resultantes do diabetes, como alterações na matriz extracelular (ECM) (Biswas and Chakrabarti, 2019). O diabetes pode levar a alterações na composição e organização da ECM, uma rede complexa de proteínas e glicoproteínas que circundam as células no tecido cerebral. Essas alterações podem afetar a adesão de células e sondas de AFM ao hipocampo diabético. O diabetes está associado ao acúmulo de proteínas anormais, como agregação  $\beta$ -amiloide (Stanciu *et al.*, 2020), que pode afetar as propriedades mecânicas e a adesão das células neurais. Tomadas em conjunto, as alterações na ECM ou o acúmulo de proteínas agregadas podem explicar as alterações de adesão encontradas no hipocampo diabético, embora outros componentes não possam ser excluídos.

Outra característica importante que pode ser analisada via AFM é o módulo de Young (MY), também conhecido como módulo de elasticidade. Um alto valor de MY indica que o material é rígido e não se deforma facilmente sob estresse. Mapas característicos de MY no hipocampo são mostrados na Figura 4.8A-C. Os valores de MY e seus respectivos erros padrão são  $18,5 \pm 0,6$  MPa,  $17,6 \pm 0,5$  MPa e  $16,5 \pm 0,6$  MPa para os tecidos controle, DMT1 e DMT2 (Figura 4.8D). Embora a diferença nas médias entre os grupos pareça visualmente sutil, a análise estatística revelou uma diferença significativa usando o teste de normalidade (Turkey) seguido por ANOVA unidirecional. Este resultado sugere que a variação do grupo foi suficientemente pequena para que a diferença nas médias se tornasse significativa.



**Figura 4.8: Dados do módulo AFM.** Dados qualitativos e quantitativos do módulo de Young (YM) de tecidos do grupo controle e indivíduos DM. (A) Mapa MY do controle, (B) DM T1 e (C) grupo DMT2. (D) Gráfico de barras do MY comparando os diferentes grupos. Asteriscos indicam diferenças significativas no teste ANOVA com Turkey para  $p < 0,05$ .

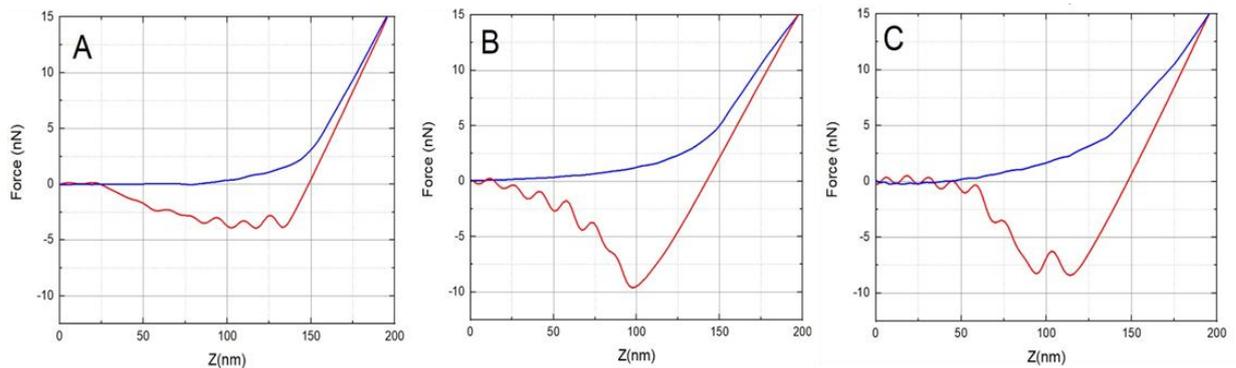
Um valor médio de MY mais alto é observado para tecidos de controle em comparação com tecidos DMT1 e DM T2, como mostrado na Figura 4.8D. Isso pode ser atribuído a alterações microestruturais e biomecânicas devido ao diabetes, como mencionado acima. Isso inclui alterações na deposição de ECM, agregação de proteínas, inflamação e estresse oxidativo. Por exemplo, alterações na ECM podem reduzir a elasticidade do tecido hipocampal diabético, uma vez que a célula tende a se reorganizar diante de alterações causadas pela patologia (Bruce-Keller, Keller and Morrison, 2009). Além desses fatores, o inchaço celular observado pelo aumento do volume do tecido hipocampal também pode estar associado a alterações em MY. No total, tanto o DM T1 quanto o DM T2 alteram profusamente a biofísica do tecido hipocampal, diminuindo o MY e a adesão, enquanto aumentam a rugosidade e o volume - todos os quais parecem estar associados ao declínio cognitivo.

Materiais viscoelásticos exibem respostas variadas a diferentes perturbações. No *PeakForce QNM*, o cantilever oscila em frequências na faixa de kHz, o que induz diferentes comportamentos elásticos em cada frequência (Alencar *et al.*, 2023). É importante notar que as medições de AFM em frequências de varredura mais altas revelam propriedades mais elásticas, levando a valores de módulo elástico mais altos (Rebêlo *et al.*, 2014). À medida que a frequência de indentação aumenta, a resposta do material viscoelástico se torna mais rígida, (Alencar *et al.*, 2023), (Rebêlo *et al.*, 2014), (de Barros *et al.*, 2023). Como o modo QNM adquire curvas de força em frequências em torno de 1 kHz, o tecido parece ter um módulo mais alto, particularmente em mapas de alta resolução (Dias Rates *et al.*, 2024c). Isso deve ser considerado ao interpretar os resultados, pois a viscoelasticidade pode introduzir variabilidade. No entanto, apesar dos valores absolutos mais altos, as diferenças relativas entre os tecidos controle e hiperglicêmico permanecem válidas e refletem com precisão as mudanças mecânicas devido à hiperglicemia, visto que todas as medições foram conduzidas em condições experimentais consistentes.

As curvas força-distância fornecem ainda informações detalhadas sobre as propriedades nanomecânicas dos tecidos, como rigidez e elasticidade, que podem ser afetadas por condições patológicas (Garcia, 2020). Nas curvas apresentadas na Figura 4.9, a linha azul representa a curva de aproximação, que mostra a interação entre a ponta da sonda AFM e a superfície da amostra conforme a sonda se aproxima do tecido. A linha vermelha representa a curva de retração, que reflete o comportamento do tecido quando a sonda é retirada.

A inclinação da curva de aproximação pode fornecer informações sobre a rigidez, calculada como módulo de Young, da superfície da amostra (Song and Bhushan, 2008). Uma inclinação mais íngreme indica uma superfície mais rígida. Os valores do módulo de Young foram extraídos de ajustes nas curvas de força em uma faixa de deflexão. Os resultados representativos para as amostras Controle, DMT1 e DMT2 foram 20,1 MPa, 17,2 MPa e 15,6 MPa, respectivamente.

A partir dos resultados mostrados na Figura 4.9, pode-se observar que as amostras hipocâmpais com DMT1 e DMT2 apresentam alterações na rigidez em comparação ao hipocampo controle, indicando que o tecido patológico é menos resistente à deformação. Isso sugere que o tecido pode se deformar mais facilmente sob pressão ou estresse, como forças aplicadas pela sonda AFM em experimentos nanomecânicos. Em um contexto patológico, como em tecidos hipocâmpais afetados por diabetes ou outras doenças neurodegenerativas, uma diminuição no módulo de Young pode refletir alterações estruturais, como degradação da matriz extracelular, perda de integridade celular ou outras alterações na composição do tecido resultando em maior maleabilidade, conforme mencionado no texto principal.



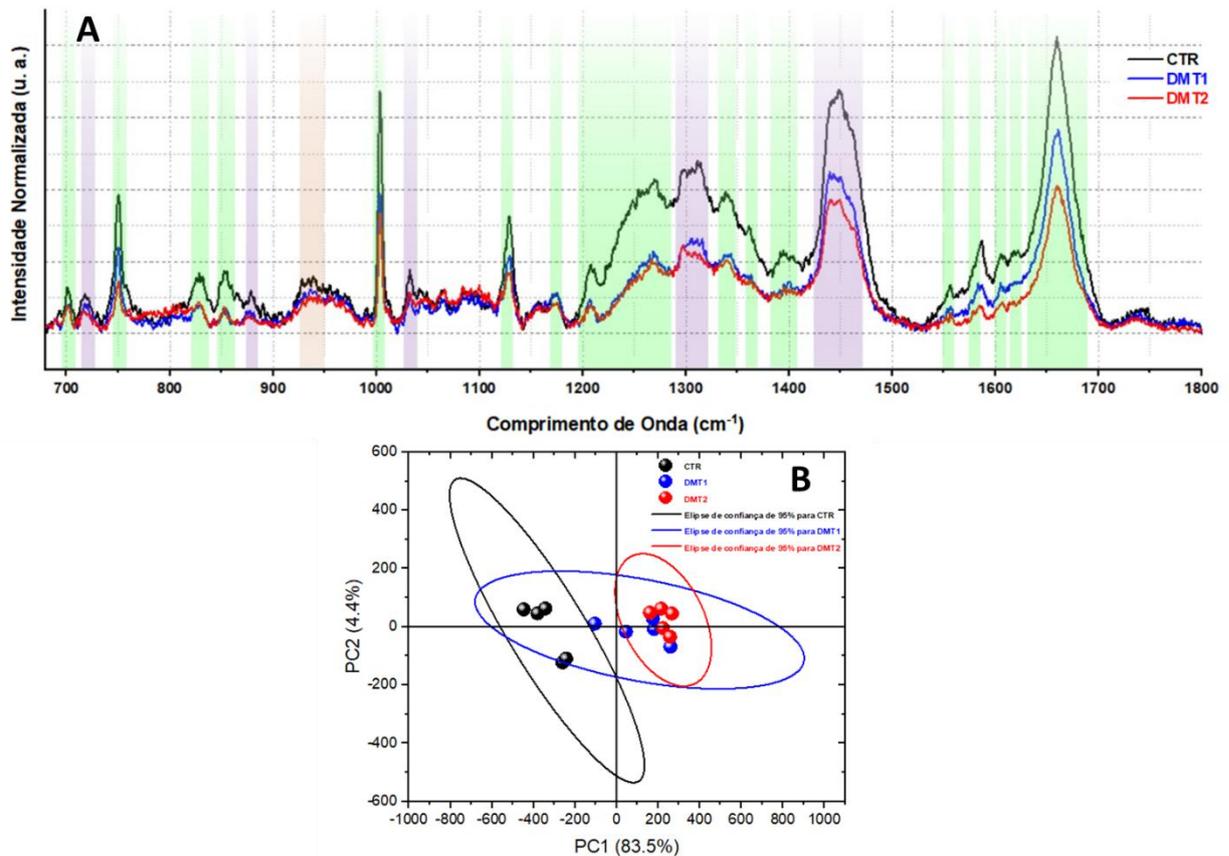
**Figura 4.9:** Exemplos de curvas força-distância obtidas por AFM para amostras hipocampais. A curva azul é a curva de aproximação. A curva vermelha é a curva de retração. A, controle. B, Diabetes Mellitus Tipo 1. C, Diabetes Mellitus Tipo 2.

A curva de retração é crucial para entender a elasticidade e a adesão do tecido (Heath and Scheuring, 2019). Em amostras diabéticas, a curva de retração normalmente mostra desvios maiores do que o hipocampo saudável, sugerindo alterações na recuperação elástica e possíveis alterações nas características de adesão celular que podem estar associadas ao processo degenerativo causado pelo diabetes. Essas curvas destacam as diferenças nos comportamentos mecânicos entre tecidos saudáveis e aqueles afetados pelo diabetes, contribuindo para uma melhor compreensão das alterações microestruturais e suas implicações para a função cognitiva.

#### 4.3.5 Resultados Vibracionais

A Figura 4.10 mostra os espectros médios dos grupos controle, DMT1 e DMT2. É possível identificar modos vibracionais dos componentes bioquímicos fundamentais das estruturas dos tecidos: lipídios e proteínas. Na região espectral de 700 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , podemos notar a presença de modos vibracionais relacionados às proteínas, como o da Prolina (855  $\text{cm}^{-1}$ ), e os da Tirosina (831  $\text{cm}^{-1}$ , 1172  $\text{cm}^{-1}$ , 1609  $\text{cm}^{-1}$ ), Fenilalanina (1004  $\text{cm}^{-1}$  e 1586  $\text{cm}^{-1}$ ) e Triptofano (750  $\text{cm}^{-1}$ , 1339  $\text{cm}^{-1}$ , 1362  $\text{cm}^{-1}$ , 1554  $\text{cm}^{-1}$  e 1619  $\text{cm}^{-1}$ ). A presença das bandas Amida, na faixa entre 1207  $\text{cm}^{-1}$  e 1269  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas à Amida III e o modo em 1659  $\text{cm}^{-1}$ , relacionado à Amida I, que é composta de átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio (CONH), desempenha um papel crucial na formação de proteínas, formando ligações importantes que conferem rigidez estrutural e fornecem informações sobre a organização da estrutura secundária

em filamentos de actina (Bandekar, 1992). Além disso, bandas correspondentes a lipídios foram identificadas nas posições  $718\text{ cm}^{-1}$ ,  $880\text{ cm}^{-1}$ ,  $1032\text{ cm}^{-1}$ ,  $1307\text{ cm}^{-1}$  e  $1449\text{ cm}^{-1}$ . Esses modos refletem a composição, organização e estrutura dos lipídios do tecido.



**Figura 4.10: Identificação molecular.** A. Espectros médios e identificação de modos relacionados ao grupo controle (preto), grupo DM T1 (azul) e grupo DM T2 (vermelho). B. Análise de PCA mostrando a diferenciação entre o grupo controle (preto), grupo DM T1 (azul) e grupo DM T2 (vermelho), com uma variância total de 87,9%

Os comprimentos de onda exatos para cada um dos modos identificados estão listados na Tabela 2, abaixo.

**Tabela 2.** Assinatura de cada pico do espectro Raman (Movasaghi, Rehman and Rehman, 2007; Rygula *et al.*, 2013; Pezzotti, 2021)..

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Aminoácido/proteína	Lipídio/Carboidrato	Outros
700	Metionina		
718		Colina	
750	Triptofano		
831	Tirosina		
855	Prolina/Tirosina		
880		Esfingomiolina	

		Polissacarídeos
940		
1004	Fenilalanina	
1032		CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> lig.
1128	C – N alo.	
1172	Tirosina	
1207 – 1269	Amida III	
1307		CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> tor.
1339	Triptofano	
1362	Triptofano	
1405	CH def.	
1449		C – H vib.
1554	Triptofano	
1586	Fenilalanina	
1609	Tirosina	
1619	Triptofano	
1659	Amida I	

Abreviação: alo. = alongamento, vib = vibração, lig = ligação, tor = torção, def = deformation

Utilizando a Análise de Componentes Principais (PCA) multivariada, foi possível identificar alterações nos modos vibracionais que distinguem claramente entre os grupos controle e hiperglicêmico (DM1 e DM2), conforme mostrado na Figura 4.10. A análise dos espectros por PCA revela uma distinção significativa entre os grupos controle e hiperglicêmico (DM1 e DM2). As principais variações responsáveis por 87,9% da variação na ACP estão relacionadas às intensidades dos modos vibracionais em torno de 1004 cm<sup>-1</sup>, 1207-1269 cm<sup>-1</sup>, 1449 cm<sup>-1</sup> e 1659 cm<sup>-1</sup>. Esses modos associados são componentes lipídicos (1449 cm<sup>-1</sup>), o grupo Amida (1207-1269 cm<sup>-1</sup> e 1659 cm<sup>-1</sup>) e fenilalanina (1004 cm<sup>-1</sup>), de acordo com a Tabela 2, e todos foram diminuídos em amostras de diabetes, sugerindo um desarranjo global da assinatura vibracional do hipocampo desses animais.

Em relação aos resultados vibracionais obtidos pela espectroscopia Raman, na Figura 4.10, observou-se uma diminuição acentuada para vários picos nos tecidos hiperglicêmicos em comparação aos tecidos controle. Os espectros individuais mostram que as alterações mais significativas estão nas bandas amida, colesterol e lipídios. Isso sugere alterações moleculares fundamentais no hipocampo no Diabetes, que estão associadas a alterações em lipídios e proteínas, mostrando novamente as alterações estruturais globais que o tecido apresenta, que podem ser atribuídas a complicações decorrentes da hiperglicemia. Nota-se, portanto, como o Diabetes, uma doença caracterizada por distúrbios metabólicos, pode causar tais alterações ao afetar um tecido que desempenha um papel fundamental na produção de sinapses, memória, aprendizagem e cognição. Esses resultados mostram como a alteração de diferentes substâncias

afeta o funcionamento e a morfologia do hipocampo em condições diabéticas, como corroborado com as descrições a seguir.

A metionina é um aminoácido essencial que desempenha várias funções no corpo, incluindo a síntese de proteínas, a formação de neurotransmissores e a regulação do metabolismo no hipocampo (Kim *et al.*, 2019), pois atua na composição da dopamina e serotonina, conforme mostra Dash e colaboradores (Dash *et al.*, 2016). Ou seja, níveis mais elevados de metionina podem estar associados a uma neurotransmissão mais eficiente. O resultado descrito para a metionina mostra que a menor intensidade deste composto, em  $700\text{ cm}^{-1}$ , nos tecidos hiperglicêmicos pode indicar disfunções celulares advindas da condição de diabetes. Como este aminoácido tem papel importante na ação antioxidante e na neurotransmissão, é plausível correlacionar este resultado com os resultados que vêm sendo destacados até aqui, mostrando que o tecido de hipocampo diabético possui alterações biofísicas que contribuem para processos neurodegenerativos que podem levar à demência, corroborando com a via proposta de estudo proposta neste trabalho.

A colina é um lipídio presente na membrana celular relatado como um precursor da acetilcolina, um neurotransmissor responsável pela memória, aprendizado e humor (Zeisel, 2004). Enzimas pancreáticas produzem colina a partir dos alimentos ingeridos na dieta, sendo distribuídas por todo o corpo humano (Hollenbeck, 2012). Logo, uma complicação que afeta o pâncreas, como a diabetes mellitus, pode desregular a produção de colina, como demonstrados nos dados vibracionais aqui apresentados. Tais argumentações confirmam os dados de alterações de colina em amostras de hipocampo com hiperglicemia estudadas neste trabalho, na banda em  $718\text{ cm}^{-1}$ , com diminuição da intensidade para os tecidos de hipocampo com DMT1 e DMT2, corroborando para as vias propostas aqui de correlação entre hiperglicemia e processos neurodegenerativos.

O triptofano é um aminoácido essencial que desempenha um papel importante no funcionamento do sistema nervoso, servindo como precursor da serotonina, um neurotransmissor que desempenha várias funções no cérebro, incluindo regulação do humor e funções cognitivas (Roth *et al.*, 2021). O triptofano também auxilia a formação da melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal que exerce papel neuroprotetor pela sua capacidade de inibir a apoptose, estresse oxidativo e, até mesmo, da toxicidade da placa beta-amiloide (Baptista *et al.*, 2020). Como o triptofano é precursor da serotonina, ele ajuda na comunicação entre os neurônios no hipocampo, e ao permitir níveis adequados de melatonina, promove um sono de qualidade e permite um efeito antioxidante no organismo (Sudar-Milovanovic *et al.*, 2022). Algumas das alterações clínicas descritas em doenças neurodegenerativas, além do déficit da memória recente e comprometimento de funções executivas, são o comprometimento

psíquico e alterações no comportamento, como ansiedade, depressão, apatia e irritabilidade (Self and Holtzman, 2023). Nesse contexto, a redução da intensidade das bandas do triptofano em  $750\text{cm}^{-1}$ ,  $1339\text{cm}^{-1}$ ,  $1362\text{cm}^{-1}$ ,  $1554\text{cm}^{-1}$  e  $1619\text{cm}^{-1}$  nos hipocampos hiperglicêmicos, podem ser relacionados à processos explicando alguns sintomas presentes na diabetes e que são característicos de demência, como depressão, insônia, ansiedade, irritabilidade.

A fenilalanina é um aminoácido que atua na síntese de proteínas, na produção de neurotransmissores e na regulação do metabolismo no organismo (Pilotto *et al.*, 2021). Este aminoácido é o precursor da tirosina, que por sua vez é o precursor de neurotransmissores como a dopamina (Trepp *et al.*, 2020). Portanto, a fenilalanina influencia a função do hipocampo principalmente por meio de sua conversão em tirosina e subsequente produção de neurotransmissores, que desempenham papéis essenciais na regulação do humor, da motivação e da função cognitiva (Liu *et al.*, 2021), além de possuir propriedades antioxidantes que podem ajudar a proteger o cérebro contra danos causados pelo estresse oxidativo, sendo capaz de neutralizar os radicais livres (Akram *et al.*, 2020). A diminuição da intensidade deste modo, em  $1004\text{cm}^{-1}$ , para os tecidos de hipocampo hiperglicêmico pode mostrar informações importantes acerca das alterações metabólicas advindas da diabetes e que levam a desordem no hipocampo, como deficiência na memória, alteração de humor, ansiedade, depressão e até demência, como vem sendo destacado até aqui.

A tirosina é um aminoácido não essencial que pode ser sintetizado pelo corpo a partir da fenilalanina e atua como precursor de neurotransmissores, incluindo a dopamina (Bloemendaal *et al.*, 2018a). Esses neurotransmissores atuam na regulação do humor, do estresse, da atenção, do foco e de outras funções cerebrais, bem como a cognição e a memória (Bloemendaal *et al.*, 2018b). A baixa disponibilidade de dopamina é frequentemente associada a pacientes com sintomas depressivos (Flux and Lowry, 2020). No resultado vibracional, os modos de tirosina de hipocampo hiperglicêmico, em  $831\text{cm}^{-1}$ ,  $1172\text{cm}^{-1}$  e  $1609\text{cm}^{-1}$ , sofreram alteração em relação ao tecido controle, exibindo diminuição da intensidade da banda. Este resultado aponta novamente para possíveis complicações advindas da diabetes que levam a problemas de declínio cognitivo, como perda de memória e, nesse caso específico, alterações de humor, que são sintomas clínicos comum de pacientes com doenças neurodegenerativas. Este resultado mostra novamente como o estado hiperglicêmico do tecido do hipocampo pode levar a alterações de ordem neurológica.

A prolina é um aminoácido não essencial envolvido na adaptação ao estresse osmótico e de desidratação, controle redox, eliminação de espécies reativas de oxigênio e apoptose (Fichman *et al.*, 2015). No estudo de Xie e colaboradores (Xie *et al.*, 2021), foi observado que a prolina desempenha um papel crucial no desenvolvimento cognitivo saudável, e sua ausência

pode levar à demência, visto que, segundo os autores, no contexto específico do hipocampo a prolina desempenha um papel relevante na regulação da neurotransmissão e no funcionamento cognitivo. Em relação à diabetes, como esta doença está associada a um aumento do estresse oxidativo no cérebro, o que pode levar a danos neuronais e disfunção cognitiva, a prolina, pode desempenhar um papel na proteção contra o estresse oxidativo no cérebro diabético, ajudando a reduzir os danos neuronais (Misiura and Miltyk, 2019). A banda de prolina, em  $855\text{ cm}^{-1}$ , apresenta redução de intensidade para os tecidos de hipocampo hiperglicêmico, o que mostra que a modificação deste componente pode estar associada à exacerbada inflamação cerebral em pessoas com diabetes, assim como presença de espécies reativas de oxigênio.

O segundo maior grupo de lipídios encontrados na membrana são os esfingolipídios, considerados essenciais para a preservação da integridade da membrana, no metabolismo e na transdução de sinais, no crescimento, na diferenciação e na prevenção de apoptose celular (Yang and Chen, 2022). A esfingomielina é um tipo de esfingolipídio encontrado especialmente na bainha de mielina membranosa que envolve alguns axônios de células nervosas ajudando a formar a estrutura das membranas celulares, conferindo-lhes estabilidade e fluidez (Bruhn *et al.*, 2006). No caso de diabetes, especialmente diabetes tipo 2, podem ocorrer alterações na esfingomielina no hipocampo, bem como em outras partes do cérebro (Cermenati *et al.*, 2017a). Observamos a alteração desse lipídio na banda identificada em  $880\text{ cm}^{-1}$ , com diminuição da intensidade para os grupos diabéticos em relação ao grupo controle. Os resultados mostrados neste trabalho indicam que a composição lipídica, incluindo a esfingomielina, pode ser alterada em condições de hiperglicemia e que essas alterações podem estar relacionadas à disfunção neuronal, advindas do estresse oxidativo, por exemplo. Este fato pode levar a alterações no metabolismo lipídico, incluindo a síntese e a manipulação da esfingomielina. Este resultado evidencia mais um ponto em comum entre diabetes e demência, mostrando que alterações na composição ou níveis de lipídios podem estar associadas a várias condições neurológicas, afetando a função cognitiva e a memória.

Os polissacarídeos são macromoléculas compostas por unidades de monossacarídeos ligadas entre si, que desempenham diversas funções em organismos vivos, incluindo o hipocampo, atuando na reserva de energia celular, por exemplo (Cermenati *et al.*, 2017b). Alguns polissacarídeos também podem influenciar a plasticidade sináptica, que é a capacidade do cérebro de remodelar suas conexões em resposta a estímulos (Zhou *et al.*, 2020). A diminuição da intensidade desse composto, em  $940\text{ cm}^{-1}$ , leva novamente à correlação entre alterações ocasionadas pelas condições hiperglicêmicas no funcionamento adequado do hipocampo, o que resulta em modificações de memória, aprendizado e neurodegeneração, como mostrou Dun e colaboradores (Dun *et al.*, 2016), destacando em seu estudo a melhora da

memória em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, associado ao potencial mecanismo de terapias com polissacarídeos.

Como mencionado, a informação acerca das bandas de amida é importante na caracterização de proteínas e na compreensão de como sua estrutura está relacionada com suas funções biológicas (Ji *et al.*, 2020). Observa-se que a intensidade das bandas de amida I e amida III são menores nos espectros médios de tecido DMT1 e DMT2, em relação ao tecido controle. Essa diferença pode indicar mudanças na composição química, estrutura molecular ou concentração desse grupo funcional. Do ponto de vista biofísico, a diminuição da intensidade das bandas de amida nos tecidos patológicos pode evidenciar a menor organização estrutural e, conseqüentemente, menor rigidez do tecido analisado, o que corrobora com os resultados de rugosidade e módulo de Young apresentados anteriormente. Essas alterações no tecido do hipocampo diabético podem levar à danos microestruturais e, por sua vez, estes danos podem ocasionar danos na memória e aprendizado, evidenciando novamente a relação entre hiperglicemia e demência (Wang *et al.*, 2006).

Na espectroscopia Raman, uma alteração na ligação  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  refere-se a uma mudança nas características das vibrações moleculares associadas às ligações químicas entre átomos de carbono e hidrogênio em uma molécula, conforme encontrado na banda em  $1032\text{ cm}^{-1}$ . As ligações  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  se referem às ligações entre átomos de carbono e hidrogênio em grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) e grupos metila ( $\text{CH}_3$ ), respectivamente (Huang *et al.*, 2011). Já a alteração na razão de torção  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  se refere a uma mudança na proporção das bandas de vibração associadas a esses grupos em uma molécula, conforme encontrado na banda em  $1307\text{ cm}^{-1}$ . Os grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  são comuns em muitas moléculas orgânicas, incluindo lipídios, proteínas e carboidratos e a diminuição na intensidade da banda de vibração  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  pode sugerir uma quebra ou alteração na ligação química desses grupos funcionais (Czamara *et al.*, 2015), o que poderia ocorrer devido a processos como oxidação, quebra de ligação ou rearranjos moleculares, que podem estar relacionadas a processos fisiológicos, como inflamação, estresse oxidativo ou envelhecimento celular (Shi, Fung and Zhou, 2021). Diante disto e dos resultados vibracionais apresentados aqui, observa-se que a diminuição dos modos relacionados à ligação e à torção de  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  no tecido diabético mostram que, de fato, ocorrem alterações de caráter lipídico e proteico no hipocampo hiperglicêmico, o que corrobora com todos os resultados que foram descritos anteriormente, mostrando novamente a via de convergência entre alterações metabólicas e mudanças ultraestruturais, que podem ocasionar mudanças nos processos de sinapse, memória e cognição.

Por fim, na espectroscopia Raman, as vibrações de alongamento C-H, identificado neste trabalho em  $1449\text{ cm}^{-1}$ , são significativas devido à prevalência de ligações carbono e hidrogênio

em moléculas orgânicas. Essas vibrações fornecem informações sobre a estrutura molecular do sistema em estudo (Howell *et al.*, 1999). Mudanças na frequência dessas vibrações podem ocorrer devido a variações na estrutura molecular, como diferentes grupos funcionais ou padrões de substituição, como lipídios e proteínas (Larsson and Rand, 1973). A análise de mudanças nas vibrações C-H na espectroscopia Raman pode oferecer informações sobre estrutura molecular, dinâmica e interações, tornando-a uma técnica poderosa em vários campos, como química, ciência de materiais e biologia. Neste âmbito, estudos voltados para essa perspectiva já vêm acontecendo há um certo tempo, com ênfase em outros constituintes de sistemas biológicos, além do estudo de lipídios e proteínas (Aslanian, Négrerie and Chambert, 1986; Litman, Lewis and Levin, 1991). Desta forma, alterações na banda de vibrações C-H observadas nos tecidos diabéticos indicam podem indicar alterações na estrutura e interações moleculares, destacando o impacto direto do Diabetes na função cerebral.

A diminuição dos picos Raman, em geral, nos componentes do tecido hipocampal pode estar relacionada às alterações morfológicas causadas pelo Diabetes. Esses picos representam as propriedades moleculares dos tecidos, incluindo sua composição química e estrutura molecular. Uma diminuição na intensidade desses picos pode indicar alterações na integridade estrutural do tecido cerebral, como redução da densidade celular, perda de conexões neuronais ou mesmo degeneração das células nervosas. No Diabetes, a hiperglicemia pode desencadear estresse oxidativo e inflamação crônica, conhecidos por causar danos aos tecidos, incluindo o hipocampo, conforme destacado nos resultados anteriores. Esse dano pode levar a alterações morfológicas, como atrofia neuronal, perda de neurônios ou alterações na arquitetura celular. Como resultado, a diminuição dos picos Raman pode refletir essas alterações morfológicas, fornecendo informações importantes sobre os efeitos do Diabetes na estrutura e saúde do tecido cerebral.

Os dados apresentados aqui corroboram os dados do AFM. Enquanto a espectroscopia Raman forneceu informações sobre alterações na composição bioquímica, o AFM forneceu dados complementares sobre alterações nas propriedades mecânicas do tecido. Juntas, essas técnicas reforçam a conclusão de que a hiperglicemia induz alterações notáveis na composição e mecânica do tecido, corroborando os achados.

#### 4.4 Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram claros comprometimentos biofísicos e vibracionais no hipocampo de ratos DMT1 e DMT2. Animais diabéticos apresentaram déficits cognitivos associados ao aumento da rugosidade, área e volume e diminuição da adesão e MY. Também encontramos uma redução geral na assinatura vibracional de amostras diabéticas quando comparadas às do tecido controle. Os resultados apresentados neste trabalho são fundamentais para melhor compreensão da relação entre hiperglicemia e comprometimento cognitivo, fornecendo pistas biofísicas do hipocampo ligadas ao declínio cognitivo no Diabetes.

## 5 Conclusões e Perspectivas

Esta tese abordou a aplicação de técnicas biofísicas e vibracionais, especificamente a Microscopia de Força Atômica e a Espectroscopia Raman, na investigação de taupatias e do declínio cognitivo associado ao Diabetes Mellitus. Na primeira parte desta pesquisa, com uma extensa revisão bibliográfica, mostrou-se a utilização do AFM como uma ferramenta que permite uma análise aprofundada das propriedades mecânicas e estruturais das proteínas tau e seus agregados, elucidando os mecanismos patogênicos subjacentes às taupatias. As descobertas obtidas com AFM destacam a rigidez e conformação dos agregados de tau, revelando informações cruciais sobre a estabilidade e a formação desses agregados patológicos. Estes achados não só aprimoram a compreensão dos processos de agregação de tau, mas também abrem caminho para o desenvolvimento de novos biomarcadores e estratégias terapêuticas para o diagnóstico precoce e intervenção nas taupatias.

Na segunda parte, as técnicas de Microscopia de Força Atômica e de Espectroscopia Raman foram empregadas para investigar as alterações ultraestruturais, nanomecânicas e bioquímicas no tecido de hipocampo cerebral decorrentes do diabetes mellitus. O uso do AFM permitiu a observação de alterações na morfologia do tecido do hipocampo, e em propriedades como rigidez e adesão, evidenciando que a hiperglicemia afeta tais propriedades de forma a contribuir para o processo de declínio cognitivo. A técnica de Espectroscopia Raman permitiu a identificação de assinaturas vibracionais específicas associadas às disfunções metabólicas que contribuem para o declínio cognitivo. Os resultados revelam mudanças significativas nas assinaturas moleculares dos tecidos cerebrais hiperglicêmicos, fornecendo novos insights sobre os mecanismos que ligam o diabetes à neurodegeneração. Destaca-se novamente a relevância deste estudo, que empregou uma abordagem inovadora e pioneira no estudo do hipocampo, visando contribuir com uma área ainda pouco compreendida.

De forma geral, os dados de cognição mostraram que os animais que foram induzidos à hiperglicemia apresentaram déficits de memória e aprendizado. O estudo morfológico com mapas de alta resolução revelaram as diferentes ultraestruturas presentes em cada grupo estudado. Os valores de rugosidade, mostraram alterações que foram associadas à remodelação da membrana extracelular, que seria promovida pelas complicações do diabetes, como formação de espécies reativas de oxigênio e citosinas inflamatórias. Os resultados de área e volume para o hipocampo diabético, com valor aumentado em relação ao hipocampo controle, mostraram que se pode associar a presença de edema no tecido promovido pelas alterações, entre outros fatores, nos canais iônicos das células. O estudo da adesão e do módulo de Young,

obtidos através da análise das curvas de força do AFM, mostraram as diferenças promovidas no hipocampo pelo diabetes e foi possível observar como tais alterações pode se relacionar com declínio cognitivo, sendo possível concluir que ocorrem alterações nos componentes de membrana e a diminuição da rigidez tecidual, fatos já descritos para doenças neurodegenerativas e que ficaram evidentes que também estão presentes no tecido de hipocampo hiperglicêmico. Desta forma, os dados ultraestruturais e nanomecânicos reforçam as hipóteses de correlação entre diabetes e declínio cognitivo.

Os resultados vibracionais mostraram que ocorreram diversas alterações moleculares no tecido de hipocampo com diabetes, como os encontrados nas bandas relacionados a proteínas, como o modo da Prolina ( $855\text{cm}^{-1}$ ), Tirosina ( $831\text{cm}^{-1}$ ,  $1172\text{cm}^{-1}$ ,  $1609\text{cm}^{-1}$ ), Fenilalanina ( $1004\text{cm}^{-1}$  e  $1586\text{cm}^{-1}$ ) e Triptofano ( $750\text{cm}^{-1}$ ,  $1339\text{cm}^{-1}$ ,  $1362\text{cm}^{-1}$ ,  $1554\text{cm}^{-1}$  e  $1619\text{cm}^{-1}$ ), bem como a presença das bandas Amida, na faixa entre  $1207\text{ cm}^{-1}$  a  $1269\text{ cm}^{-1}$ , atribuída à amida III e o modo em  $1659\text{ cm}^{-1}$ , relacionado a Amida I, e as bandas atribuídas a lipídios ( $718\text{cm}^{-1}$ ,  $880\text{cm}^{-1}$ ,  $1032\text{ cm}^{-1}$ ,  $1307\text{ cm}^{-1}$  e  $1449\text{ cm}^{-1}$ ). De forma geral, foi descrito o papel de cada lipídio e proteína em funções de sinapse, memória, aprendizado e neuro proteção e foi possível observar que todas as alterações podem ser relacionadas diretamente a processos de declínio cognitivos que seriam consequência direta das alterações metabólicas advindas do diabetes.

As perspectivas para esta linha de pesquisa são promissoras, principalmente no que se refere à integração contínua de técnicas avançadas como AFM e Espectroscopia Raman, que fornecem uma visão ainda mais completa das alterações patológicas em nível molecular e estrutural. Investigações adicionais podem focar na padronização de protocolos experimentais e no desenvolvimento de novos métodos de análise que aumentem a reprodutibilidade e a comparabilidade dos resultados. Além disso, a expansão dos estudos para modelos *in vivo* pode validar e ampliar os achados, aproximando-os da aplicação clínica.

Além disso, também é relevante a exploração de outras técnicas complementares, como a Microscopia de Força Elétrica, para enriquecer a análise biofísica dos tecidos cerebrais. A colaboração interdisciplinar entre pesquisadores de diferentes áreas, incluindo física, química, biologia e medicina, será crucial para maximizar o impacto dessas abordagens e traduzir os achados de pesquisa em benefícios clínicos concretos.

Desta forma, a aplicação de AFM e Espectroscopia Raman na investigação de taupatias e declínio cognitivo associado ao diabetes mostrou-se altamente eficaz e inovadora, proporcionando novas perspectivas para o diagnóstico precoce e o desenvolvimento de terapias mais eficazes. Com o avanço contínuo da tecnologia e da pesquisa interdisciplinar, estas abordagens têm o potencial de transformar significativamente a compreensão e o tratamento das doenças neurodegenerativas e metabólicas.

## APÊNDICES

### A FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### A.1 Conceitos básicos de Microscopia de Força Atômica

Para auxiliar o estudo dos fenômenos de superfícies, diversas metodologias e instrumentos foram desenvolvidos. Entre eles, destacam-se as técnicas de microscopia óptica, que utilizam luz para sondar propriedades específicas. No entanto, essas técnicas enfrentam uma limitação devido ao fenômeno da difração, que impede a análise de propriedades em escalas atômicas e moleculares (Diaspro and Bianchini, 2020). A única forma de contornar essa limitação é através do uso de comprimentos de onda extremamente pequenos, que requerem energias muito altas, potencialmente comprometendo a integridade das amostras biológicas, por exemplo. Os fenômenos físicos que ocorrem nas interfaces dos objetos naturais determinam seu comportamento geral, especialmente em escalas reduzidas, como em sistemas moleculares, atômicos e subatômicos. O conhecimento das propriedades físicas nas interfaces, ou propriedades de superfícies, é tão essencial que uma área inteira da Física é dedicada exclusivamente ao seu estudo: a Física de Superfícies (Ibach, 2006).

O desenvolvimento da teoria quântica da matéria no início do século XX impulsionou grandes avanços nas metodologias microscópicas. Um exemplo notável é o uso de ondas de partículas, como feixes de elétrons, nêutrons e íons, em vez de ondas de luz para o mapeamento de pequenas superfícies. Entre essas técnicas destacam-se a Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) (Crewe, 1974), criada na Universidade Técnica de Berlim em 1931, e a Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). Aproximadamente 50 anos depois, foram desenvolvidas técnicas mais avançadas que não utilizavam ondas de partículas para sondar materiais, mas sim forças atômicas e/ou correntes de tunelamento de elétrons entre moléculas ou átomos. A Microscopia de Varredura por Sonda (SPM) compreende um grupo de instrumentos que geram imagens varrendo a superfície da amostra com uma sonda. Esses instrumentos incluem sondas, cerâmicas piezoelétricas (escâneres) para posicionar e varrer a amostra, circuitos elétricos de realimentação para controlar a posição vertical e horizontal da sonda, e um computador que movimenta os escâneres de varredura, armazena dados e os converte em imagens por meio de um software específico (Sarid, 1994b)

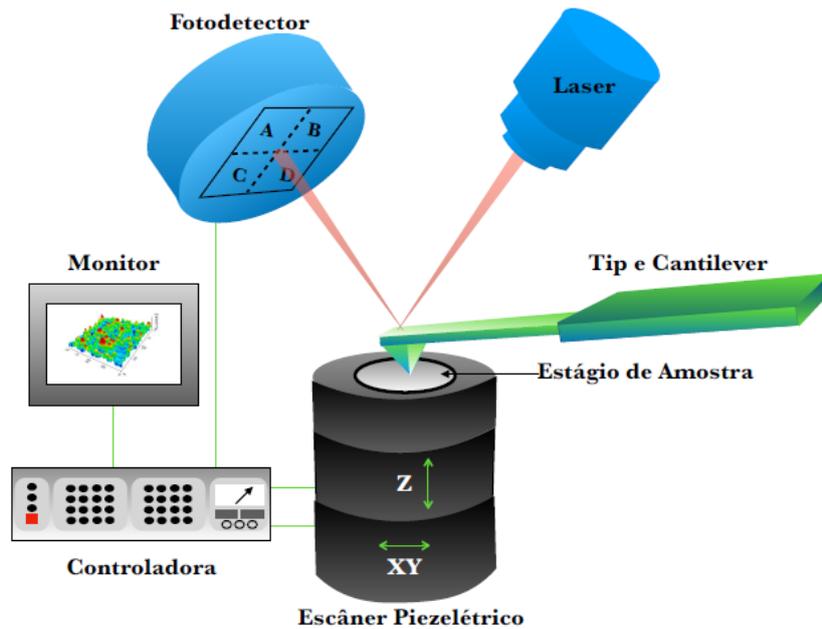
Da classe das microscopias de varredura por sonda, a Microscopia de Tunelamento Quântico– STM (*Scanning Tunneling Microscope*) foi a precursora, desenvolvida, em 1981,

por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, o qual rendeu aos dois o Prêmio Nobel de Física de 1986 (Binnig and Rohrer, 1983), tendo como princípio de funcionamento o efeito túnel. De acordo com a Mecânica Quântica, o efeito túnel surge como consequência da natureza ondulatória do elétron. Classicamente, para uma partícula transpor uma barreira de potencial, é necessário que ela tenha um mínimo de energia cinética, não sendo possível a transposição para energias com valor abaixo deste mínimo. A partir de uma perspectiva quântica, uma partícula tem uma probabilidade não nula de atravessar uma região classicamente proibida (barreira de potencial) que separa duas regiões classicamente permitidas, fenômeno comumente denominado de tunelamento quântico.

A técnica de Microscopia de Força Atômica faz parte das metodologias de varredura por sonda e foi derivada diretamente do STM. O AFM foi desenvolvido, em 1986, por Binnig e colaboradores (Binnig, Quate and Gerber, 1986b). Esta metodologia, de forma geral, tem como princípio fundamental a medida das forças intermoleculares ou interatômicas entre uma ponta muito fina (sonda) e a amostra e, posteriormente, sua transformação em uma imagem que revele as características topográficas da superfície. Com o AFM, tornou-se possível estudar todos os tipos de materiais, já que ele não utiliza corrente de tunelamento, mas sim forças.

Os principais componentes do AFM são: sonda (cantiléver+ponta); escâner piezoelétrico; laser diodo; fotodetector e computador para controle do sistema, armazenamento dos dados produzidos pelo fotodetector e conversão desses dados em mapas topográficos tridimensionais, dos quais se podem obter propriedades mecânicas, elétricas e magnéticas. A figura A.1 mostra os componentes do AFM e sua disposição no equipamento.

Inicialmente, uma ponta de prova (sonda) é colocada nas proximidades da superfície da amostra. Quando a distância é pequena o suficiente para que dipolos elétricos sejam induzidos ou para que dipolos já existentes interajam, forças elétricas atrativas entre os átomos da sonda e da amostra (forças de van der Waals) se manifestam (Bhushan, Fuchs and Hosaka, 2014). A atração aumenta até atingir um limite máximo, o que ocorre quando a sonda se aproxima muito da amostra. A partir de uma determinada distância, uma força repulsiva proveniente da superposição eletrônica dos átomos da sonda-amostra passa a atuar, evitando a superposição espacial dos átomos destas superfícies. A repulsão é consequência do Princípio de Exclusão de Pauli, fenômeno físico que impede que dois elétrons possam ocupar o mesmo estado quântico simultaneamente.



**Figura A.1: Esquema de funcionamento de um Microscópio de Força Atômica e seus componentes.**

Fonte: Imagem cedida pela Prof<sup>a</sup>. Luciana Alencar.

Por meio do método de detecção óptica, medem-se as reflexões de um laser em diferentes direções a partir de superfície refletora na extremidade livre no dorso do cantiléver. A ponta é fixa na parte inferior do cantiléver, no lado oposto da superfície refletora. Sob ação de forças atrativas e repulsivas, o cantiléver se deforma, alterando o ângulo da superfície espelhada e, conseqüentemente, o ângulo de reflexão do laser. Um detector de quatro fotocélulas independentes capta a luz do laser, produzindo uma diferença de potencial (DDP), via efeito fotovoltaico. Por fim, um computador produz uma imagem cujos detalhes são proporcionais à intensidade da relativa entre as quatro fotocélulas.

O AFM opera medindo as forças entre o par sonda-amostra. Essas forças dependem da natureza desse par, da distância entre eles, da geometria da ponta e de qualquer contaminação que houver sobre a superfície da amostra. Durante o processo de varredura, os átomos localizados na extremidade da ponta interagem com os da superfície da amostra, que estão imediatamente abaixo dela ou nas vizinhanças (Bhushan and Marti, 2017). Na próxima seção, detalharemos mais sobre essas forças.

### A.1.1 Forças em nanoescala

Quando dois objetos se aproximam, surgem forças de diferentes ordens de magnitude e dependências com a distância. Algumas dessas forças, como as magnéticas e eletrostáticas, podem ser controladas por campos externos ou pela aplicação de voltagem. Isso possibilita a medição de diversas propriedades físicas da amostra com alta resolução espacial, sendo a imagem da topografia apenas uma das opções. Nesta seção, serão discutidas as forças relevantes para a microscopia de força atômica. A análise dessas forças incluirá a origem física de cada uma, assim como os aspectos matemáticos de forma simplificada.

#### A.1.1.1 Forças de Van der Waals

A natureza das forças de Van der Waals é elétrica, decorrente da polarização de moléculas que ocorre através de campos elétricos associados a vizinhos ou dipolos permanentes (Dzyaloshinskii *et al.*, 1992). Essas forças são uma combinação de três forças: (i) Forças de orientação, (ii) Forças indutoras e (iii) Forças dispersivas (H.-J. Butt, Cappella and Kappl, 2005). A interação de van der Waals descreve a interação eletromagnética de dipolos induzidos nas superfícies (como exemplo, na extremidade da ponta e superfície da amostra, no caso do AFM) e manifestam uma dependência com  $r^{-6}$ . Em razão das flutuações inerentes ao ambiente quântico, mesmo em um orbital eletrônico totalmente ocupado, existe um deslocamento entre as cargas positivas e negativas, de modo a criar um dipolo elétrico dentro de uma escala de tempo mensurável. Esses dipolos apresentam valores médios nulos sob uma inspeção em tempos suficientemente longos. No entanto, momentos de dipolos induzidos analisados em escalas de tempo menores podem polarizar átomos vizinhos. Este mecanismo leva a um potencial de interação atrativo.

As forças de orientação, também conhecidas como forças de Keesom, são um tipo específico de interação intermolecular que se enquadra dentro das forças de van der Waals (Park and Seo, 2011a). Essas forças ocorrem entre moléculas polares, ou seja, aquelas que possuem dipolos permanentes. Quando duas moléculas polares se aproximam, seus dipolos interagem de modo que as extremidades de carga oposta se atraem, alinhando-se de maneira a minimizar a energia potencial do sistema.

Essas interações de orientação são dependentes da orientação relativa das moléculas e da distância entre elas. A energia dessas forças é proporcional ao produto dos momentos

dipolares das moléculas e inversamente proporcional à sexta potência da distância entre os centros das moléculas. Em termos matemáticos, a energia potencial ( $V$ ) das forças de Keesom pode ser descrita pela seguinte expressão:

$$V \propto -\frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{r^6} \quad (1)$$

onde  $\mu_1$  e  $\mu_2$  são os momentos dipolares das moléculas e  $r$  é a distância entre os centros dos dipolos.

As forças de Keesom são mais fortes que as forças de dispersão de London (que ocorrem entre moléculas não polares), mas são mais fracas que as ligações de hidrogênio (Brown, 2018). Elas desempenham um papel crucial em diversas propriedades físicas dos líquidos e sólidos moleculares, como pontos de ebulição e fusão, solubilidade, e comportamento de fase.

A relevância dessas interações intermoleculares é amplamente discutida na literatura científica. Atkins e de Paula (Atkins, Paula and Keeler, 2022) explicam que as forças de Keesom são uma parte integral das forças de van der Waals, que abrangem todas as interações intermoleculares não covalentes. Israelachvili (Israelachvili, 2011) detalha a importância dessas forças em sistemas biológicos e materiais, destacando como influenciam a coesão e a estabilidade das estruturas moleculares. McQuarrie e Simon (McQuarrie and Simon, 1997) fornecem uma abordagem mais profunda da física por trás dessas forças, descrevendo suas implicações em termos de termodinâmica e dinâmica molecular. Além disso, o trabalho seminal de Johannes Diderik van der Waals (Waals, 1988) estabeleceu a base para a compreensão dessas forças intermoleculares, e Keesom expandiu esse conhecimento ao detalhar as interações específicas entre dipolos permanentes.

As forças indutoras, também conhecidas como forças de Debye, são um tipo de interação intermolecular que fazem parte das forças de van der Waals (Park and Seo, 2011b). Essas forças ocorrem entre uma molécula polar (com dipolo permanente) e uma molécula apolar (sem dipolo permanente). A molécula polar pode induzir um dipolo momentâneo na molécula apolar, resultando em uma atração entre as duas.

A força indutora é proporcionada pela interação entre o dipolo permanente da molécula polar e o dipolo induzido da molécula apolar. A energia dessas forças é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre as moléculas, de forma semelhante às forças de orientação (Keesom) e às forças de dispersão de London. A expressão matemática para a energia potencial ( $V$ ) das forças de Debye é (Margenau, 1939):

$$V \propto -\frac{\mu^2 \alpha}{r^6} \quad (2)$$

onde  $\mu$  é o momento dipolar da molécula polar,  $\alpha$  é a polarizabilidade da molécula apolar, e  $r$  é a distância entre as moléculas.

Essas forças são importantes para explicar várias propriedades físicas dos materiais, como a solubilidade e os pontos de ebulição. As forças de Debye são geralmente mais fracas que as forças de Keesom e as ligações de hidrogênio, mas ainda assim desempenham um papel crucial na estabilidade e comportamento de muitas substâncias.

Atkins e de Paula (Atkins, Paula and Keeler, 2022) explicam que as forças de Debye são um componente essencial das forças de van der Waals, que abrangem todas as interações intermoleculares não covalentes. Israelachvili (Israelachvili, 2011) destaca a relevância dessas forças em sistemas biológicos e materiais, mostrando como elas influenciam a interação entre moléculas polares e apolares. McQuarrie e Simon (McQuarrie and Simon, 1997) fornecem uma análise detalhada das forças indutoras, descrevendo sua importância em termos de dinâmica molecular e propriedades termodinâmicas.

As forças dispersivas, também conhecidas como forças de London, são outro tipo específico de interação intermolecular que faz parte das forças de van der Waals (Margenau, 1939). Estas forças ocorrem entre todas as moléculas, sejam elas polares ou apolares, e são resultado de flutuações temporárias na distribuição eletrônica que criam dipolos instantâneos e induzem dipolos em moléculas vizinhas.

As forças de London são as mais fracas das três categorias de forças de van der Waals (as outras duas sendo as forças de Keesom e as forças de Debye), mas são universalmente presentes (Parsegian, 2005). A energia dessas interações é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre as moléculas, expressa matematicamente como:

$$V \propto -\frac{\alpha_1 \alpha_2}{r^6} \quad (3)$$

onde  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são as polarizabilidades das duas moléculas e  $r$  é a distância entre elas.

Essas forças são responsáveis por muitas propriedades físicas das substâncias, especialmente na fase líquida e sólida. Por exemplo, as forças de London são cruciais para explicar a condensação de gases nobres e a coesão de moléculas apolares (Parsegian, 2005).

A relevância das forças de dispersão de London é amplamente documentada na literatura científica. Atkins e de Paula (Atkins, Paula and Keeler, 2022), por exemplo, descrevem essas forças como essenciais para a coesão de moléculas apolares e para a existência de gases nobres em estado líquido. Israelachvili (Israelachvili, 2011) discute a importância das forças de London na estabilidade de colóides e na adesão de materiais. McQuarrie e Simon (McQuarrie and

Simon, 1997) fornecem uma explicação detalhada sobre como essas forças surgem de flutuações quânticas e como afetam as propriedades termodinâmicas dos materiais.

Fritz London, em 1930, foi o primeiro a teorizar sobre estas forças, explicando que elas resultam de correlações instantâneas nos movimentos dos elétrons em átomos ou moléculas adjacentes (London, 1930). Este trabalho formou a base para a compreensão moderna das interações intermoleculares em sistemas químicos e biológicos.

### A.1.1.2 Forças de Adesão

A partir das medidas de AFM, é possível obter as forças de adesão entre a sonda e a amostra; para tanto, é preciso se aprofundar sobre a mecânica de contato, descrevendo o contato entre uma ponta de AFM que indenta a superfície da uma amostra. Uma vez que o cantiléver funciona como uma mola, a força aplicada por ele obedece à lei de Hooke (Dzedzickis *et al.*, 2023b):

$$F = k \cdot d \quad (4),$$

onde  $k$  é a constante elástica do cantiléver e  $d$  é a sua deflexão. (2.9) A lei de Hooke é aplicada de forma satisfatória para amostras que apresentam comportamento linear, ou seja, superfícies rígidas. No entanto, para amostras que apresentam comportamento viscoelástico, a força não é descrita adequadamente com esta equação. Superfícies “macias” (como as observadas na maioria dos materiais biológicos) se deformam de maneira não linear durante a indentação. Assim, este tipo de sistema passa a ser melhor descrito por uma relação do tipo (Radmacher, 2002):

$$F \propto \delta^n \quad (5),$$

onde  $F$  é em força externa,  $\delta$  é a deformação do sistema e  $n$  é um expoente relacionado à geometria do indentador. A constante de proporcionalidade descreve, além de fatores geométricos, as propriedades elásticas do material. Trata-se, portanto, de um problema de contato mecânico entre duas superfícies.

O primeiro trabalho a abordar o problema do contato entre duas superfícies foi o de Heinrich Hertz (Hertz, 1882), pesquisador pioneiro do campo da mecânica de contato. Uma relação por ele determinada foi o contato entre uma superfície plana e uma esfera, pressionadas entre si, com uma carga normal  $P$ . Esse contato ocorria dentro de uma área circular, com raio de contato  $a$ , de acordo com a seguinte equação:

$$a = \left( \frac{PR}{K} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (6)$$

onde  $R$  é o raio da esfera e  $K$  é uma constante que relaciona os módulos de Young da esfera e da superfície ( $E_1, E_2$ ), considerando a razão de Poisson da esfera e da superfície ( $\nu_1, \nu_2$ ), respectivamente. O parâmetro  $K$  é descrito por:

$$K = \frac{4}{3} \left( \frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \right) \quad (7).$$

Na literatura, o modelo de Hertz tem sido amplamente utilizado no estudo das propriedades mecânicas de superfícies macias, como, por exemplo, as células humanas (Alencar, 2010; Kontomaris, Malamou and Stylianou, 2022; Mendová *et al.*, 2024), tendo como base ensaios de força como AFM. Essa teoria descreve a área de contatos macroscópicos suaves, sendo aplicada somente em materiais elásticos, lineares, homogêneos, isotrópicos e que não apresentam forças de superfície atrativas (adesão). A teoria de Hertz também presume que o raio de contato é muito menor que o raio da esfera, de modo que a esfera pode ser aproximada como um parabolóide (Johnson, 1987).

Os pesquisadores Johnson, Kendall e Roberts propuseram, em, 1971, uma nova teoria, denominada JKR (Johnson, Kendall and Roberts, 1971), que explicava a adesão entre dois corpos elásticos. O modelo JKR considera experimentos cujas áreas de contato são maiores do que as previstas pela teoria de Hertz. A equação abaixo descreve o raio de contato entre uma esfera e uma superfície, considerando a ação da força de adesão entre elas:

$$a = \left( \frac{R}{K} \left( P + 3\gamma\pi R + \sqrt{6\gamma\pi R P + (3\gamma\pi R)^2} \right) \right)^{\frac{1}{3}} \quad (8),$$

onde  $\gamma$  é o trabalho das forças de adesão, realizado em separar completamente o indentador da superfície. Essa teoria inclui a tensão de tração na área de contato, com carga normal mínima e com uma área de contato diferente de zero. Essa carga mínima pode ser chamada de força de *pull-off* ou força de adesão, dada por:

$$F_{ad}^{(JKR)} = -\frac{3}{2}\pi\gamma R \quad (9).$$

Derjaguin, Muller e Toporov (Derjaguin, Muller and Toporov, 1975b) elaboraram um modelo, chamado de DMT, que considerava a contribuição das forças adesivas no contato entre corpos elásticos. Para o mencionado modelo, considera-se que o perfil de contato permanece o mesmo da teoria de Hertz; no entanto, considera-se uma carga total maior devido à força de adesão. Esse fato equivale à interações atrativas entre uma esfera e a superfície. Para esse modelo, o raio de contato  $a$  é dado por:

$$a = \left( \frac{R}{K} (P + 2\gamma\pi R) \right)^{\frac{1}{3}} \quad (10)$$

Assim, a força de adesão é descrita por:

$$F_{ad}^{(DMT)} = -2\pi\gamma R \quad (11).$$

Quando as forças de superfície são de curto alcance em comparação com as deformações elásticas resultantes, o modelo JKR descreve a área de contato com precisão. Para o limite oposto (isto é, materiais rígidos, pequenos raios esféricos e forças de adesão fracas e de longo alcance), o modelo DMT é mais adequado (Lima *et al.*, 2019).

No processo de retração da ponta para longe da superfície da amostra, a ponta permanece em contato com a superfície até que a força do cantiléver supere a interação entre o par ponta-amostra. A força sentida pelo cantiléver é medida através da sua deflexão e a força de *pull-off* ou adesão é definida como a força máxima de atração durante a retração da ponta saindo do contato com a superfície. De forma geral, as forças de adesão  $F_{ad}$  são uma combinação de forças eletrostáticas  $F_{el}$ , forças de van der Waals  $F_{vdW}$ , forças de capilaridade  $F_{cap}$  e forças devido a ligações químicas  $F_{quim}$ , de acordo com a equação (H.-J. Butt, Cappella and Kappl, 2005):

$$F_{ad} = F_{el} + F_{vdW} + F_{cap} + F_{quim} \quad (12).$$

É importante explicar sobre a contribuição das forças de ligação químicas ( $F_{quim}$ ) para as forças de adesão. Dependendo dos grupos químicos presentes na extremidade da ponta e na superfície do substrato, ligações químicas podem se formar durante o contato ou outras interações químicas específicas (por exemplo, receptor ligante) podem ocorrer e, em seguida, muitas vezes, dominam a força adesão resultante. Esse tipo de interação ocorre em pontas funcionalizadas com grupamentos químicos específicos (H.-J. Butt, Cappella and Kappl, 2005).

### A.1.1.3 Forças Capilares

Os experimentos de SPM em ar também devem considerar o papel que a umidade atmosférica desempenha na interação ponta-superfície. A presença de camadas de líquido na ponta ou superfície pode introduzir algum comportamento descontínuo em sua interação (Cao *et al.*, 2021). Além de reduzir a intensidade de todas as outras interações por um fator  $k$  (constante dielétrica), as camadas de líquido formarão meniscos entre as superfícies e surgirão forças capilares. Embora tenha um nome diferente, a origem das forças de capilaridade é a atração de van der Waals entre as moléculas do líquido e os átomos do sólido, que neste contexto são denominadas de forças de adesão. Essa camada será então comprimida até o contato máximo entre a ponta e a superfície. O movimento adicional da ponta vai pressionar o menisco até que se rompa, com o ponto de ruptura determinado pela espessura da camada original.

As forças capilares podem ser mais fortes do que outros efeitos, como forças de ligações eletrostáticas ou químicas, além das forças de Van der Waals, com as quais podem ser comparáveis em escala nano (Harrison, Corti and Beaudoin, 2015). Se a espessura da camada de líquido for irrelevante, os efeitos serão mais sutis. Para um sistema de superfície e ponta considerado seco, por exemplo, em vácuo ou em vapor de nitrogênio, a força de adesão será devida principalmente às forças de dispersão, de acordo com a equação:

$$F_{ad} = 4\pi R\gamma_s \quad (13),$$

em que  $\gamma_s$  é a energia superficial dos sólidos. Se algum vapor for introduzido, a energia da superfície será modificada por adsorção e em alguma pressão de vapor relativa ocorrerá condensação capilar. A força entre a ponta e a superfície é então dada por (Harrison, Corti and Beaudoin, 2015):

$$F_{ad} = 4\pi R\gamma_{lv} \cos\theta + 4\pi R\gamma_{sl} \quad (14)$$

em que  $s$ ,  $l$  e  $v$  denotam sólido, líquido, vapor.  $\gamma_{lv}$  é a tensão superficial do líquido-vapor,  $\theta$  é o ângulo de contato do líquido e  $\gamma_{sl}$  é a tensão interfacial sólido-líquido. O primeiro termo é devido à pressão capilar na parte líquida e o segundo termo está associado à interação sólido-sólido.

### A.1.1.4 Potencial de Lenard-Jones

De forma geral, as principais forças que envolvem a interação entre dois átomos surgem (Lenhard, Stephan and Hasse, 2024):

1. das forças de polarização, nas quais as cargas em um átomo induzem dipolos nos átomos vizinhos;
2. Das forças provenientes de efeitos quânticos, que dão origem a ligações covalentes e forças repulsivas devido à simetria de troca entre as partículas.

Essa última advém do Princípio de Exclusão de Pauli, que proíbe que elétrons de diferentes átomos possam ter os mesmos números quânticos. Como consequência deste tipo de interação, os elétrons migram para níveis de maior energia, o que pode ser interpretado como uma força de repulsão entre eles. Experimentalmente, observa-se que tais forças repulsivas caem a zero para distâncias superiores a  $3\text{Å}$ , enquanto, para distâncias maiores, as componentes atrativas predominam.

O potencial de Lennard-Jones é um modelo empírico que combina as forças atrativa e repulsiva. Na literatura, ele é descrito de várias maneiras diferentes, sendo uma das mais usadas a seguinte (Schwerdtfeger and Wales, 2024):

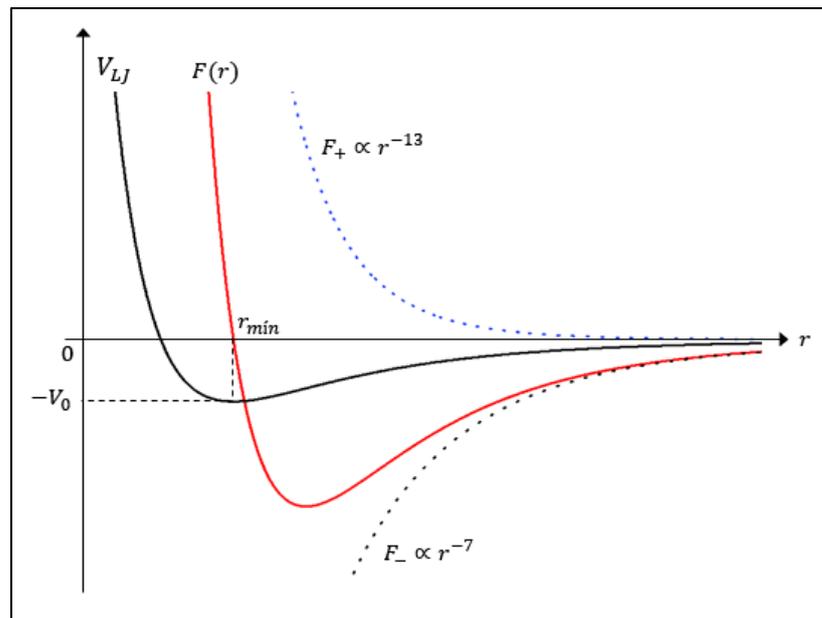
$$V_{LJ}(r) = V_0 \left[ \left( \frac{r_{min}}{r} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{min}}{r} \right)^6 \right] \quad (15),$$

sendo  $r_{min}$  a distância na qual o potencial assume o menor valor possível, no caso  $-V_0$ . Este é o resultado individual mais importante quando se trata da análise de AFM de um material, pois todas as interações estão contempladas nele. A força associada a este potencial pode ser escrita na forma:

$$F(r) = 12V_0 \left[ \frac{r_{min}^{12}}{r^{13}} - \frac{r_{min}^6}{r^7} \right] \quad (16)$$

Quando a distância sonda-amostra atinge o valor  $r_{min}$  as duas forças atingem a mesma intensidade e o sistema entra em equilíbrio, caso não haja força externa sobre ele (Schwerdtfeger and Wales, 2024). Em busca da posição de equilíbrio das forças, a sonda montada sob um *cantilever* flexível se aproxima ou se afasta da superfície da amostra à medida que se move sobre ela. A essência do AFM está exatamente em monitorar essas distâncias  $r_{min}$  localmente sobre a amostra, a partir das quais se pode obter informações acerca das forças. Com as informações do perfil das forças encontram-se as propriedades desejadas da amostra em estudo.

A Figura A.2 ilustra o perfil espacial das forças de atração ( $F_- \propto r^{-7}$ ) e repulsão ( $F_+ \propto r^{-13}$ ), assim como da força total  $F(r)$  e do potencial de Lennard-Jones  $V_{LJ}$ . A dependência espacial de  $F_-$  é obtida a partir do conhecimento do arranjo das cargas elétricas, enquanto a dependência de  $F_+$  é usada empiricamente para obter o melhor ajuste para a curva de força. Por se tratar de um fenômeno puramente quântico originado na interação de troca, não há como prever teoricamente a dependência de  $F_+$  por princípios físicos gerais. Para distâncias acima de  $r_{min}$  a força atrativa predomina, enquanto para valores abaixo de  $r_{min}$  a força repulsiva domina.

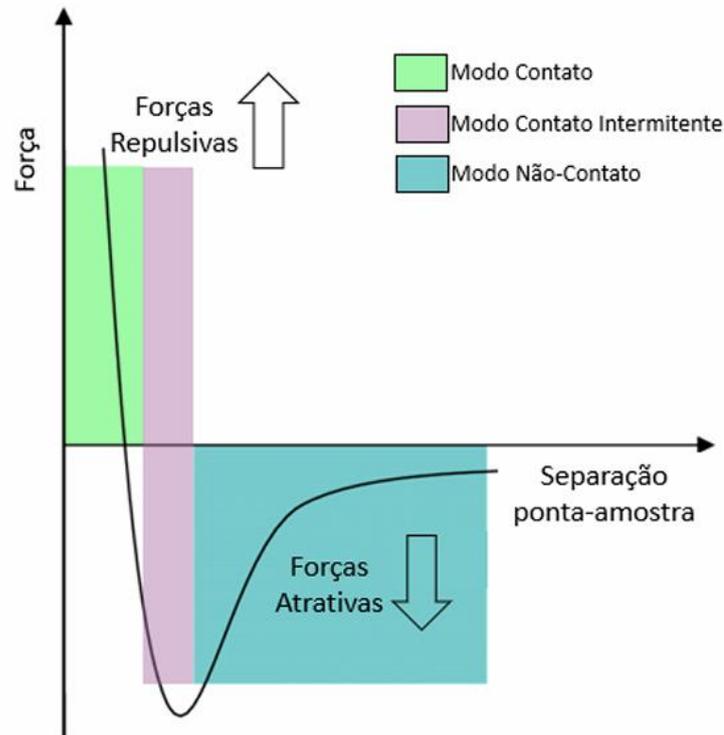


**Figura A.2:** Descrição qualitativa para o potencial de Lennard-Jones  $V(r)$  e para as forças atrativas de van der Waals e repulsivas de origem quântica.

Fonte: Própria Autora.

### A.1.2 Modos de operação do AFM

Como as interações entre a sonda de AFM e a superfície da amostra podem ter natureza repulsiva ou atrativa, o AFM pode operar em diferentes modos, cada um atuando em uma região do seu potencial de interação (Figura A.3). Os modos de operação (ou varredura) mais comuns no AFM são: modo contato, modo não-contato, contato intermitente (*tapping-mode*) e espectroscopia de força (Kiracofe, Raman and Yablon, 2013).



**Figura A.3:** Potencial de interação entre sonda-amostra e suas respectivas regiões nas quais os modos de operação do AFM atuam.

Fonte: Própria Autora.

No modo contato (indicado para amostras mais rígidas), a varredura é feita sempre com a ponta em contato físico com a superfície da amostra; portanto, nesse regime, as forças resultantes são predominantemente repulsivas, causando deflexão positiva no cantiléver, que aplica uma força sobre a amostra (Fujimoto and Oshima, 2008). À medida que a ponta percorre a amostra, o cantiléver se deflexiona, medindo as alterações de topografia da superfície por meio da alteração do sinal do laser (posicionado no dorso da extremidade livre do cantiléver) no fotodetector. Para que a ponta não danifique a amostra, é necessário que o cantiléver tenha uma constante de mola menor que a constante de mola da amostra, a fim de se deflexionar sem a deformar.

No modo de contato intermitente (*tapping mode*), o cantiléver oscila em uma frequência próxima da sua frequência de ressonância, enquanto varre a amostra (Kocun *et al.*, 2017). A sonda é aproximada até que começa a realizar contato intermitente com a amostra (realizando pequenas batidas), eliminando as forças de arraste laterais da sonda com a amostra, permitindo a varredura em amostras macias e com pouca adesão ao substrato. A amplitude de oscilação da sonda durante a varredura é suficiente para que o cantiléver tenha força restauradora que impede

que a sonda fique presa na camada de contaminação devido a forças de menisco ou eletrostáticas que estão presentes na superfície da amostra, especialmente em medidas feitas em ar (Alencar, 2007).

No modo de não contato, a sonda não toca a superfície da amostra. Na microscopia de contato, as forças interatômicas de curto alcance são estudadas medindo as deflexões quase estáticas do cantiléver, que possui uma constante de mola conhecida (Yang *et al.*, 2007). Apesar de as forças de van der Waals de longo alcance estarem também presentes no modo de contato, elas não contribuem para obtenção da imagem em escala atômica. Aumentando a separação entre a sonda (aproximadamente 100 nm), somente contribuirão para a deflexão do cantiléver as forças de interação de longo alcance, como forças eletrostáticas e forças dipolares magnéticas.

O método de detecção das forças de interação no modo de operação de não-contato é diferente do contato. Assim como no modo de contato intermitente, o cantiléver vibra perto de sua frequência de ressonância (por meio de um piezelétrico posicionado do suporte da sonda), porém, ao invés de medir suas deflexões quase estáticas, medem-se as variações na frequência de ressonância que resultam da interação das forças entre a ponteira e a amostra.

### **A.1.3 Espectroscopia de Força**

Diversas informações podem ser obtidas analisando a interação entre a sonda e a amostra em diferentes distâncias. Esse tipo de análise, que explora a relação entre força e distância, é conhecido como espectroscopia de força (Hugel and Seitz, 2001). As curvas de força-distância  $F(z)$  obtidas através de uma medida de espectroscopia de força por AFM nos mostram o comportamento da interação ponta-amostra. A Figura 3.2 apresentou um gráfico de curva de força mostrando o movimento relativo da sonda de AFM para cada ponto desta curva, como mencionando na primeira parte do texto.

Enquanto a sonda desce para a amostra, a distância sonda-amostra diminui. O ciclo de aproximação e retração exibe uma histerese entre as curvas, uma consequência da resposta viscoelástica do material. O ajuste dessas curvas em um dado intervalo de deflexão (em verde), com modelo de Hertz, proporciona um valor estimado do módulo elástico da amostra. A partir da histerese, emprega-se um modelo específico para determinar a viscosidade aparente das amostras (Li *et al.*, 2016). A partir dessas curvas, propriedades como elasticidade, viscosidade aparente e adesividade são calculadas, fornecendo mapas quantitativos dessas grandezas, além da análise desses parâmetros em curvas de força individuais.

Para a análise do módulo elástico das curvas de força, consideramos a teoria de contato DMT, cuja relação força-indentação para um indentador cônico, como a sonda de AFM, é dada por (H.-J. Butt, Cappella and Kappl, 2005):

$$F_{cone} = \frac{2E^* \tan\theta \delta^2}{\pi} - 2\pi R\gamma \quad (17).$$

A quantidade  $\theta$  representa o ângulo de abertura da ponta cônica e  $E^*$  representam o módulo de elasticidade reduzido, que relaciona a razão de Poisson do material ( $\nu_1$ ) e da sonda ( $\nu_2$ ) e o módulo de elasticidade do material ( $E_1$ ) e da sonda ( $E_2$ ), dado por:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_1^2}{E_1} + \frac{1 - \nu_2^2}{E_2} \quad (18)$$

Na obtenção do valor das forças de adesão das amostras, observa-se que durante a retração do cantiléver ele sofre uma deflexão negativa até que sua força total supere as forças de adesão, perdendo o contato com a superfície da amostra (Dos Santos Ferreira *et al.*, 2010). O ponto em que a força de adesão entre a ponta e a amostra atinge o seu valor máximo é aquele que corresponde ao ponto de mínimo de deflexão. Usando essas características gerais, a adesividade das amostras pode ser deduzida qualitativamente de duas diferentes formas: i) tomando-se o valor de força máxima de adesão entre a ponta e a amostra (valor mais negativo de deflexão) e ii) calculando o trabalho realizado pelas forças adesivas. O trabalho é obtido calculando a área da curva de deflexão/deslocamento em sua porção negativa de deflexão (porção que corresponde às forças adesivas).

Indentações sucessivas podem resultar em deformações plásticas da superfície se o stress (pressão) aplicado exceder o ponto de máxima carga do material. No entanto, o modelo de Oliver e Pharr (Oliver and Pharr, 2004) considera que, durante o processo de retração da sonda, apenas a parte elástica da deformação retorna ao seu estado inicial, enquanto a parte plástica permanece inalterada. Portanto, de maneira distinta ao modelo de Hertz, esta abordagem considera apenas o processo de alívio da carga de força sobre a superfície.

Um parâmetro definido nesta abordagem é a dureza da superfície  $S$ , cujo valor é dado por:

$$S = \frac{dF}{dh} \quad (19),$$

ou seja, a derivada da força aplicada à superfície em relação à distância percorrida pela sonda  $h$  durante a retração e aproximação da sonda. De posse do valor de  $S$  para vários pontos da superfície da amostra, monta-se um mapa dessa grandeza ao longo da área analisada.

#### A.1.4 Dados quantitativos a partir de mapas topográficos

Uma superfície, independentemente de como foi formada, apresenta variações na sua geometria. Essas variações podem ocorrer tanto em escala macroscópica quanto microscópica (Drelich and Mittal, 2005). Quando analisamos essas irregularidades em micro e nanoescala, passamos a utilizar o conceito de rugosidade. Todas as superfícies naturais, quando observadas em escala microscópica, apresentam algum grau de rugosidade, que pode ser definida como as variações presentes na textura da superfície.

A rugosidade pode ser quantificada utilizando três tipos de parâmetros obtidos da análise da superfície: parâmetros de amplitude, de espaçamento e híbridos. Os parâmetros de amplitude consideram apenas as variações verticais, como a altura dos picos e a profundidade dos vales. Entre esses parâmetros, os mais utilizados são a rugosidade média e a rugosidade média quadrática (Drelich and Mittal, 2005)

A rugosidade média ( $R_a$ ) é amplamente utilizada como parâmetro principal no controle geral de qualidade de superfícies rugosas. Esse parâmetro é matematicamente descrito como o desvio médio absoluto das irregularidades em relação à linha média ao longo de um comprimento específico da amostra. Por ser fácil de definir e medir, a rugosidade média fornece uma descrição geral eficiente das variações de altura na superfície. A definição matemática para a rugosidade média é:

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (20)$$

em que  $n$  é o número de pontos (pixels) no cursor da caixa (espaço escolhido para medir  $R_a$ ) e  $y_i$  a distância vertical máxima entre os pontos de dados mais alto e mais baixo na imagem antes do ajuste do plano. Os valores obtidos por  $R_a$  não definem as irregularidades do perfil, podendo assim ter o mesmo valor para perfis com distribuição de picos e vales diferentes; para tal distinção é necessário a utilização de outros parâmetros.

A rugosidade média quadrática (RMS), ou  $R_q$ , representa o desvio padrão da distribuição das alturas na superfície, ou seja, ela é semelhante ao parâmetro  $R_a$ , porém a média medida é quadrática. Este é um importante parâmetro para descrever a rugosidade por métodos estatís

ticos, sendo mais sensível do que Ra para grandes flutuações da altura da superfície em relação à linha central. A expressão matemática que descreve  $Rq$  é:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (21)$$

O fenômeno da rugosidade é perceptível tanto em escalas macroscópicas quanto microscópicas. Por isso, é possível desenvolver teorias que descrevam o sistema estudado com base em suas características específicas de escala. Essas teorias empregam dados estatísticos para caracterizar o sistema e simular a mecânica de contato entre superfícies (Bhushan, 2000). Um aspecto importante a ser considerado é a escala de análise da superfície. Em determinados materiais, as características podem variar conforme a ampliação da imagem, enquanto outros mantêm suas propriedades independentemente da escala de observação. Como as equações que determinam os parâmetros de rugosidade dependem do número de pixels de uma imagem e das alturas associadas a cada pixel, é recomendável padronizar os tamanhos de varredura e a resolução em medidas realizadas por AFM.

## A.2 Espectroscopia Vibracional Raman

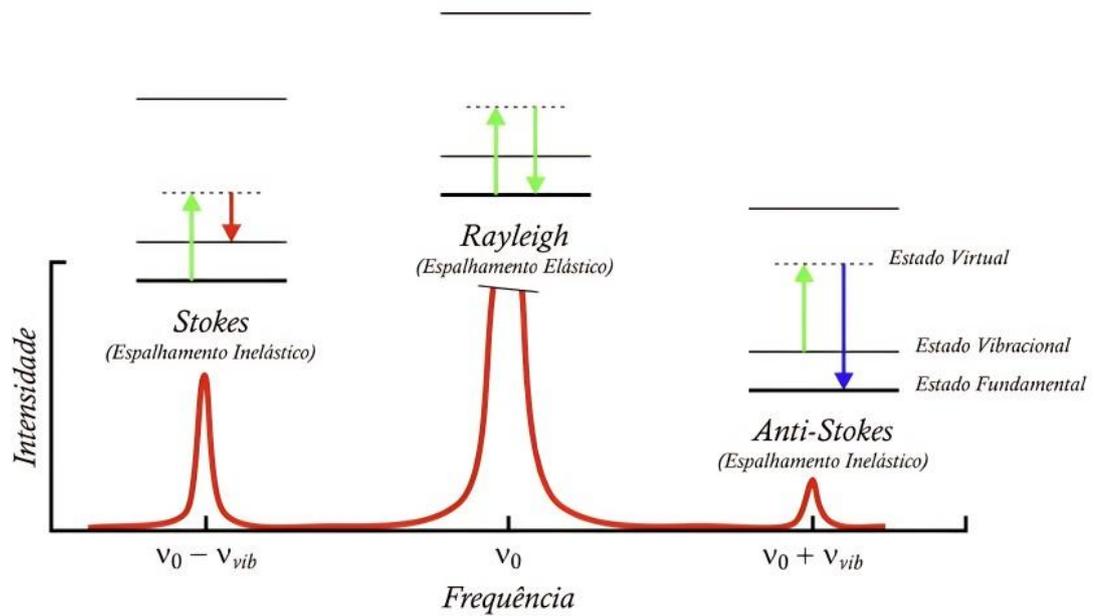
Existe uma grande variedade de técnicas relacionadas à espectroscopia vibracional, sendo as mais importantes a espectroscopia de infravermelho, por transformada de Fourier e a Espectroscopia Raman (Abbas, Pissard and Baeten, 2020). Essas técnicas permitem obter informações sobre os modos vibracionais das moléculas e grupos moleculares. A seguir serão abordados alguns aspectos acerca da técnica de Espectroscopia Raman, ferramenta que foi utilizada nesta pesquisa.

Muitos estudos sobre a dispersão da luz na água, relacionados, por exemplo, à cor azul do mar, estavam em evidência no início da década de 20 do século passado. Em 1928, após vários experimentos, o físico indiano Chandrasekhar Venkata Raman, juntamente com seu aluno Krishnan, publicou um artigo em que explicavam de forma diferente a coloração azul observada nas águas do mar (Raman, 1953). Raman baseou seus trabalhos nos estudos realizados por Rayleigh. Para Rayleigh, a coloração do mar era uma reflexão da cor do céu, mas para Raman a cor resultava da interação da luz do sol com as moléculas de água, ou seja, era resultado de um fenômeno próprio ocorrido nas moléculas de água, que posteriormente foi explicado como espalhamento da luz devido às interações com suas moléculas (Ferraro, Nakamoto and Brown, 2003)

Para justificar a sua afirmativa, Raman confeccionou um experimento simples, que consistia no Sol como fonte de luz, um telescópio e o detector, que seriam seus próprios olhos. Com este experimento, Raman conseguiu comprovar que a luz provinda da amostra era composta por outras componentes de luz, diferentes da luz incidente. Após essa confirmação experimental, esse fenômeno passou a ser chamado de Espalhamento Raman. Concluiu-se, então, que a luz espalhada é composta por luz advinda do espalhamento Rayleigh (elástico), que é bem intenso e tem a mesma frequência que da luz incidente ( $\nu_0$ ) e do espalhamento Raman (inelástico), cuja intensidade é cinco ordens de grandeza menor em relação ao espalhamento elástico e tem frequências  $\nu_0 \pm \nu_{vib}$ , onde  $\nu_{vib}$  é uma frequência de vibração de uma molécula (Medeiros Guasque De Mesquita, 2003)

As frequências  $\nu_0 - \nu_{vib}$  e  $\nu_0 + \nu_{vib}$  são chamadas de linhas Stokes e anti-Stokes, respectivamente. Classicamente as duas bandas deveriam ter a mesma intensidade, mas observa-se que as bandas do lado Stokes, que corresponde a uma diminuição de energia, são mais intensas do que a Anti-Stokes, que expressa um aumento de energia. Este efeito ocorre porque à temperatura ambiente a quantidade de moléculas que já se encontram em estados vibracionais excitados é menor do que aquelas que estão no estado fundamental. Assim, é preferível medir os espectros Raman no lado do espalhamento Stokes. A frequência vibracional da molécula é medida na espectroscopia Raman com uma mudança de frequência do feixe incidente (Keresztury, 2001). Pela lei de conservação de energia, o fóton espalhado deve ter uma energia igual a energia do fóton incidente menos a energia do fônnon resultante.

A Figura A.4 representa os diferentes tipos de espalhamento de luz observados na espectroscopia Raman. A intensidade do Stokes é geralmente maior devido à predominância de moléculas no estado fundamental, conforme descrito pela estatística de Boltzmann. O diagrama de energia explica as transições, destacando o estado virtual transitório. Esses conceitos são fundamentais para identificar modos vibracionais e caracterizar propriedades moleculares em diversas áreas científicas.



**Figura A.4: Representação esquemática do espalhamento Rayleigh e Raman.**

Fonte: Cedido por Joel Félix (Filho and Silva, 2024).

O campo eletromagnético irá perturbar as partículas carregadas da molécula resultando em um momento de dipolo induzido:

$$p = \alpha E \quad (22)$$

em que  $\alpha$  é a polarizabilidade,  $E$  é o campo elétrico incidente e  $p$  é momento de dipolo induzido.

Para pequenas amplitudes de vibração,  $\alpha$  pode ser escrito como uma série de potências a partir das amplitudes de vibração  $q$ , dada por:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q + \dots \quad (23)$$

em que  $\alpha_0$  é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e  $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0$  é a taxa de variação de  $\alpha$

em relação a amplitude da variação em torno da posição de equilíbrio.

Para uma onda eletromagnética, o vetor campo elétrico varia com o tempo conforme a equação abaixo:

$$\vec{E}(t) = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (24)$$

A molécula vibra com uma frequência  $\nu_{vib}$ , cujos deslocamentos dos núcleos são descritos por:

$$q(t) = q_0 \cos(2\pi\nu_{vib} t) \quad (25)$$

Neste caso, o momento de dipolo elétrico induzido pode ser descrito por:

$$\vec{p} = \alpha \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right) q_0 \vec{E}_0 \{\cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t]\} \quad (26)$$

As regras de seleção Raman são fundamentadas no princípio de que, para uma vibração molecular ser ativa no espectro Raman, deve ocorrer uma variação na polarizabilidade da molécula durante o movimento vibracional. Essa condição pode ser expressa matematicamente como

$$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right) \neq 0 \quad (27)$$

Em termos físicos, isso implica que o campo elétrico do fóton incidente induz uma deformação na nuvem eletrônica da molécula, e essa deformação deve variar periodicamente durante a vibração molecular (Long, 1977).

A análise da atividade Raman também envolve o conceito de tensor de polarizabilidade de transição ( $[\alpha]_{fi}$ ), cujos elementos representam as mudanças na polarizabilidade associadas à transição entre os estados  $f$  e  $i$ . Apenas os modos vibracionais que causam variações significativas nesses elementos do tensor são detectados no espectro Raman. Além disso, a intensidade dos picos Raman depende não apenas da variação da polarizabilidade, mas também da orientação molecular e das condições experimentais, como a polarização da luz incidente (Ferraro and Nakamoto, 2012).

Em moléculas centrosimétricas, ou seja, onde há um ponto dentro da molécula em que cada parte da estrutura possui um equivalente exatamente oposto em direção e distância em relação a esse ponto, as regras de exclusão determinam que os modos vibracionais ativos no Raman são inativos no infravermelho e vice-versa. Esse comportamento se deve à natureza distinta dos critérios de seleção: enquanto o Raman depende da variação da polarizabilidade, o infravermelho requer mudanças no momento de dipolo molecular (McCreery, 2005). Assim, a complementaridade entre as técnicas Raman e infravermelho permite uma caracterização detalhada das vibrações moleculares.

A análise de simetria molecular, baseada na teoria de grupos, fornece uma ferramenta rigorosa para prever quais modos vibracionais são Raman-ativos. Usando tabelas de caracteres, é possível identificar os modos que pertencem às representações

irredutíveis que satisfazem as condições de atividade Raman. Isso destaca a importância da teoria de grupos na interpretação espectroscópica e na determinação estrutural (Long, 1977).

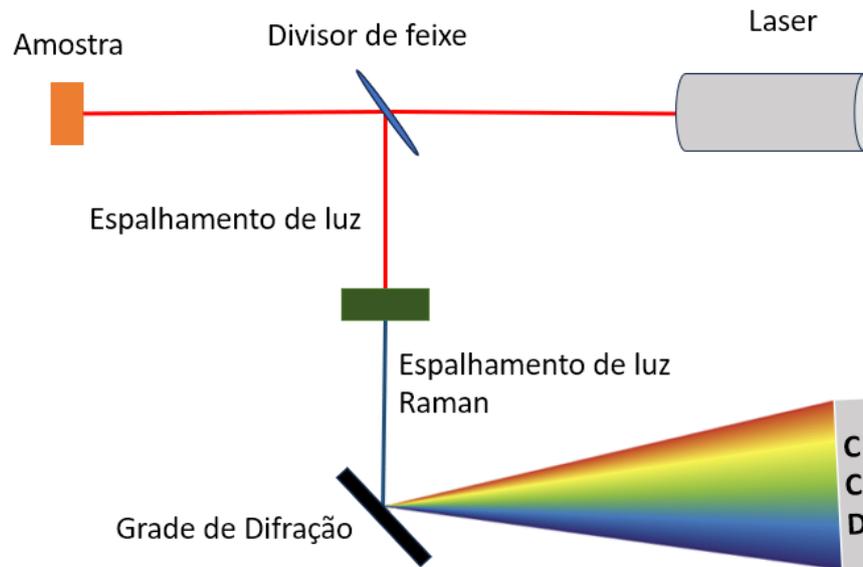
Analisando as equações anteriores, podemos identificar várias características do efeito Raman (Larkin, 2011).

- O primeiro termo da equação contém apenas a frequência da radiação incidente e corresponde ao espalhamento Rayleigh.
- O segundo termo contém termos que oscilam com frequências  $\nu_0 - \nu_{vib}$  e  $\nu_0 + \nu_{vib}$  que correspondem aos espalhamentos Raman Stokes e anti-Stokes, respectivamente.
- Apenas as vibrações que alteram a polarizabilidade  $\partial\alpha/\partial q$  causam o efeito Raman.
- A polarização é linear com a intensidade do laser:  $p \sim E_0$ .
- Os deslocamentos Raman podem ser negativos Stokes (S) e positivos Anti-Stokes (AS).
- $\partial\alpha/\partial r \ll \alpha_0$  e o espalhamento Raman é muito menos intenso do que o espalhamento Rayleigh.

A espectroscopia Raman é uma das ferramentas experimentais mais versáteis, fornecendo informações químicas e conformacionais dos átomos através da interação da radiação com os elétrons. Como exemplo, temos:

- O tipo de átomos/moléculas do material (informação química).
- A energia dos elétrons (propriedades eletrônicas).
- A energia dos fônons (propriedades atômicas e moleculares).

Quanto aos aspectos experimentais, um espectrômetro Raman contém lasers que produzem um feixe de luz monocromático intenso. Após interagir com a amostra, a maior parte da luz é refletida sem alteração em suas propriedades. Com isso, são necessários filtros que permitam a passagem dos fótons com comprimentos de onda alterados. A fração de luz que passa é analisada em um espectrômetro óptico que dispersa a luz com grades de difração. Assim, diferentes comprimentos de onda são detectados em uma câmera CCD (charge-coupled device), ou Dispositivo de Carga Acoplada. Daqui, resulta um espectro Raman característico da amostra (Larkin, 2011). Um espectro Raman apresenta vários picos, mostrando a intensidade e a posição do comprimento de onda da luz espalhada. Cada pico corresponde a uma vibração de ligação molecular específica, incluindo ligações individuais como CC, C=C, NO, CH. Um esquema experimental é ilustrado na figura A.5



**Figura A.5: Esquema de um espectrômetro Raman.** A linha vermelha é a trajetória do laser e a linha azul é a trajetória dos fótons que foram alterados.

Fonte: Própria Autora.

A espectroscopia Raman sonda a estrutura química de forma qualitativa de um material e fornece informações sobre estrutura química, fase, contaminação e impureza. Ou seja, um espectro Raman pode ser considerado uma impressão digital química para uma molécula ou material. Neste equipamento se pode analisar amostras sólidas, pós, líquidos, orgânicos e inorgânicos, o que lhe confere ainda mais importância e aplicabilidade no ramo da espectroscopia.

**B ARTIGO PUBLICADOS**

# Atomic Force Microscopy Applied to the Study of Tauopathies

Maria do Socorro do Nascimento Amorim, Álefe Roger Silva França, Ralph Santos-Oliveira, Jonas Rodrigues Sanches, Thamys Marinho Melo, Bruno Araújo Serra Pinto, Leandro R. S. Barbosa, and Luciana Magalhães Rebelo Alencar\*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.3c00819>

Read Online

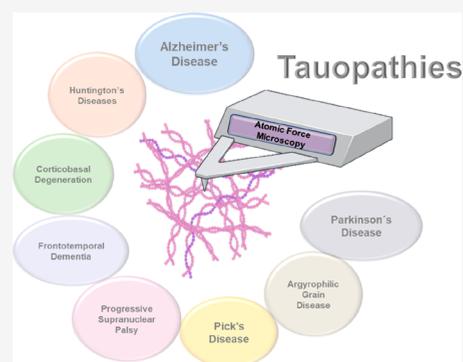
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

**ABSTRACT:** Atomic force microscopy (AFM) is a scanning probe microscopy technique which has a physical principle, the measurement of interatomic forces between a very thin tip and the surface of a sample, allowing the obtaining of quantitative data at the nanoscale, contributing to the surface study and mechanical characterization. Due to its great versatility, AFM has been used to investigate the structural and nanomechanical properties of several inorganic and biological materials, including neurons affected by tauopathies. Tauopathies are neurodegenerative diseases featured by aggregation of phosphorylated tau protein inside neurons, leading to functional loss and progressive neurotoxicity. In the broad universe of neurodegenerative diseases, tauopathies comprise the most prevalent, with Alzheimer's disease as its main representative. This review highlights the use of AFM as a suitable research technique for the study of cellular damages in tauopathies, even in early stages, allowing elucidation of pathogenic mechanisms of these diseases.

**KEYWORDS:** AFM, tauopathies, amyloid fibers, Alzheimer's disease, nanomechanics



## 1. INTRODUCTION

Atomic force microscopy (AFM) is a versatile and robust scanning probe microscopy (SPM) technique that was developed in 1986 by Binnig et al.<sup>1</sup> SPM methods have revolutionized the field of microscopy by using sharp probes to map the surfaces under study rather than using light as the probing mechanism.<sup>2</sup> The first commercial AFM was introduced in 1989. The technique allows the analysis of any type of material, organic or not, providing information about its mechanical and ultrastructural properties on an atomic scale.<sup>3</sup> This technique has driven significant advances in biophysics and materials science.

Since its development, AFM has been used in the characterization of surfaces of nonbiological materials.<sup>4</sup> Although its main applications are also focused on nanotechnology and materials science studies, AFM has gained popularity for studying biological materials since its invention.<sup>4,5</sup> In this sense, using this equipment in biology and medicine is becoming increasingly fundamental, making important contributions in the area.<sup>6</sup>

Weisenhorn and colleagues<sup>7</sup> employed force versus distance curve measurements in the AFM to analyze soft cells in one of their earliest applications in biological systems, demonstrating the capability of quantifying such samples' local elasticity and nanoindentation. This work proved that the height of a soft specimen in AFM images is frequently too low due to specimen deformation and overestimation of the applied force.

In the same direction, Radmacher et al.'s study<sup>8</sup> demonstrated how to use AFM to map the stiffness of various biological materials, including living cells, using this equipment's great sensitivity and precision, revealing new insights into cell migration and differentiation processes. Exploring different properties in cells, AFM was employed by Goldmann and co-workers<sup>9</sup> in the study of cell adhesion, focusing on the involvement of the vinculin protein, presenting an integrated picture of this protein's role in the matrix. The rheological study of cells and tissues was carried out by Alcaraz and collaborators<sup>10</sup> through the AFM, showing an innovative approach to studying the viscoelasticity of biological systems. The rheological results showed, in summary, that alveolar and bronchial cells exhibit elastic behavior at low frequencies, and lung epithelial cells exhibited a response similar to that of soft vitreous materials. This made it possible to study the fundamental characteristics of the cellular organization of such systems.

The work by Lekka and collaborators<sup>11</sup> utilizing AFM demonstrated that Young's modulus of normal cells was nearly

**Received:** December 18, 2023

**Revised:** January 19, 2024

**Accepted:** January 22, 2024

# Diabetes and Cognitive Decline: An Innovative Approach to Analyzing the Biophysical and Vibrational Properties of the Hippocampus

Maria Do Socorro Do Nascimento Amorim, Erick Rafael Dias Rates, de Araujo Costa Melo Isabela Vitoria, Joel Félix Silva Diniz Filho, Clenilton Costa dos Santos, Ralph Santos-Oliveira, Renato Simões Gaspar, Jonas Rodrigues Sanches, Bruno Araújo Serra Pinto, Antonio Marcus de Andrade Paes, and Luciana Magalhães Rebelo Alencar\*



Cite This: *ACS Omega* 2024, 9, 40870–40881



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

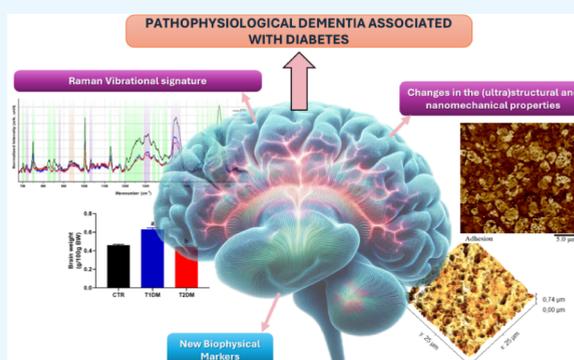


Article Recommendations



Supporting Information

**ABSTRACT:** Diabetes Mellitus (DM) is a disease characterized by high blood glucose levels, known as hyperglycemia. Diabetes represents a risk factor for the development of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's Disease (AD), one of the most prevalent neurodegenerative diseases worldwide, which leads to progressive mental, behavioral, and functional decline, affecting many brain structures, especially the hippocampus. Here, we aim to characterize the ultrastructural, nanomechanical, and vibrational changes in hyperglycemic hippocampal tissue using atomic force microscopy (AFM) and Raman spectroscopy. DM was induced in rats by streptozotocin injection (type 1) or dietary intervention (type 2). Cryosections of the hippocampus were prepared and analyzed on an MM8 AFM (Bruker) in Peak Force Quantitative Nanomechanics mode, performing  $25 \mu\text{m}^2$  scans in 9 regions of 3 samples from each group. Ultrastructural and nanomechanical data such as surface roughness, area, volume, Young's modulus, and adhesion were evaluated. The hippocampal samples were also analyzed on a T64000 Spectrometer (Horiba), using a laser  $\lambda = 632.8$  nm, and for each sample, four spectra were obtained in different regions. AFM analyses show changes on the ultrastructural scale since diabetic animals had hippocampal tissue with greater roughness and volume. Meanwhile, diabetic tissues had decreased adhesion and Young's modulus compared to control tissues. These were corroborated by Raman data that shows changes in the molecular composition of diabetic tissues. The individual spectra show that the most significant changes are in the amide, cholesterol, and lipid bands. Overall, the data presented here show that hyperglycemia induces biophysical alterations in the hippocampal tissue of diabetic rats, providing novel biophysical and vibrational cues on the relationship between hyperglycemia and dementia.



## INTRODUCTION

Neurodegenerative diseases are progressive nervous system disorders that affect specific neuronal populations' function and maintenance. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NIH)<sup>1</sup> describes more than 600 neurological disorders. It highlights Alzheimer's and Parkinson's diseases as the neurodegenerative diseases with the highest epidemiological incidence in the world.<sup>2</sup> In 2020, it was estimated that 47 million people around the world were living with dementia, making it one of the main causes of dependence and disability. The number of people with dementia is predicted to increase in the next 30 years due to the population's fast aging.<sup>3</sup> Neurodegeneration is associated with synapse and neural network dysfunction and the deposition of physiochemically altered protein variants in the brain, such as tau and amyloid beta.<sup>4</sup>

Conversely, Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease physiologically characterized by high blood glucose levels, mainly caused by insufficient insulin production or the body's lack of insulin response.<sup>5</sup> The International Diabetes Federation (IDF) estimates that 537 million adults (20–79 years) have diabetes and projects that by 2030, there will be 643 million, and by 2045, there will be 783 million.<sup>6</sup>

According to recent studies<sup>7–9</sup> there is a correlation between diabetes and cognitive decline, with patients with diabetes

Received: June 24, 2024

Revised: September 9, 2024

Accepted: September 12, 2024

Published: September 19, 2024





## Nanomicelles of taurine inhibit the fibrillation and toxicity of amyloid $\beta_{1-42}$ peptide

Natália Cristina Gomes-da-Silva<sup>a</sup>, Marília Amável Gomes Soares<sup>a</sup>, Eduardo Ricci-Junior<sup>b</sup>, Maria do Socorro do Nascimento Amorim<sup>c</sup>, Luciana Magalhães Rebelo Alencar<sup>c</sup>, Prapanna Bhattarai<sup>d</sup>, Lin Zhu<sup>d</sup>, Cristian Follmer<sup>e</sup>, Ralph Santos-Oliveira<sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals and Synthesis of Novel Radiopharmaceuticals, Rio de Janeiro 21941906, Brazil

<sup>b</sup> Federal University of Rio de Janeiro, School of Pharmacy, Galenic Development Laboratory (LADEG), Rio de Janeiro, 21941-170, Brazil

<sup>c</sup> Federal University of Maranhão, Department of Physics, Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Campus Bacanga, São Luís, Maranhão, 65080-805, Brazil

<sup>d</sup> Department of Pharmaceutical Science, Irma Lerma Rangel School of Pharmacy, Texas A&M University, College Station, TX 77843, United States

<sup>e</sup> Laboratory of Biological Chemistry of Neurodegenerative Disorders, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, Brazil

<sup>f</sup> Rio de Janeiro State University, Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, 23070200 Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Drug delivery  
Alzheimer  
Parkinson  
Treatment  
Therapy

### ABSTRACT

The development of new drugs capable of treating or alleviating the symptoms of Alzheimer's diseases become a global goal in the last few years. The rapid, uncontrolled and devastating progression of the Alzheimer disease has been affecting over 55 million patients worldwide, representing over 270 billion US\$ in cost. Nonetheless, the limited effective drugs, capable just to restrict and temporally control the progression of the disease, also remain a drawback and increase the urgency of new therapies. In this direction, we have fully developed, characterized and evaluated nanomicelles of taurine against the formation of beta amyloid plaque as the safety use. The results demonstrated that the nanomicelles were capable to reduce the beta amyloid plaque as a safety profile in healthy cells. Although preliminary, the results provides evidences that taurine nanomicelles are effective in the treatment of Alzheimer diseases.

### 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative syndrome associated with aging, which presents cognitive, functional, and behavioral decline, making it the leading cause of dementia worldwide [1]. In 2019, the annual costs of treating AD in US were estimated at 1313.4 billion dollars considering 55.2 million people diagnosed, which corresponds to an expense of 23,796 dollars/person [2]. In 2021 care costs reached 271.6 billion dollars [3] following the increased risk of emotional distress and negative mental and physical health outcomes for family caregivers [3].

The typical form of AD is associated with genetic and environmental factors [4]. The etiological mechanisms that trigger the AD are diverse and unknown, however is well-documented that choline acetyltransferase, responsible for the synthesis of choline acetylcholine in cholinergic neurons [5,6] the excess of glutamate, responsible for the

excitotoxicity; the overexpression of extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR<sub>E</sub>) responsible for influx of calcium and glutamatergic activity [7,8] the overproduction of  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) plaques [9] and neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated Tau protein (microtubule-associated protein) [10] are intimately intertwined in the development and progression of AD.

The A $\beta$  peptides are the main biomarker of AD, characterized by the formation of aggregates, intrinsically, related to the development of the disease [11]. These peptides are produced by proteolytic cleavage of the hydrophobic transmembrane portion of the amyloid precursor protein (APP) by beta- and gamma-secretases [12]. Once formed, they adopt several isoforms, in particular, isoforms A $\beta_{1-40}$  and A $\beta_{1-42}$ . These isoforms are the main constituents of the amyloid plaques found in the brains of patients with AD [13].

The inflammatory profile of AD is very well described, hyperphosphorylation of Tau protein and A $\beta$  protein can lead to the induction

\* Correspondence to: Brazilian Nuclear Energy Commission Nuclear Engineering Institute Rio de Janeiro/RJ, Brazil Rua Helio de Almeida, 75, Ilha do Fundão-Rio de Janeiro-Brazil.

E-mail address: [roliveira@ien.gov.br](mailto:roliveira@ien.gov.br) (R. Santos-Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104721>

Received 3 April 2023; Received in revised form 27 June 2023; Accepted 29 June 2023

Available online 7 July 2023

1773-2247/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.



## Probing the interaction of mannose-binding lectin with healthy and sickle cell anemia red blood cells and its role in cellular biomechanics

Carinna Lima<sup>a,\*</sup>, Tatianne de L.R. Matos<sup>a,1</sup>, Tiago H.S. Souza<sup>a</sup>, Maria S.N. Amorim<sup>b</sup>, Otacílio A. Santana<sup>a</sup>, Patrícia Moura<sup>c</sup>, Diogenes S. Moura<sup>d</sup>, Paulo E. Cabral Filho<sup>a</sup>, Luciana M.R. Alencar<sup>b</sup>, Adriana Fontes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão 65080-805, Brazil

<sup>c</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50100-130, Brazil

<sup>d</sup> Colégio de Aplicação, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco 50740-550, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Erythrocytes  
Hemoglobinopathy  
Glycoprotein

### ABSTRACT

Mannose-binding lectin (MBL) is an important glycoprotein of the human innate immune system. Furthermore, individuals with sickle cell anemia (SCA) and MBL deficiency seem more susceptible to vaso-occlusive crises, suggesting an MBL role on HbSS red blood cells (RBCs). This study investigated the interaction of MBL with HbA (healthy) and HbSS RBCs using optical tweezers (OT) and atomic force microscopy (AFM). OT was employed to measure the RBC overall elasticity, while AFM was applied to assess the local stiffness and roughness of the cell membrane. Osmotic fragility assays were also performed. Additionally, cationic quantum dots (QDs) were applied to evaluate the membrane charges of HbSS RBCs. Results using QDs indicated that HbSS RBCs have a less negatively charged surface than HbA RBCs, potentially due to a reduced sialic acid content. Osmotic fragility assays showed that MBL enhanced the resistance of RBCs to lysis, while OT and AFM indicated a decrease in their elastic capacity following MBL incubation. Moreover, OT and membrane roughness results suggested a greater interaction of MBL with HbSS RBCs. We believe this study provided insights into the MBL interaction with HbSS RBCs, inciting further investigations to better understand its involvement in SCA pathophysiology *in vivo*.

### 1. Introduction

Mannose-binding lectin (MBL) is a key biomolecule in the human innate immune system that plays an important role in host defense, serving as a broad-spectrum recognition protein against a wide variety of infectious agents (*i.e.*, bacteria, viruses, fungi, and parasites) as well as altered host cells, such as apoptotic and tumor cells [1]. Structurally, MBL consists of multimers of identical polypeptide chains (~ 32 kDa each), characterized by four regions: a carbohydrate-recognition domain (CRD), a hydrophobic neck region, a collagenous region (CLR), and a cysteine-rich N-terminal region. The CRD and CLR are primarily responsible for the biological functions of MBL [2].

MBL exhibits a high affinity for glycostructures containing D-mannose, L-fucose, N-acetyl-D-glucosamine, and N-acetyl-D-mannosamine, which are found on the surfaces of pathogens and altered host

cells. As a C-type lectin, MBL binding to these glycostructures, through CRD, is calcium-dependent, and facilitated by the cluster effect, which enhances the lectin's ability to recognize and interact with multiple sugar moieties simultaneously [3,4]. Thus, in the innate immune system, MBL functions as a pattern-recognition receptor (PRR) in association with serine proteases through its CLR, forming MBL-associated serine proteases (MASPs). Then, upon binding to pathogens or altered host cells that expose specific carbohydrate patterns, MBL triggers the activation of the lectin pathway of the complement system, enhancing opsonization and promoting phagocytosis by immune cells such as macrophages and neutrophils. Through these processes, MBL plays a dual role against infectious agents as well as host apoptotic or tumor cells, acting as a PRR and modulating the immune response and inflammation, mediating cell signaling and clearance [4]. Its activity may also extend to cells undergoing other biological changes, including

\* Corresponding authors at: Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: [carinnalima@hotmail.com](mailto:carinnalima@hotmail.com) (C. Lima), [adriana.fontes@ufpe.br](mailto:adriana.fontes@ufpe.br) (A. Fontes).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140118>

Received 20 September 2024; Received in revised form 6 January 2025; Accepted 18 January 2025

Available online 20 January 2025

0141-8130/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

**C COMITÊ DE ÉTICA DA UFMA**



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



**CERTIFICADO (04/2022)**

Certificamos que a proposta intitulada: "**Intervenções nutricionais como reprogramadoras de desordens neuroendócrinas em prole de ratas obesas**" Processo 23115.000747/2022-90, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 19 de janeiro de 2022.

We certify that the proposal: "**Nutritional interventions as reprogrammers of neuroendocrine disorders in offspring of obese rats**", Process 23115.000747/2022-90, under the responsibility of **Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of January 19, 2022.

**PROPOSTA**

**Finalidade:** Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde

**Vigência:** 01/02/2022 a 31/01/2024

**ANIMAIS**

**Origem:** Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão

<b>Espécie:</b> <i>Rattus norvegicus</i> var. Wistar	<b>Sexo:</b> Fêmeas	<b>Idade:</b> 30 dias	<b>AMOSTRA</b> 16
		<b>Peso:</b> 45g	
	<b>Machos</b>	<b>Idade:</b> 90 dias	16
		<b>Peso:</b> 350g	

**Local do experimento:** Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão – CCBS/UFMA.

São Luís, 25 de janeiro de 2022

Prof. Dra. Rachel Melo Ribeiro

Vice-Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA

## Página de assinaturas



**Rachel Ribeiro**  
916.476.573-34  
Signatário

### HISTÓRICO

- |                         |   |   |
|-------------------------|---|---|
| 25 jan 2022<br>19:38:20 |  | Rachel Melo Ribeiro criou este documento. (E-mail: rachelmelo@ribeiro.com.br, CPF: 916.476.573-34)  |
| 25 jan 2022<br>19:38:23 |  | Rachel Melo Ribeiro (E-mail: rachelmelo@ribeiro.com.br, CPF: 916.476.573-34) visualizou este documento por meio do IP 191.31.72.222 localizado em São Luís - Maranhão - Brazil. |
| 25 jan 2022<br>19:38:29 |  | Rachel Melo Ribeiro (E-mail: rachelmelo@ribeiro.com.br, CPF: 916.476.573-34) assinou este documento por meio do IP 191.31.72.222 localizado em São Luís - Maranhão - Brazil.    |



Escaneie a imagem para verificar a autenticidade do documento  
Hash SHA256 do PDF original #71c866deb2b1110d9abad33993b80832ad80ff28442614620d51214eb9dabfd2  
<https://valida.ae/da9a8de14bdd4ad5f5aa93422373300f6ec450ea1cf781022>



## REFERÊNCIAS

- ‘2023 Alzheimer’s disease facts and figures’ (2023) *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association*, 19(4), pp. 1598–1695. Available at: <https://doi.org/10.1002/alz.13016>.
- Abbas, O., Pissard, A. and Baeten, V. (2020) ‘3 - Near-infrared, mid-infrared, and Raman spectroscopy’, in Y. Pico (ed.) *Chemical Analysis of Food (Second Edition)*. Academic Press, pp. 77–134. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813266-1.00003-6>.
- Ahmadian, N. *et al.* (2018) ‘Tau Pathology of Alzheimer Disease: Possible Role of Sleep Deprivation’, *Basic and Clinical Neuroscience*, 9(5), pp. 307–316. Available at: <https://doi.org/10.32598/bcn.9.5.307>.
- Ahmed, A.M. (2002) ‘History of diabetes mellitus’, *Saudi Medical Journal*, 23(4), pp. 373–378.
- Ahmed, T. *et al.* (2014) ‘Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion’, *Neurobiology of Aging*, 35(11), pp. 2474–2478. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005>.
- Akram, M. *et al.* (2020) ‘Role of Phenylalanine and Its Metabolites in Health and Neurological Disorders’, in *Synucleins - Biochemistry and Role in Diseases*. IntechOpen. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.83648>.
- Alcaraz, J. *et al.* (2003) ‘Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy’, *Biophysical Journal*, 84(3), pp. 2071–2079. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75014-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75014-0).
- Alencar, L.M.R. (2007) *Estudo morfológico e das propriedades elásticas de plaquetas humanas por microscopia de força atômica*.
- Alencar, L.M.R. (2010) ‘Estudo da viscoelasticidade de células de câncer renal por microscopia de força atômica’. Available at: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/12366> (Accessed: 7 January 2025).
- Alencar, L.M.R. *et al.* (2023) ‘Polymeric nanoparticles mimicking microplastics/nanoplastics: Ultrastructural and rheological analysis of the effect of neutrons on their structures’, *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 20, p. 100876. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2023.100876>.
- Al-Hilaly, Y.K. *et al.* (2020) ‘Tau (297-391) forms filaments that structurally mimic the core of paired helical filaments in Alzheimer’s disease brain’, *FEBS letters*, 594(5), pp. 944–950. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13675>.
- Alzheimer, A. *et al.* (1995) ‘An English translation of Alzheimer’s 1907 paper, “Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde”’, *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 8(6), pp. 429–431. Available at: <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>.
- Amorim, M. do S. do N. *et al.* (2022a) ‘New Insights into Hemolytic Anemias: Ultrastructural and Nanomechanical Investigation of Red Blood Cells Showed Early Morphological Changes’, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 18(2), pp. 405–421. Available at: <https://doi.org/10.1166/jbn.2022.3267>.

Amorim, M. do S. do N. *et al.* (2022b) ‘New Insights into Hemolytic Anemias: Ultrastructural and Nanomechanical Investigation of Red Blood Cells Showed Early Morphological Changes’, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 18(2), pp. 405–421. Available at: <https://doi.org/10.1166/jbn.2022.3267>.

Amyot, R. and Flechsig, H. (2020) ‘BioAFMviewer: An interactive interface for simulated AFM scanning of biomolecular structures and dynamics’, *PLOS Computational Biology*, 16(11), p. e1008444. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008444>.

An, Y. *et al.* (2023) ‘The role of oxidative stress in diabetes mellitus-induced vascular endothelial dysfunction’, *Cardiovascular Diabetology*, 22, p. 237. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12933-023-01965-7>.

Ansardamavandi, A. *et al.* (2020) ‘An AFM-Based Nanomechanical Study of Ovarian Tissues with Pathological Conditions’, *International Journal of Nanomedicine*, 15, pp. 4333–4350. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S254342>.

Antar, S.A. *et al.* (2023a) ‘Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 168, p. 115734. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115734>.

Antar, S.A. *et al.* (2023b) ‘Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments’, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 168(115734). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115734>.

de Araujo Dorneles, M.L. *et al.* (2022a) ‘Zika Virus (ZIKV): A New Perspective on the Nanomechanical and Structural Properties’, *Viruses*, 14(8), p. 1727. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14081727>.

de Araujo Dorneles, M.L. *et al.* (2022b) ‘Zika Virus (ZIKV): A New Perspective on the Nanomechanical and Structural Properties’, *Viruses*, 14(8), p. 1727. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14081727>.

Arieff, A.I. and Kleeman, C.R. (1973) ‘Studies on mechanisms of cerebral edema in diabetic comas. Effects of hyperglycemia and rapid lowering of plasma glucose in normal rabbits’, *The Journal of Clinical Investigation*, 52(3), pp. 571–583. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI107218>.

Arnold, C.S. *et al.* (1996) ‘The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine’, *The Journal of Biological Chemistry*, 271(46), pp. 28741–28744. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28741>.

Aslanian, D., Négrerie, M. and Chambert, R. (1986) ‘A Raman spectroscopic study on the interaction of an ion-channel protein with a phospholipid in a model membrane system (gramicidin A/L-alpha-lysophosphatidylcholine)’, *European Journal of Biochemistry*, 160(2), pp. 395–400. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09984.x>.

Atkins, P., Paula, J.D. and Keeler, J. (2022) *Atkins' Physical Chemistry*. 12th edn. Oxford University Press. Available at: <https://doi.org/10.1093/hesc/9780198847816.001.0001>.

Atkinson, M.A. and Eisenbarth, G.S. (2001) 'Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment', *Lancet (London, England)*, 358(9277), pp. 221–229. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05415-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05415-0).

Bahal, M. *et al.* (no date) 'Advances in Type 1 Diabetes Mellitus Management in Children', *Cureus*, 16(8), p. e67377. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.67377>.

Banday, M.Z., Sameer, A.S. and Nissar, S. (2020a) 'Pathophysiology of diabetes: An overview', *Avicenna Journal of Medicine*, 10(4), pp. 174–188. Available at: [https://doi.org/10.4103/ajm.ajm\\_53\\_20](https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20).

Banday, M.Z., Sameer, A.S. and Nissar, S. (2020b) 'Pathophysiology of diabetes: An overview', *Avicenna Journal of Medicine*, 10(4), pp. 174–188. Available at: [https://doi.org/10.4103/ajm.ajm\\_53\\_20](https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20).

Bandekar, J. (1992) 'Amide modes and protein conformation', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1120(2), pp. 123–143. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90261-b](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90261-b).

Banerjee, S. and Ghosh, A. (2021) 'Structurally Distinct Polymorphs of Tau Aggregates Revealed by Nanoscale Infrared Spectroscopy', *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 12(45), pp. 11035–11041. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.1c02660>.

Baptista, M.G.P. *et al.* (2020) 'Histomorphometric and immunohistochemical evaluation of the frontal cerebral cortex in diabetic rats after treatment with melatonin', *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40(12), pp. 1077–1087. Available at: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6421>.

Barbiellini Amidei, C. *et al.* (2021) 'Association Between Age at Diabetes Onset and Subsequent Risk of Dementia', *JAMA*, 325(16), pp. 1640–1649. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4001>.

Barbier, P. *et al.* (2019) 'Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, p. 204. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204>.

de Barros, A.O. da S. *et al.* (2023) 'Polymeric nanoparticles and nanomicelles of hydroxychloroquine co-loaded with azithromycin potentiate anti-SARS-CoV-2 effect', *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 13(2), pp. 263–281. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40097-022-00476-3>.

Bashir, S. *et al.* (2024) 'Probing protein aggregation through spectroscopic insights and multimodal approaches: A comprehensive review for counteracting neurodegenerative disorders', *Heliyon*, 10(7), p. e27949. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27949>.

Battelino, T. *et al.* (2019) 'Clinical Targets for Continuous Glucose Monitoring Data Interpretation: Recommendations From the International Consensus on Time in Range', *Diabetes Care*, 42(8), pp. 1593–1603. Available at: <https://doi.org/10.2337/dci19-0028>.

Becerra, N. *et al.* (2021) 'AFM and Fluorescence Microscopy of Single Cells with Simultaneous Mechanical Stimulation via Electrically Stretchable Substrates', *Materials*, 14(15), p. 4131. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma14154131>.

- Bergmann, A. *et al.* (2013) 'A low-cost AFM setup with an interferometer for undergraduates and secondary-school students', *European Journal of Physics*, 34. Available at: <https://doi.org/10.1088/0143-0807/34/4/901>.
- Bernardis, L.L. and Patterson, B.D. (1968) 'Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions', *The Journal of Endocrinology*, 40(4), pp. 527–528. Available at: <https://doi.org/10.1677/joe.0.0400527>.
- Bhatt, H.B. and Smith, R.J. (2015) 'Fatty liver disease in diabetes mellitus', *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 4(2), pp. 101–108. Available at: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.01.03>.
- Bhushan, B., Fuchs, H. and Hosaka, S. (2014) *Applied Scanning Probe Methods I*. Springer Science & Business Media.
- Bhushan, B. and Marti, O. (2017) 'Scanning Probe Microscopy—Principle of Operation, Instrumentation, and Probes', in B. Bhushan (ed.) *Nanotribology and Nanomechanics: An Introduction*. Cham: Springer International Publishing, pp. 33–93. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51433-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51433-8_2).
- Bian, K. *et al.* (2021a) 'Scanning probe microscopy', *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), p. 36. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00033-2>.
- Bian, K. *et al.* (2021b) 'Scanning probe microscopy', *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), pp. 1–29. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00033-2>.
- Biessels, G.J. and Despa, F. (2018a) 'Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications', *Nature reviews. Endocrinology*, 14(10), pp. 591–604. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0048-7>.
- Biessels, G.J. and Despa, F. (2018b) 'Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications', *Nature Reviews. Endocrinology*, 14(10), pp. 591–604. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0048-7>.
- Binnig, G. *et al.* (1982) 'Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy', *Physical Review Letters*, 49(1), pp. 57–61. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.49.57>.
- Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, Ch. (1986a) 'Atomic Force Microscope', *Physical Review Letters*, 56(9), pp. 930–933. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, Ch. (1986b) 'Atomic Force Microscope', *Physical Review Letters*, 56(9), pp. 930–933. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- Binnig, G. and Rohrer, H. (1983) 'Scanning tunneling microscopy', *Surface Science*, 126(1), pp. 236–244. Available at: [https://doi.org/10.1016/0039-6028\(83\)90716-1](https://doi.org/10.1016/0039-6028(83)90716-1).
- Biswas, S. and Chakrabarti, S. (2019) 'Increased Extracellular Matrix Protein Production in Chronic Diabetic Complications: Implications of Non-Coding RNAs', *Non-Coding RNA*, 5(1), p. 30. Available at: <https://doi.org/10.3390/ncrna5010030>.

- Blennow, K. *et al.* (2010) ‘Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease’, *Nature Reviews. Neurology*, 6(3), pp. 131–144. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.4>.
- Bloemendaal, M. *et al.* (2018a) ‘Neuro-Cognitive Effects of Acute Tyrosine Administration on Reactive and Proactive Response Inhibition in Healthy Older Adults’, *eNeuro*, 5(2), p. ENEURO.0035-17.2018. Available at: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0035-17.2018>.
- Bloemendaal, M. *et al.* (2018b) ‘Neuro-Cognitive Effects of Acute Tyrosine Administration on Reactive and Proactive Response Inhibition in Healthy Older Adults’, *eNeuro*, 5(2), p. ENEURO.0035-17.2018. Available at: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0035-17.2018>.
- Bouchonville, N. *et al.* (2016) ‘AFM mapping of the elastic properties of brain tissue reveals kPa  $\mu\text{m}^{-1}$  gradients of rigidity’, *Soft Matter*, 12(29), pp. 6232–6239. Available at: <https://doi.org/10.1039/C6SM00582A>.
- Brown, S.C. (2018) ‘Physicochemical Characterization: From Molecules to Particles’, in *Physico-Chemical Properties of Nanomaterials*. Jenny Stanford Publishing.
- Bruce-Keller, A.J., Keller, J.N. and Morrison, C.D. (2009) ‘Obesity and vulnerability of the CNS’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(5), pp. 395–400. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.004>.
- Bruhn, H. *et al.* (2006) ‘Dissection of the mechanisms of cytolytic and antibacterial activity of lysenin, a defence protein of the annelid *Eisenia fetida*’, *Developmental & Comparative Immunology*, 30(7), pp. 597–606. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.09.002>.
- Busnel, F. *et al.* (2007) ‘An AFM study of the effect of chemical treatments on the surface microstructure and adhesion properties of flax fibres’, *Composite Interfaces*, 14. Available at: <https://doi.org/10.1163/156855407782106537>.
- Bussetti, G. *et al.* (2023) ‘A Combined Raman Spectroscopy and Atomic Force Microscopy System for In Situ and Real-Time Measures in Electrochemical Cells’, *Materials*, 16(6), p. 2239. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma16062239>.
- Butt, H.J., Cappella, B. and Kappl, M. (2005) ‘Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications’, *Surface Science Reports*, 59(1–6), pp. 1–152. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>.
- Butt, H.-J., Cappella, B. and Kappl, M. (2005) ‘Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications’, *Surface Science Reports*, 59(1), pp. 1–152. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>.
- Cao, D. *et al.* (2021) ‘Advances in Atomic Force Microscopy: Imaging of Two- and Three-Dimensional Interfacial Water’, *Frontiers in Chemistry*, 9, p. 745446. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.745446>.
- Cardoso-Lima, R. *et al.* (2021) ‘SARS-CoV-2 Unrevealed: Ultrastructural and Nanomechanical Analysis’, *Langmuir*, p. acs.langmuir.1c01488. Available at: <https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.1C01488>.
- Cardoso-Lima, R. *et al.* (2022) ‘Nanomechanical and Vibrational Signature of Chikungunya Viral Particles’, *Viruses*, 14(12), p. 2821. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14122821>.

Carvalho, C. and Moreira, P.I. (2023) 'Metabolic defects shared by Alzheimer's disease and diabetes: A focus on mitochondria', *Current Opinion in Neurobiology*, 79, p. 102694. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102694>.

Casuso, I., Redondo-Morata, L. and Rico, F. (2020) 'Biological physics by high-speed atomic force microscopy', *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 378(2186), p. 20190604. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0604>.

Celis-Morales, C.A. *et al.* (2022) 'Type 2 Diabetes, Glycemic Control, and Their Association With Dementia and Its Major Subtypes: Findings From the Swedish National Diabetes Register', *Diabetes Care*, 45(3), pp. 634–641. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc21-0601>.

Cermenati, G. *et al.* (2017a) 'Diabetes alters myelin lipid profile in rat cerebral cortex: Protective effects of dihydroprogesterone', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 168, pp. 60–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.02.002>.

Cermenati, G. *et al.* (2017b) 'Diabetes alters myelin lipid profile in rat cerebral cortex: Protective effects of dihydroprogesterone', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 168, pp. 60–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.02.002>.

Chang, K.-C. *et al.* (2012) 'Atomic force microscopy in biology and biomedicine', *Tzu Chi Medical Journal*, 24(4), pp. 162–169. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2012.08.002>.

Chatterjee, S. *et al.* (2016) 'Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia', *Diabetes Care*, 39(2), pp. 300–307. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc15-1588>.

Chen, P. *et al.* (2009a) 'Raman signature from brain hippocampus could aid Alzheimer's disease diagnosis', *Applied Optics*, 48(24), pp. 4743–4748. Available at: <https://doi.org/10.1364/AO.48.004743>.

Chen, P. *et al.* (2009b) 'Raman signature from brain hippocampus could aid Alzheimer's disease diagnosis', *Applied Optics*, 48(24), pp. 4743–4748. Available at: <https://doi.org/10.1364/ao.48.004743>.

Chen, Q. *et al.* (2012) 'Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF', *Neurochemistry International*, 60(3), pp. 233–242. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.013>.

Chen, X. *et al.* (2003) 'Shikonin, a Component of Chinese Herbal Medicine, Inhibits Chemokine Receptor Function and Suppresses Human Immunodeficiency Virus Type 1', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), pp. 2810–2816. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2810-2816.2003>.

Chowdhury, S.R. and Lu, H.P. (2019) 'Spontaneous Rupture and Entanglement of Human Neuronal Tau Protein Induced by Piconewton Compressive Force', *ACS Chemical*

*Neuroscience*, 10(9), pp. 4061–4067. Available at:  
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00295>.

Cohen, T.J. *et al.* (2011) ‘The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation’, *Nature Communications*, 2, p. 252. Available at:  
<https://doi.org/10.1038/ncomms1255>.

Crewe, A.V. (1974) ‘Scanning transmission electron microscopy’, *Journal of Microscopy*, 100(3), pp. 247–259. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1974.tb03937.x>.

Cripps, D. *et al.* (2006) ‘Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation’, *The Journal of Biological Chemistry*, 281(16), pp. 10825–10838. Available at:  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M512786200>.

Czamara, K. *et al.* (2015) ‘Raman spectroscopy of lipids: A review’, *Journal of Raman Spectroscopy*, 46(1), pp. 4–20. Available at: <https://doi.org/10.1002/jrs.4607>.

Daneman, D. (2006) ‘Type 1 diabetes’, *The Lancet*, 367(9513), pp. 847–858. Available at:  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68341-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68341-4).

Dash, P.K. *et al.* (2016) ‘Traumatic Brain Injury Alters Methionine Metabolism: Implications for Pathophysiology’, *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10. Available at:  
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2016.00036>.

Davies, M.J. *et al.* (2018) ‘Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)’, *Diabetes Care*, 41(12), pp. 2669–2701. Available at: <https://doi.org/10.2337/dci18-0033>.

Dazzi, A. *et al.* (2012) ‘AFM–IR: Combining Atomic Force Microscopy and Infrared Spectroscopy for Nanoscale Chemical Characterization’, *Applied Spectroscopy*, 66(12), pp. 1365–1384. Available at: <https://doi.org/10.1366/12-06804>.

De Felice, F.G. and Ferreira, S.T. (2014a) ‘Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease’, *Diabetes*, 63(7), pp. 2262–2272. Available at:  
<https://doi.org/10.2337/db13-1954>.

De Felice, F.G. and Ferreira, S.T. (2014b) ‘Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease’, *Diabetes*, 63(7), pp. 2262–2272. Available at:  
<https://doi.org/10.2337/db13-1954>.

Derjaguin, B.V., Muller, V.M. and Toporov, Yu.P. (1975a) ‘Effect of contact deformations on the adhesion of particles’, *Journal of Colloid and Interface Science*, 53(2), pp. 314–326. Available at: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(75\)90018-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(75)90018-1).

Derjaguin, B.V., Muller, V.M. and Toporov, Yu.P. (1975b) ‘Effect of contact deformations on the adhesion of particles’, *Journal of Colloid and Interface Science*, 53(2), pp. 314–326. Available at: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(75\)90018-1](https://doi.org/10.1016/0021-9797(75)90018-1).

*Diabetes* (no date). Available at: <https://www.who.int/health-topics/diabetes> (Accessed: 23 March 2024).

‘Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus’ (2010) *Diabetes Care*, 33(Suppl 1), pp. S62–S69. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>.

Dias Rates, E.R. *et al.* (2024a) ‘Evaluation of biophysical alterations in the epithelial and endothelial layer of patients with Bullous Keratopathy’, *Experimental Eye Research*, 240, p. 109791. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109791>.

Dias Rates, E.R. *et al.* (2024b) ‘Evaluation of biophysical alterations in the epithelial and endothelial layer of patients with Bullous Keratopathy’, *Experimental Eye Research*, 240, p. 109791. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109791>.

Dias Rates, E.R. *et al.* (2024c) ‘Evaluation of biophysical alterations in the epithelial and endothelial layer of patients with Bullous Keratopathy’, *Experimental Eye Research*, 240, p. 109791. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109791>.

Diaspro, A. and Bianchini, P. (2020) ‘Optical nanoscopy’, *La Rivista del Nuovo Cimento*, 43(8), pp. 385–455. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40766-020-00008-1>.

Dimitriadis, E.K. *et al.* (2002) ‘Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope’, *Biophysical Journal*, 82(5), pp. 2798–2810. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75620-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75620-8).

Diniz Filho, J.F.S. *et al.* (2023) ‘Ultrastructural Analysis of Cancer Cells Treated with the Radiopharmaceutical Radium Dichloride ([<sup>223</sup>Ra]RaCl<sub>2</sub>): Understanding the Effect on Cell Structure’, *Cells*, 12(3), p. 451. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells12030451>.

Dokukin, M.E. and Sokolov, I. (2012) ‘Quantitative Mapping of the Elastic Modulus of Soft Materials with HarmoniX and PeakForce QNM AFM Modes’, *Langmuir*, 28(46), pp. 16060–16071. Available at: <https://doi.org/10.1021/la302706b>.

Dos Santos Ferreira, O. *et al.* (2010) ‘Adhesion experiments using an AFM—Parameters of influence’, *Applied Surface Science*, 257(1), pp. 48–55. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.06.031>.

Drake, B. *et al.* (1989) ‘Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope’, *Science (New York, N.Y.)*, 243(4898), pp. 1586–1589. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.2928794>.

Drelich, J. and Mittal, K.L. (eds) (2005) *Atomic Force Microscopy in Adhesion Studies*. London: CRC Press. Available at: <https://doi.org/10.1201/b12164>.

Dufrêne, Y.F. (2008) ‘Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells’, *Nature Protocols*, 3(7), pp. 1132–1138. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.101>.

Dufrêne, Y.F. *et al.* (2017) ‘Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology’, *Nature Nanotechnology*, 12(4), pp. 295–307. Available at: <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.45>.

Dun, C. *et al.* (2016) ‘Effects of Astragalus polysaccharides on memory impairment in a diabetic rat model’, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12, pp. 1617–1621. Available at: <https://doi.org/10.2147/NDT.S106123>.

Dzedzickis, A. *et al.* (2023a) ‘Characteristics and Functionality of Cantilevers and Scanners in Atomic Force Microscopy’, *Materials*, 16(19), p. 6379. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma16196379>.

Dzedzickis, A. *et al.* (2023b) ‘Characteristics and Functionality of Cantilevers and Scanners in Atomic Force Microscopy’, *Materials*, 16(19), p. 6379. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma16196379>.

Dzyaloshinskii, I.E. *et al.* (1992) ‘The general theory of van der Waals forces’, in L.P. Pitaevski (ed.) *Perspectives in Theoretical Physics*. Amsterdam: Pergamon, pp. 443–492. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-036364-6.50039-9>.

Ebner, A., Wildling, L. and Gruber, H.J. (2019) ‘Functionalization of AFM Tips and Supports for Molecular Recognition Force Spectroscopy and Recognition Imaging’, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1886, pp. 117–151. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8894-5_7).

Elkin, B.S., Ilankovan, A. and Morrison, B. (2010) ‘Age-dependent regional mechanical properties of the rat hippocampus and cortex’, *Journal of Biomechanical Engineering*, 132(1), p. 011010. Available at: <https://doi.org/10.1115/1.4000164>.

Ennaceur, A. and Meliani, K. (1992) ‘A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory’, *Behavioural Brain Research*, 51(1), pp. 83–92. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(05\)80315-8](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(05)80315-8).

Esmaili, S. *et al.* (2020) ‘Pyridine-2,3-dicarboxylate, quinolinic acid, induces 1N4R Tau amyloid aggregation in vitro: Another evidence for the detrimental effect of the inescapable endogenous neurotoxin’, *Chemico-Biological Interactions*, 315, p. 108884. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108884>.

Fan, X. *et al.* (2022) ‘Tau Acts in Concert With Kinase/Phosphatase Underlying Synaptic Dysfunction’, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, p. 908881. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.908881>.

Farniev, V.M. *et al.* (2022) ‘Nanomechanical and Morphological AFM Mapping of Normal Tissues and Tumors on Live Brain Slices Using Specially Designed Embedding Matrix and Laser-Shaped Cantilevers’, *Biomedicines*, 10(7), p. 1742. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071742>.

Feinkohl, I. *et al.* (2015) ‘The impact of diabetes on cognitive decline: potential vascular, metabolic, and psychosocial risk factors’, *Alzheimer’s Research & Therapy*, 7(1), p. 46. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0130-5>.

Ferraro, J.R. and Nakamoto, K. (2012) *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press.

Ferraro, J.R., Nakamoto, K. and Brown, C.W. (2003) *Introductory Raman spectroscopy*. 2nd ed. Amsterdam Boston: Academic Press.

Fichman, Y. *et al.* (2015) ‘Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation’, *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 90(4), pp. 1065–1099. Available at: <https://doi.org/10.1111/brv.12146>.

- Filho, D. and Silva, J.F. (2024) 'Análise vibracional e ultraestrutural de células e tecidos cancerígenos'. Available at: <http://tedebc.ufma.br:8080/jspui/handle/tede/5436> (Accessed: 7 January 2025).
- Flister, K.F.T. *et al.* (2018) 'Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 62, pp. 155–166. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.007>.
- Flux, M.C. and Lowry, C.A. (2020) 'Finding intestinal fortitude: Integrating the microbiome into a holistic view of depression mechanisms, treatment, and resilience', *Neurobiology of Disease*, 135, p. 104578. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104578>.
- Fuhs, T. *et al.* (2023) 'Combining atomic force microscopy and fluorescence-based techniques to explore mechanical properties of naive and ischemia-affected brain regions in mice', *Scientific Reports*, 13(1), p. 12774. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39277-1>.
- Fujii, Y. *et al.* (2019) 'Spontaneous Spatial Correlation of Elastic Modulus in Jammed Epithelial Monolayers Observed by AFM', *Biophysical Journal*, 116(6), pp. 1152–1158. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.01.037>.
- Fujimoto, H. and Oshima, T. (2008) 'Nanoscale servo control of contact-mode AFM with surface topography learning observer', in *2008 10th IEEE International Workshop on Advanced Motion Control. 2008 10th IEEE International Workshop on Advanced Motion Control*, pp. 568–573. Available at: <https://doi.org/10.1109/AMC.2008.4516129>.
- Gadhav, D.G. *et al.* (2024) 'Neurodegenerative disorders: Mechanisms of degeneration and therapeutic approaches with their clinical relevance', *Ageing Research Reviews*, 99, p. 102357. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102357>.
- Ganser, C. *et al.* (2018) 'Combining adhesive contact mechanics with a viscoelastic material model to probe local material properties by AFM', *Soft Matter*, 14(1), pp. 140–150. Available at: <https://doi.org/10.1039/C7SM02057K>.
- Gao, Q. *et al.* (2019) 'Dynamic effect of beta-amyloid 42 on cell mechanics', *Journal of Biomechanics*, 86, pp. 79–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2019.01.046>.
- Garcia, P.D., Guerrero, C.R. and Garcia, R. (2020) 'Nanorheology of living cells measured by AFM-based force–distance curves', *Nanoscale*, 12(16), pp. 9133–9143. Available at: <https://doi.org/10.1039/C9NR10316C>.
- Garcia, R. (2020) 'Nanomechanical mapping of soft materials with the atomic force microscope: methods, theory and applications', *Chemical Society Reviews*, 49(16), pp. 5850–5884. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0CS00318B>.
- Gardner, R.S. *et al.* (2020) 'Aging is not equal across memory systems', *Neurobiology of Learning and Memory*, 172, p. 107232. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107232>.
- Gojnic, M. *et al.* (2022) 'Maternal and Fetal Outcomes among Pregnant Women with Diabetes', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(6), p. 3684. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph19063684>.

- Goldmann, W.H. *et al.* (1996) 'Vinculin, talin and focal adhesions', *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 17(1), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00140319>.
- Grillo, C.A. *et al.* (2005) 'Immunocytochemical analysis of synaptic proteins provides new insights into diabetes-mediated plasticity in the rat hippocampus', *Neuroscience*, 136(2), pp. 477–486. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.019>.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., *et al.* (1986) 'Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), pp. 4913–4917. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., *et al.* (1986) 'Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments', *The Journal of Biological Chemistry*, 261(13), pp. 6084–6089.
- Gudala, K. *et al.* (2013) 'Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies', *Journal of Diabetes Investigation*, 4(6), pp. 640–650. Available at: <https://doi.org/10.1111/jdi.12087>.
- Guerrero-Romero, F. *et al.* (2010) 'The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(7), pp. 3347–3351. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0288>.
- Gupta, M. *et al.* (2022) 'Molecular mechanisms underlying hyperglycemia associated cognitive decline', *IBRO Neuroscience Reports*, 14, pp. 57–63. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.12.006>.
- Gupta, M. *et al.* (2023) 'Molecular mechanisms underlying hyperglycemia associated cognitive decline', *IBRO neuroscience reports*, 14, pp. 57–63. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.12.006>.
- Gustavsson, A. *et al.* (2023) 'Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum', *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 19(2), pp. 658–670. Available at: <https://doi.org/10.1002/alz.12694>.
- Gwyddion user guide* (no date). Available at: <http://gwyddion.net/documentation/user-guide-en/> (Accessed: 11 August 2024).
- Hanyu, H. (2019) 'Diabetes-Related Dementia', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1128, pp. 147–160. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3540-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3540-2_8).
- Harapan, H. *et al.* (2021) 'Covid-19 and dengue: Double punches for dengue-endemic countries in Asia', *Reviews in Medical Virology*, 31(2), p. e2161. Available at: <https://doi.org/10.1002/rmv.2161>.
- Harrison, A.J., Corti, D.S. and Beaudoin, S.P. (2015) 'Capillary Forces in Nanoparticle Adhesion: A Review of AFM Methods', *Particulate Science and Technology*, 33(5), pp. 526–538. Available at: <https://doi.org/10.1080/02726351.2015.1045641>.
- Hashimoto, K. *et al.* (2018) 'Discrimination analysis of excitatory and inhibitory neurons using Raman spectroscopy', *Analyst*, 143(12), pp. 2889–2894. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8AN00051D>.

Heath, G.R. and Scheuring, S. (2019) ‘Advances in high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) reveal dynamics of transmembrane channels and transporters’, *Current opinion in structural biology*, 57, pp. 93–102. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.008>.

Heneka, M.T. *et al.* (2015) ‘Neuroinflammation in Alzheimer’s disease’, *The Lancet. Neurology*, 14(4), pp. 388–405. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5).

Hermanowicz, P. (2021) ‘Determination of Young’s modulus of samples of arbitrary thickness from force distance curves: numerical investigations and simple approximate formulae’, *International Journal of Mechanical Sciences*, 193, p. 106138. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijmecsci.2020.106138>.

Hertz, H. (1882) ‘Ueber die Berührung fester elastischer Körper.’, *Journal für die reine und angewandte Mathematik*, 92, pp. 156–171.

Höglinger, G.U., Respondek, G. and Kovacs, G.G. (2018) ‘New classification of tauopathies’, *Revue Neurologique*, 174(9), pp. 664–668. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.07.001>.

Hollenbeck, C.B. (2012) ‘An introduction to the nutrition and metabolism of choline’, *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 12(2), pp. 100–113. Available at: <https://doi.org/10.2174/187152412800792689>.

Holt, R.I.G. *et al.* (2021) ‘The management of type 1 diabetes in adults. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)’, *Diabetologia*, 64(12), pp. 2609–2652. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05568-3>.

Home *et al.* (no date) ‘Resources | IDF Diabetes Atlas’. Available at: <https://diabetesatlas.org/resources/> (Accessed: 7 January 2025).

Home | *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (2024). Available at: <https://www.ninds.nih.gov/> (Accessed: 31 July 2024).

Horvath, T.L. *et al.* (2010) ‘Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), pp. 14875–14880. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1004282107>.

Howell, N.K. *et al.* (1999) ‘Raman Spectral Analysis in the C–H Stretching Region of Proteins and Amino Acids for Investigation of Hydrophobic Interactions’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), pp. 924–933. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf981074l>.

Huang, C.-C. and Isidoro, C. (2017) ‘Raman Spectrometric Detection Methods for Early and Non-Invasive Diagnosis of Alzheimer’s Disease’, *Journal of Alzheimer’s disease: JAD*, 57(4), pp. 1145–1156. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-161238>.

Huang, N. *et al.* (2011) ‘Full range characterization of the Raman spectra of organs in a murine model’, *Optics Express*, 19(23), pp. 22892–22909. Available at: <https://doi.org/10.1364/OE.19.022892>.

- Hugel, T. and Seitz, M. (2001) 'The Study of Molecular Interactions by AFM Force Spectroscopy', *Macromolecular Rapid Communications*, 22(13), pp. 989–1016. Available at: [https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20010901\)22:13<989::AID-MARC989>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1521-3927(20010901)22:13<989::AID-MARC989>3.0.CO;2-D).
- Ibach, H. (2006) *Physics of Surfaces and Interfaces*. Springer Science & Business Media.
- IBGE: pelo menos uma doença crônica afetou 52% dos adultos em 2019 (2020) Agência Brasil. Available at: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2020-11/ibge-pelo-menos-uma-doenca-cronica-afetou-52-dos-adultos-em-2019> (Accessed: 7 January 2025).
- Ihnatouski, M. *et al.* (2020) 'AFM-Based Method for Measurement of Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage Surface Roughness', *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(10), p. 2302. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma13102302>.
- Irwin, D.J. (2016) 'Tauopathies as clinicopathological entities', *Parkinsonism & Related Disorders*, 22, pp. S29–S33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.020>.
- Israelachvili, J.N. (no date) 'Intermolecular and Surface Forces'.
- Janoutová, J. *et al.* (2022) 'Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A review', *Central European Journal of Public Health*, 30(3), pp. 139–143. Available at: <https://doi.org/10.21101/cejph.a7238>.
- Janson, J. *et al.* (2004) 'Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease', *Diabetes*, 53(2), pp. 474–481. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2.474>.
- Jarosz-Griffiths, H.H. *et al.* (2016) 'Amyloid- $\beta$  Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein', *The Journal of Biological Chemistry*, 291(7), pp. 3174–3183. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.702704>.
- Ji, Y. *et al.* (2020) 'DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components', *ACS Omega*, 5(15), pp. 8572–8578. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04421>.
- Johnson, K.L. (1987) *Contact Mechanics*. Cambridge University Press.
- Johnson, K.L., Kendall, K. and Roberts, A.D. (1971) 'Surface Energy and the Contact of Elastic Solids', *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 324(1558), pp. 301–313.
- Jucker, M. and Walker, L.C. (2013) 'Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases', *Nature*, 501(7465), pp. 45–51. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature12481>.
- Kao, C.-L. *et al.* (2005) 'Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health', *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 38(1), pp. 5–16.
- Karpha, K. *et al.* (2022) 'Factors affecting depression and anxiety in diabetic patients: A cross sectional study from a tertiary care hospital in Eastern India', *Annals of Medicine and Surgery*, 84, p. 104945. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104945>.

- Karvani, M. *et al.* (2019) ‘Neurocognitive impairment in type 2 diabetes mellitus’, *Hormones (Athens, Greece)*, 18(4), pp. 523–534. Available at: <https://doi.org/10.1007/s42000-019-00128-2>.
- Kasas, S. and Dietler, G. (2008) ‘Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells’, *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 456(1), pp. 13–27. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0448-y>.
- Kaze, A.D. *et al.* (2021) ‘Metabolic Dyslipidemia and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes Mellitus: Findings From the Look AHEAD Study’, *Journal of the American Heart Association*, 10(7), p. e016947. Available at: <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016947>.
- Kent, S.A., Spires-Jones, T.L. and Durrant, C.S. (2020) ‘The physiological roles of tau and A $\beta$ : implications for Alzheimer’s disease pathology and therapeutics’, *Acta Neuropathologica*, 140(4), pp. 417–447. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02196-w>.
- Kereliuk, S.M., Brawerman, G.M. and Dolinsky, V.W. (2017) ‘Maternal Macronutrient Consumption and the Developmental Origins of Metabolic Disease in the Offspring’, *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), p. 1451. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms18071451>.
- Keresztury, G. (2001) ‘Raman Spectroscopy: Theory’, in J.M. Chalmers and P.R. Griffiths (eds) *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. 1st edn. Wiley. Available at: <https://doi.org/10.1002/0470027320.s0109>.
- Kihan Park, *et al.* (2019) ‘Viscoelastic Properties of Human Autopsy Brain Tissues as Biomarkers for Alzheimer’s Diseases’, *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 66(6), pp. 1705–1713. Available at: <https://doi.org/10.1109/TBME.2018.2878555>.
- Kim, J.W. *et al.* (2019) ‘Methionine-Choline Deprivation Impairs Adult Hippocampal Neurogenesis in C57BL/6 Mice’, *Journal of Medicinal Food*, 22(4), pp. 344–354. Available at: <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.4247>.
- Kimura, T. *et al.* (2014) ‘Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus’, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1633), p. 20130144. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144>.
- Kiracofe, D., Raman, A. and Yablon, D. (2013) ‘Multiple regimes of operation in bimodal AFM: understanding the energy of cantilever eigenmodes’, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 4(1), pp. 385–393. Available at: <https://doi.org/10.3762/bjnano.4.45>.
- Knops, J. *et al.* (1991) ‘Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes’, *The Journal of Cell Biology*, 114(4), pp. 725–733. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.114.4.725>.
- Kocun, M. *et al.* (2017) ‘Fast, High Resolution, and Wide Modulus Range Nanomechanical Mapping with Bimodal Tapping Mode’, *ACS Nano*, 11(10), pp. 10097–10105. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04530>.
- Kontomaris, S.V., Malamou, A. and Stylianou, A. (2022) ‘The Hertzian theory in AFM nanoindentation experiments regarding biological samples: Overcoming limitations in data

processing', *Micron*, 155, p. 103228. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2022.103228>.

Kopec, M. *et al.* (2024) 'Metabolism changes caused by glucose in normal and cancer human brain cell lines by Raman imaging and chemometric methods', *Scientific Reports*, 14(1), p. 16626. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67718-y>.

Kristi, N. *et al.* (2020) 'Atomic Force Microscopy in Mechanoimmunology Analysis: A New Perspective for Cancer Immunotherapy', *Biotechnology Journal*, 15(8), p. 1900559. Available at: <https://doi.org/10.1002/biot.201900559>.

Kumari, R. *et al.* (2020) 'Amyloid aggregates of the deubiquitinase OTUB1 are neurotoxic, suggesting that they contribute to the development of Parkinson's disease', *The Journal of Biological Chemistry*, 295(11), pp. 3466–3484. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009546>.

Lampthey, R.N.L. *et al.* (2022) 'A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), p. 1851. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>.

Langerak, T. *et al.* (2019) 'The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis', *PLoS pathogens*, 15(4), p. e1007640. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007640>.

Larkin, P. (2011) *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier.

Larsson, K. and Rand, R.P. (1973) 'Detection of changes in the environment of hydrocarbon chains by raman spectroscopy and its application to lipid-protein systems', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 326(2), pp. 245–255. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(73\)90250-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(73)90250-6).

Last, J.A. *et al.* (2010) 'The Applications of Atomic Force Microscopy to Vision Science', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(12), pp. 6083–6094. Available at: <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5470>.

Ledesma, M.D. *et al.* (1994) 'Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments', *The Journal of Biological Chemistry*, 269(34), pp. 21614–21619.

Lei, P. *et al.* (2014) 'Motor and cognitive deficits in aged tau knockout mice in two background strains', *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), p. 29. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-29>.

Lekka, M. *et al.* (1999) 'Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy', *European biophysics journal: EBJ*, 28(4), pp. 312–316. Available at: <https://doi.org/10.1007/s002490050213>.

Lenhard, J., Stephan, S. and Hasse, H. (2024) 'On the History of the Lennard-Jones Potential', *Annalen der Physik*, 536(6), p. 2400115. Available at: <https://doi.org/10.1002/andp.202400115>.

- Li, M., Xi, N. and Liu, L. (2021) 'Peak force tapping atomic force microscopy for advancing cell and molecular biology', *Nanoscale*, 13(18), pp. 8358–8375. Available at: <https://doi.org/10.1039/D1NR01303C>.
- Li, Q. *et al.* (2016) 'AFM-based force spectroscopy for bioimaging and biosensing', *RSC Advances*, 6(16), pp. 12893–12912. Available at: <https://doi.org/10.1039/C5RA22841G>.
- Li, Y. *et al.* (2023) 'Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies', *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), pp. 1–29. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01400-z>.
- Lima, R.C. *et al.* (2019) 'MARCADORES DE SUPERFÍCIE PARA CÉLULAS DE LEUCEMIAS MIELOBLÁSTICAS: UMA PROPOSTA ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA', in *Blucher Biophysics Proceedings. Encontro Anual da Biofísica 2019*, Blucher Proceedings, pp. 87–90. Available at: <https://doi.org/10.5151/biofísica2019-25>.
- Litman, B.J., Lewis, E.N. and Levin, I.W. (1991) 'Packing characteristics of highly unsaturated bilayer lipids: Raman spectroscopic studies of multilamellar phosphatidylcholine dispersions', *Biochemistry*, 30(2), pp. 313–319. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi00216a001>.
- Liu, P. *et al.* (2021) 'Phenylalanine Metabolism Is Dysregulated in Human Hippocampus with Alzheimer's Disease Related Pathological Changes', *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 83(2), pp. 609–622. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-210461>.
- Liu, Q. *et al.* (2022) 'The Role of Insulin Signaling in Hippocampal-Related Diseases: A Focus on Alzheimer's Disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), p. 14417. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms232214417>.
- Liu, S. *et al.* (2024) 'Atomic force microscopy in disease-related studies: Exploring tissue and cell mechanics', *Microscopy Research and Technique*, 87(4), pp. 660–684. Available at: <https://doi.org/10.1002/jemt.24471>.
- London, F. (1930) 'Zur Theorie und Systematik der Molekularkräfte', *Zeitschrift für Physik*, 63(3), pp. 245–279. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01421741>.
- Long, D.A. (1977) *Raman Spectroscopy*. McGraw-Hill.
- Lopes, C.S. (no date) 'Atomic force microscopy: A tool for imaging, manipulating biomolecules, and quantifying single-molecule interactions in biological systems', *Fluorescence Imaging and Biological Quantification* [Preprint].
- LoPresti, P. *et al.* (1995) 'Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), pp. 10369–10373. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10369>.
- Loyola-Leyva, A. *et al.* (2020) 'Raman spectroscopy applications for the diagnosis and follow-up of type 2 diabetes mellitus. A brief review', *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 9(3–4), pp. 119–140. Available at: <https://doi.org/10.3233/BSI-200207>.
- Ma, Q.-L. *et al.* (2014) 'Loss of MAP function leads to hippocampal synapse loss and deficits in the Morris Water Maze with aging', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of*

*the Society for Neuroscience*, 34(21), pp. 7124–7136. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3439-13.2014>.

Maeda, S., Sato, Y. and Takashima, A. (2018) ‘Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome-17 mutations enhance tau oligomer formation’, *Neurobiology of Aging*, 69, pp. 26–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.04.014>.

Magariños, A.M. and McEwen, B.S. (2000) ‘Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), pp. 11056–11061. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.11056>.

Magazzù, A. and Marcuello, C. (2023) ‘Investigation of Soft Matter Nanomechanics by Atomic Force Microscopy and Optical Tweezers: A Comprehensive Review’, *Nanomaterials*, 13(6), p. 963. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano13060963>.

Makky, A. *et al.* (2020a) ‘Atomic Force Microscopy Imaging and Nanomechanical Properties of Six Tau Isoform Assemblies’, *Biophysical Journal*, 119(12), pp. 2497–2507. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.10.045>.

Makky, A. *et al.* (2020b) ‘Atomic Force Microscopy Imaging and Nanomechanical Properties of Six Tau Isoform Assemblies’, *Biophysical Journal*, 119(12), pp. 2497–2507. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.10.045>.

Mandelkow, E. *et al.* (2007) ‘Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer’s disease’, *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 17(1), pp. 83–90. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00053.x>.

Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (2012) ‘Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration’, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), p. a006247. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>.

Mankhong, S. *et al.* (2020) ‘Experimental Models of Sarcopenia: Bridging Molecular Mechanism and Therapeutic Strategy’, *Cells*, 9(6), p. 1385. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9061385>.

Margenau, H. (1939) ‘Van der waals forces’, *Reviews of Modern Physics*, 11(1), pp. 1–35. Available at: <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.11.1>.

Marrese, M., Guarino, V. and Ambrosio, L. (2017) ‘Atomic Force Microscopy: A Powerful Tool to Address Scaffold Design in Tissue Engineering’, *Journal of Functional Biomaterials*, 8(1), p. 7. Available at: <https://doi.org/10.3390/jfb8010007>.

Marzelli, M.J. *et al.* (2014) ‘Neuroanatomical Correlates of Dysglycemia in Young Children With Type 1 Diabetes’, *Diabetes*, 63(1), pp. 343–353. Available at: <https://doi.org/10.2337/db13-0179>.

Matsunaga, Y. *et al.* (2016) ‘Impairment of synaptic development in the hippocampus of diabetic Goto-Kakizaki rats’, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 53, pp. 58–67. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.07.004>.

Matthews, D.R. *et al.* (1985) ‘Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man’, *Diabetologia*, 28(7), pp. 412–419. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00280883>.

McCreery, R.L. (2005) *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. John Wiley & Sons.

McQuarrie, D.A. and Simon, J.D. (1997) *Physical Chemistry: A Molecular Approach*. University Science Books.

Medeiros Guasque De Mesquita, T. (2003) *ESTATÍSTICA DO GANHO DEPENDENTE DA POLARIZAÇÃO EM SISTEMAS ÓPTICOS COM AMPLIFICAÇÃO RAMAN*. MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA ELÉTRICA. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO DE JANEIRO. Available at: <https://doi.org/10.17771/PUCRio.acad.4632>.

Menal, M.J. *et al.* (2018) ‘Alzheimer’s Disease Mutant Mice Exhibit Reduced Brain Tissue Stiffness Compared to Wild-type Mice in both Normoxia and following Intermittent Hypoxia Mimicking Sleep Apnea’, *Frontiers in Neurology*, 9, p. 1. Available at: <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00001>.

Mendová, K. *et al.* (2024) ‘Size Matters: Rethinking Hertz Model Interpretation for Cell Mechanics Using AFM’, *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), p. 7186. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms25137186>.

Mennenga, S.E. *et al.* (2015) ‘Harmine treatment enhances short-term memory in old rats: Dissociation of cognition and the ability to perform the procedural requirements of maze testing’, *Physiology & Behavior*, 138, pp. 260–265. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.09.001>.

Michailidis, M. *et al.* (2022) ‘Alzheimer’s Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer’s Disease and Type 2 Diabetes’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), p. 2687. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23052687>.

Misiura, M. and Milyk, W. (2019) ‘Proline-containing peptides—New insight and implications: A Review’, *BioFactors*, 45(6), pp. 857–866. Available at: <https://doi.org/10.1002/biof.1554>.

Mohamed-Mohamed, H. *et al.* (2023) ‘Physiological Mechanisms Inherent to Diabetes Involved in the Development of Dementia: Alzheimer’s Disease’, *Neurology International*, 15(4), pp. 1253–1272. Available at: <https://doi.org/10.3390/neurolint15040079>.

de la Monte, S.M., Tong, M. and Wands, J.R. (2018) ‘The 20-Year Voyage Aboard the Journal of Alzheimer’s Disease: Docking at “Type 3 Diabetes”, Environmental/Exposure Factors, Pathogenic Mechanisms, and Potential Treatments’, *Journal of Alzheimer’s disease: JAD*, 62(3), pp. 1381–1390. Available at: <https://doi.org/10.3233/JAD-170829>.

Moran, C. *et al.* (2022) ‘New Horizons-Cognitive Dysfunction Associated With Type 2 Diabetes’, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 107(4), pp. 929–942. Available at: <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab797>.

Morris, R. (1984) ‘Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat’, *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), pp. 47–60. Available at: [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).

Movasaghi, Z., Rehman, S. and Rehman, I.U. (2007) ‘Raman Spectroscopy of Biological Tissues’, *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5), pp. 493–541. Available at: <https://doi.org/10.1080/05704920701551530>.

Muriach, M. *et al.* (2014) ‘Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy’, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, p. 102158. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/102158>.

Nagar, S.D. *et al.* (2022) ‘Investigation of hypertension and type 2 diabetes as risk factors for dementia in the All of Us cohort’, *Scientific Reports*, 12(1), p. 19797. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23353-z>.

Nagy, G. *et al.* (2022) ‘New therapeutic approaches for type 1 diabetes: Disease-modifying therapies’, *World Journal of Diabetes*, 13(10), pp. 835–850. Available at: <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i10.835>.

Nam, W. and Epureanu, B.I. (2017) ‘Dynamic model for kinesin-mediated long-range transport and its local traffic jam caused by tau proteins’, *Physical Review. E*, 95(1–1), p. 012405. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.95.012405>.

Nandi, T. and Ainavarapu, S.R.K. (2021) ‘Applications of atomic force microscopy in modern biology’, *Emerging Topics in Life Sciences*, 5(1), pp. 103–111. Available at: <https://doi.org/10.1042/ETLS20200255>.

do Nascimento Amorim, M. do S. *et al.* (2024) ‘Atomic Force Microscopy Applied to the Study of Tauopathies’, *ACS Chemical Neuroscience*, 15(4), pp. 699–715. Available at: <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00819>.

Nguyen, T.T. *et al.* (2020a) ‘Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer’s Disease’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), p. 3165. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21093165>.

Nguyen, T.T. *et al.* (2020b) ‘Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer’s Disease’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), p. 3165. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21093165>.

Nosonovsky, M. and Bhushan, B. (2008a) ‘Biologically Inspired Surfaces: Broadening the Scope of Roughness\*\*’, *Advanced Functional Materials*, 18(6), pp. 843–855. Available at: <https://doi.org/10.1002/adfm.200701195>.

Nosonovsky, M. and Bhushan, B. (2008b) ‘Biologically Inspired Surfaces: Broadening the Scope of Roughness\*\*’, *Advanced Functional Materials*, 18(6), pp. 843–855. Available at: <https://doi.org/10.1002/adfm.200701195>.

Offroy, M. *et al.* (2020) ‘Fast automated processing of AFM PeakForce curves to evaluate spatially resolved Young modulus and stiffness of turgescient cells’, *RSC Advances*, 10(33), pp. 19258–19275. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0RA00669F>.

Oliveira, R.R.L.D. *et al.* (2012) ‘Measurement of the Nanoscale Roughness by Atomic Force Microscopy: Basic Principles and Applications’, in *Atomic Force Microscopy - Imaging, Measuring and Manipulating Surfaces at the Atomic Scale*. IntechOpen. Available at: <https://doi.org/10.5772/37583>.

Oliver, W.C. and Pharr, G.M. (2004) ‘Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology’, *Journal of Materials Research*, 19(1), pp. 3–20. Available at: <https://doi.org/10.1557/jmr.2004.19.1.3>.

Ong, Y.H., Lim, M. and Liu, Q. (2012) 'Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells', *Optics Express*, 20(20), pp. 22158–22171. Available at: <https://doi.org/10.1364/OE.20.022158>.

*Operation procedures of atomic force microscopy for food and biological samples* (no date). Available at: <https://ouci.dntb.gov.ua/en/works/9j6MLLZ9/> (Accessed: 17 December 2023).

Orlando, A. *et al.* (2021) 'A Comprehensive Review on Raman Spectroscopy Applications', *Chemosensors*, 9(9), p. 262. Available at: <https://doi.org/10.3390/chemosensors9090262>.

Pallas-Bazarra, N. *et al.* (2016) 'Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis', *The EMBO journal*, 35(13), pp. 1417–1436. Available at: <https://doi.org/10.15252/embj.201593518>.

Pamidi, N. and Satheesha Nayak, B.N. (2012) 'Effect of streptozotocin induced diabetes on rat hippocampus', *Bratislavske Lekarske Listy*, 113(10), pp. 583–588. Available at: [https://doi.org/10.4149/bll\\_2012\\_130](https://doi.org/10.4149/bll_2012_130).

Paraskevaidi, M. *et al.* (2018) 'Raman Spectroscopy to Diagnose Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies in Blood', *ACS chemical neuroscience*, 9(11), pp. 2786–2794. Available at: <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.8b00198>.

Park, K. *et al.* (2019) 'Viscoelastic Properties of Human Autopsy Brain Tissues as Biomarkers for Alzheimer's Diseases', *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 66(6), pp. 1705–1713. Available at: <https://doi.org/10.1109/TBME.2018.2878555>.

Park, S.-J. and Seo, M.-K. (2011a) 'Chapter 1 - Intermolecular Force', in S.-J. Park and M.-K. Seo (eds) *Interface Science and Technology*. Elsevier (Interface Science and Composites), pp. 1–57. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375049-5.00001-3>.

Park, S.-J. and Seo, M.-K. (2011b) 'Chapter 1 - Intermolecular Force', in S.-J. Park and M.-K. Seo (eds) *Interface Science and Technology*. Elsevier (Interface Science and Composites), pp. 1–57. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375049-5.00001-3>.

Parsegian, V.A. (2005) *Van der Waals Forces: A Handbook for Biologists, Chemists, Engineers, and Physicists*. Cambridge University Press.

Perini, G. *et al.* (2019) 'Dynamic structural determinants underlie the neurotoxicity of the N-terminal tau 26-44 peptide in Alzheimer's disease and other human tauopathies', *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, pp. 278–289. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.220>.

Pezzotti, G. (2021) 'Raman spectroscopy in cell biology and microbiology', *Journal of Raman Spectroscopy*, 52(12), pp. 2348–2443. Available at: <https://doi.org/10.1002/jrs.6204>.

Pilotto, A. *et al.* (2021) 'Phenylalanine Effects on Brain Function in Adult Phenylketonuria', *Neurology*, 96(3), pp. e399–e411. Available at: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000011088>.

Pinto, B.A.S. *et al.* (2022) 'Hippocampal Endoplasmic Reticulum Stress Hastens Motor and Cognitive Decline in Adult Male Rats Sustainedly Exposed to High-Sucrose Diet', *Antioxidants*, 11(7), p. 1395. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox11071395>.

*Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas e Agravos Não Transmissíveis no Brasil, 2021-2030 (Plano de Dant) — Ministério da Saúde* (no date). Available at: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt/09-plano-de-dant-2022\\_2030.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt/09-plano-de-dant-2022_2030.pdf/view) (Accessed: 7 January 2025).

Plodinec, M. *et al.* (2012) ‘The nanomechanical signature of breast cancer’, *Nature Nanotechnology*, 7(11), pp. 757–765. Available at: <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.167>.

Pratt, S.J.P., Lee, R.M. and Martin, S.S. (2020) ‘The Mechanical Microenvironment in Breast Cancer’, *Cancers*, 12(6), p. 1452. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12061452>.

Prauzner-Bechcicki, S. *et al.* (2015) ‘PDMS substrate stiffness affects the morphology and growth profiles of cancerous prostate and melanoma cells’, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 41, pp. 13–22. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.09.020>.

Qiang, L. *et al.* (2006) ‘Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin’, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(12), pp. 3120–3129. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5392-05.2006>.

Radmacher, M. (2002) ‘Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope’, *Methods in Cell Biology*, 68, pp. 67–90. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(02\)68005-7](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(02)68005-7).

Rahman, A. *et al.* (2009) ‘The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons’, *PLoS One*, 4(7), p. e6344. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006344>.

Raman, C.V. (1953) ‘A new radiation’, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*, 37(3), pp. 333–341. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF03052651>.

Raman, C.V. and Krishnan, K.S. (1928) ‘A New Type of Secondary Radiation’, *Nature*, 121(3048), pp. 501–502. Available at: <https://doi.org/10.1038/121501c0>.

Ramos, S. and Lee, J.C. (2024) ‘Raman spectroscopy in the study of amyloid formation and phase separation’, *Biochemical Society Transactions*, 52(3), pp. 1121–1130. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST20230599>.

Rates, E.R.D. *et al.* (2022a) ‘Layer-by-Layer Investigation of Ultrastructures and Biomechanics of Human Cornea’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), p. 7833. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23147833>.

Rates, E.R.D. *et al.* (2022b) ‘Layer-by-Layer Investigation of Ultrastructures and Biomechanics of Human Cornea’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), p. 7833. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23147833>.

Rebêlo, L.M. *et al.* (2014) ‘Microrheology of cells with magnetic force modulation atomic force microscopy’, *Soft Matter*, 10(13), pp. 2141–2149. Available at: <https://doi.org/10.1039/C3SM52045E>.

Rianna, C. and Radmacher, M. (2017) ‘Influence of microenvironment topography and stiffness on the mechanics and motility of normal and cancer renal cells’, *Nanoscale*, 9(31), pp. 11222–11230. Available at: <https://doi.org/10.1039/C7NR02940C>.

- Rigato, A. *et al.* (2017) 'High-frequency microrheology reveals cytoskeleton dynamics in living cells', *Nature Physics*, 13(8), pp. 771–775. Available at: <https://doi.org/10.1038/nphys4104>.
- Rivas-Arancibia, S. *et al.* (2017) 'Structural Changes of Amyloid Beta in Hippocampus of Rats Exposed to Ozone: A Raman Spectroscopy Study', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00137>.
- Roth, W. *et al.* (2021) 'Tryptophan Metabolism and Gut-Brain Homeostasis', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), p. 2973. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22062973>.
- Ruggeri, F.S. *et al.* (2015) 'Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation', *Nature communications*, 6, p. 7831. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms8831>.
- Ryan, C.M., Geckle, M.O. and Orchard, T.J. (2003) 'Cognitive efficiency declines over time in adults with Type 1 diabetes: effects of micro- and macrovascular complications', *Diabetologia*, 46(7), pp. 940–948. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1128-2>.
- Rygula, A. *et al.* (2013) 'Raman spectroscopy of proteins: a review', *Journal of Raman Spectroscopy*, 44(8), pp. 1061–1076. Available at: <https://doi.org/10.1002/jrs.4335>.
- Ryzhikova, E. *et al.* (2021) 'Raman spectroscopy and machine learning for biomedical applications: Alzheimer's disease diagnosis based on the analysis of cerebrospinal fluid', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 248, p. 119188. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119188>.
- S. Roriz-Filho, J. *et al.* (2009) '(Pre)diabetes, brain aging, and cognition', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(5), pp. 432–443. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.12.003>.
- Sadegh Hassani, S., Daraee, M. and Sobat, Z. (2021) 'Application of atomic force microscopy in adhesion force measurements', *Journal of Adhesion Science and Technology*, 35(3), pp. 221–241. Available at: <https://doi.org/10.1080/01694243.2020.1798647>.
- Salama, R.A.A. *et al.* (2024) 'Exploring Novel Treatment Modalities for Type 1 Diabetes Mellitus: Potential and Prospects', *Healthcare*, 12(15), p. 1485. Available at: <https://doi.org/10.3390/healthcare12151485>.
- Santiago, J.A. and Potashkin, J.A. (2021) 'The Impact of Disease Comorbidities in Alzheimer's Disease', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, p. 631770. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.631770>.
- Sarid, D. (1994a) *Scanning Force Microscopy: With Applications to Electric, Magnetic, and Atomic Forces*. Revised edition. New York: Oxford University Press.
- Sarid, D. (1994b) *Scanning Force Microscopy: With Applications to Electric, Magnetic, and Atomic Forces*. Oxford University Press.
- Savelieff, M.G. *et al.* (2022) 'Diabetes and dementia: Clinical perspective, innovation, knowledge gaps', *Journal of Diabetes and Its Complications*, 36(11), p. 108333. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2022.108333>.

- Schaarschmidt, F., Ritz, C. and Hothorn, L.A. (2022) 'The Tukey trend test: Multiplicity adjustment using multiple marginal models', *Biometrics*, 78(2), pp. 789–797. Available at: <https://doi.org/10.1111/biom.13442>.
- Schwerdtfeger, P. and Wales, D.J. (2024) '100 Years of the Lennard-Jones Potential', *Journal of Chemical Theory and Computation*, 20(9), pp. 3379–3405. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.4c00135>.
- Scientific Image and Illustration Software | BioRender* (no date). Available at: <https://www.biorender.com/> (Accessed: 7 January 2025).
- Self, W.K. and Holtzman, D.M. (2023) 'Emerging diagnostics and therapeutics for Alzheimer disease', *Nature Medicine*, 29(9), pp. 2187–2199. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02505-2>.
- Sexton, C. *et al.* (2022) 'Current directions in tau research: Highlights from Tau 2020', *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 18(5), pp. 988–1007. Available at: <https://doi.org/10.1002/alz.12452>.
- Shi, L., Fung, A.A. and Zhou, A. (2021) 'Advances in stimulated Raman scattering imaging for tissues and animals', *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 11(3), pp. 1078–1101. Available at: <https://doi.org/10.21037/qims-20-712>.
- Shi, Y. *et al.* (2021) 'Structure-based classification of tauopathies', *Nature*, 598(7880), pp. 359–363. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03911-7>.
- Siahaan, V. *et al.* (2019) 'Kinetically distinct phases of tau on microtubules regulate kinesin motors and severing enzymes', *Nature Cell Biology*, 21(9), pp. 1086–1092. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0374-6>.
- Siano, G. *et al.* (2019) 'Tau Modulates VGluT1 Expression', *Journal of Molecular Biology*, 431(4), pp. 873–884. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.01.023>.
- Sims-Robinson, C. *et al.* (2010) 'How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology?', *Nature Reviews. Neurology*, 6(10), pp. 551–559. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.130>.
- Smith, K.J., Deschênes, S.S. and Schmitz, N. (2018) 'Investigating the longitudinal association between diabetes and anxiety: a systematic review and meta-analysis', *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 35(6), pp. 677–693. Available at: <https://doi.org/10.1111/dme.13606>.
- Song, E.-C. *et al.* (2003) 'Hyperglycemia exacerbates brain edema and perihematomal cell death after intracerebral hemorrhage', *Stroke*, 34(9), pp. 2215–2220. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000088060.83709.2C>.
- Song, Y. *et al.* (2015) 'Accurate Calibration and Uncertainty Estimation of the Normal Spring Constant of Various AFM Cantilevers', *Sensors*, 15(3), pp. 5865–5883. Available at: <https://doi.org/10.3390/s150305865>.
- Song, Y. and Bhushan, B. (2008) 'Atomic force microscopy dynamic modes: modeling and applications', *Journal of Physics Condensed Matter*, 20, p. 225012. Available at: <https://doi.org/10.1088/0953-8984/20/22/225012>.

- Soria, F.N. *et al.* (2020) ‘Current Techniques for Investigating the Brain Extracellular Space’, *Frontiers in Neuroscience*, 14. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.570750> (Accessed: 17 December 2023).
- Sousa, R.M.L. *et al.* (2018) ‘Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats’, *Nutrition & Metabolism*, 15, p. 53. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0290-y>.
- Spillantini, M.G. and Goedert, M. (2013) ‘Tau pathology and neurodegeneration’, *The Lancet. Neurology*, 12(6), pp. 609–622. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5).
- Spinelli, M., Fusco, S. and Grassi, C. (2019) ‘Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline’, *Frontiers in Neuroscience*, 13, p. 788. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00788>.
- Srikanth, V. *et al.* (2020) ‘Type 2 diabetes and cognitive dysfunction—towards effective management of both comorbidities’, *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 8(6), pp. 535–545. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30118-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30118-2).
- Stamer, K. *et al.* (2002) ‘Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress’, *The Journal of Cell Biology*, 156(6), pp. 1051–1063. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200108057>.
- Stan, G. and King, S. (2020) ‘Atomic force microscopy for nanoscale mechanical property characterization’, *NIST* [Preprint]. Available at: <https://www.nist.gov/publications/atomic-force-microscopy-nanoscale-mechanical-property-characterization> (Accessed: 17 December 2023).
- Stanciu, G.D. *et al.* (2020) ‘Link Between Diabetes and Alzheimer’s Disease due to the Shared Amyloid Aggregation and Deposition Involving both Neurodegenerative Changes and Neurovascular Damages’, *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), p. 1713. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9061713>.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J. and van Haeften, T.W. (2005) ‘Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy’, *The Lancet*, 365(9467), pp. 1333–1346. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X).
- Sudar-Milovanovic, E. *et al.* (2022) ‘Tryptophan Metabolism in Atherosclerosis and Diabetes’, *Current Medicinal Chemistry*, 29(1), pp. 99–113. Available at: <https://doi.org/10.2174/0929867328666210714153649>.
- Sudworth, C.D. and Krasner, N. (2004) ‘Raman spectroscopy of Alzheimer’s diseased tissue’, in A. Mahadevan-Jansen *et al.* (eds). *Biomedical Optics 2004*, San Jose, CA, p. 93. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.552869>.
- Sugandh, F. *et al.* (no date) ‘Advances in the Management of Diabetes Mellitus: A Focus on Personalized Medicine’, *Cureus*, 15(8), p. e43697. Available at: <https://doi.org/10.7759/cureus.43697>.

- Sultan, A. *et al.* (2011) ‘Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection’, *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), pp. 4566–4575. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>.
- Sumbul, F. *et al.* (2020) ‘One-Step Calibration of AFM in Liquid’, *Frontiers in Physics*, 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2020.00301> (Accessed: 17 December 2023).
- ‘Surface Roughness Analysis and Measurement Techniques’ (2000) in *Modern Tribology Handbook, Two Volume Set*. CRC Press.
- Szabo, L., Eckert, A. and Grimm, A. (2020) ‘Insights into Disease-Associated Tau Impact on Mitochondria’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), p. 6344. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21176344>.
- Tahami Monfared, A.A. *et al.* (2022) ‘Alzheimer’s Disease: Epidemiology and Clinical Progression’, *Neurology and Therapy*, 11(2), pp. 553–569. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40120-022-00338-8>.
- Takeda, S. (2019) ‘Progression of Alzheimer’s disease, tau propagation, and its modifiable risk factors’, *Neuroscience Research*, 141, pp. 36–42. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.08.005>.
- Takeuchi, M. and Yamagishi, S. (2008) ‘Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer’s disease’, *Current Pharmaceutical Design*, 14(10), pp. 973–978. Available at: <https://doi.org/10.2174/138161208784139693>.
- Talbot, K. *et al.* (2012) ‘Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer’s disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline’, *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), pp. 1316–1338. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI59903>.
- Thompson, M.D. and DeBosch, B.J. (2021) ‘Maternal Fructose Diet-Induced Developmental Programming’, *Nutrients*, 13(9), p. 3278. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13093278>.
- Tortone, M. (1997) ‘Cantilevers and tips for atomic force microscopy’, *IEEE engineering in medicine and biology magazine: the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society*, 16(2), pp. 28–33. Available at: <https://doi.org/10.1109/51.582173>.
- Trepp, R. *et al.* (2020) ‘Impact of phenylalanine on cognitive, cerebral, and neurometabolic parameters in adult patients with phenylketonuria (the PICO study): a randomized, placebo-controlled, crossover, noninferiority trial’, *Trials*, 21(1), p. 178. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13063-019-4022-z>.
- Trought, M. and Perrine, K.A. (2021) ‘Investigating the Relationship between Adhesion Forces and Surface Functionalization Using Atomic Force Microscopy’, *Journal of Chemical Education*, 98(5), pp. 1768–1775. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00558>.
- Venkatramani, A. *et al.* (2022) ‘Shikonin impedes phase separation and aggregation of tau and protects SH-SY5Y cells from the toxic effects of tau oligomers’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 204, pp. 19–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.172>.

- Viji Babu, P.K. and Radmacher, M. (2019a) 'Mechanics of Brain Tissues Studied by Atomic Force Microscopy: A Perspective', *Frontiers in Neuroscience*, 13. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00600> (Accessed: 17 September 2023).
- Viji Babu, P.K. and Radmacher, M. (2019b) 'Mechanics of Brain Tissues Studied by Atomic Force Microscopy: A Perspective', *Frontiers in Neuroscience*, 13, p. 600. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00600>.
- Viljoen, A. *et al.* (2021) 'Force spectroscopy of single cells using atomic force microscopy', *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00062-x>.
- Vinckier, A. and Semenza, G. (1998) 'Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy', *FEBS Letters*, 430(1), pp. 12–16. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00592-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00592-4).
- Voigtländer, B. (2019a) *Atomic Force Microscopy*. Cham: Springer International Publishing (NanoScience and Technology). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-13654-3>.
- Voigtländer, B. (2019b) 'Atomic Force Microscopy Designs', in B. Voigtländer (ed.) *Atomic Force Microscopy*. Cham: Springer International Publishing (NanoScience and Technology), pp. 69–86. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-13654-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-13654-3_4).
- Voigtländer, B. (2019c) 'Cantilevers and Detection Methods in Atomic Force Microscopy', in B. Voigtländer (ed.) *Atomic Force Microscopy*. Cham: Springer International Publishing (NanoScience and Technology), pp. 177–197. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-13654-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-13654-3_11).
- Voigtländer, B. (2019d) 'Forces Between Tip and Sample', in B. Voigtländer (ed.) *Atomic Force Microscopy*. Cham: Springer International Publishing (NanoScience and Technology), pp. 161–176. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-13654-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-13654-3_10).
- Waals, J.D. (1988) *J.D. Van Der Waals: On the Continuity of the Gaseous and Liquid States*. North-Holland.
- Wan, W. *et al.* (2019) 'Iron Deposition Leads to Hyperphosphorylation of Tau and Disruption of Insulin Signaling', *Frontiers in Neurology*, 10, p. 607. Available at: <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00607>.
- Wang, L. *et al.* (2006) 'Abnormalities of hippocampal surface structure in very mild dementia of the Alzheimer type', *NeuroImage*, 30(1), pp. 52–60. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.09.017>.
- Wang, Y. *et al.* (2022) 'Cognitive impairments in type 1 diabetes mellitus model mice are associated with synaptic protein disorders', *Neuroscience Letters*, 777, p. 136587. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2022.136587>.
- Warshauer, J.T., Bluestone, J.A. and Anderson, M.S. (2020) 'New Frontiers in the Treatment of Type 1 Diabetes', *Cell Metabolism*, 31(1), pp. 46–61. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.017>.

- Weisenhorn, A.L. *et al.* (1993) 'Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM', *Nanotechnology*, 4(2), p. 106. Available at: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/4/2/006>.
- Williams, D.R. (2006) 'Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau', *Internal Medicine Journal*, 36(10), pp. 652–660. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2006.01153.x>.
- Wilson, D.M. *et al.* (2023) 'Hallmarks of neurodegenerative diseases', *Cell*, 186(4), pp. 693–714. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.032>.
- Wolters, F.J. *et al.* (2020) 'Twenty-seven-year time trends in dementia incidence in Europe and the United States: The Alzheimer Cohorts Consortium', *Neurology*, 95(5), pp. e519–e531. Available at: <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000010022>.
- Woo, J.-A.A. *et al.* (2020) 'β-Arrestin2 oligomers impair the clearance of pathological tau and increase tau aggregates', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(9), pp. 5006–5015. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1917194117>.
- Wrighten, S.A. *et al.* (2009) 'A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging', *Biochimica et biophysica acta*, 1792(5), pp. 444–453. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.013>.
- Xia, F. and Youcef-Toumi, K. (2022) 'Review: Advanced Atomic Force Microscopy Modes for Biomedical Research', *Biosensors*, 12(12), p. 1116. Available at: <https://doi.org/10.3390/bios12121116>.
- Xie, K. *et al.* (2021) 'High-Throughput Metabolomics for Discovering Potential Biomarkers and Identifying Metabolic Mechanisms in Aging and Alzheimer's Disease', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, p. 602887. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.602887>.
- Xie, L. *et al.* (2016) 'OTUB1 attenuates neuronal apoptosis after intracerebral hemorrhage', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 422(1–2), pp. 171–180. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2817-8>.
- Xu, K. *et al.* (2018) 'Recent development of PeakForce Tapping mode atomic force microscopy and its applications on nanoscience', *Nanotechnology Reviews*, 7(6), pp. 605–621. Available at: <https://doi.org/10.1515/ntrev-2018-0086>.
- Yamada, K. *et al.* (2014) 'Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo', *The Journal of Experimental Medicine*, 211(3), pp. 387–393. Available at: <https://doi.org/10.1084/jem.20131685>.
- Yang, C.-W. *et al.* (2007) 'Imaging of soft matter with tapping-mode atomic force microscopy and non-contact-mode atomic force microscopy', *Nanotechnology*, 18(8), p. 084009. Available at: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/8/084009>.
- Yang, F. and Chen, G. (2022) 'The nutritional functions of dietary sphingomyelin and its applications in food', *Frontiers in Nutrition*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1002574>.

- Yang, Z. *et al.* (2021) 'Near-Field Nanoscopic Terahertz Imaging of Single Proteins', *Small*, 17(3), p. 2005814. Available at: <https://doi.org/10.1002/sml.202005814>.
- Yi, S. *et al.* (2019) 'Tau modulates Schwann cell proliferation, migration and differentiation following peripheral nerve injury', *Journal of Cell Science*, 132(6), p. jcs222059. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.222059>.
- Yuen, N. *et al.* (2008) 'Cerebral Blood Flow and Cerebral Edema in Rats With Diabetic Ketoacidosis', *Diabetes*, 57(10), pp. 2588–2594. Available at: <https://doi.org/10.2337/db07-1410>.
- Yusoh, S.N. and Yaacob, K.A. (2021) 'Study on the Physical Properties of a SiNW Biosensor to the Sensitivity of DNA Detection', *Materials (Basel, Switzerland)*, 14(19), p. 5716. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma14195716>.
- Zeisel, S.H. (2004) 'Nutritional Importance of Choline for Brain Development', *Journal of the American College of Nutrition*, 23(sup6), pp. 621S-626S. Available at: <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719433>.
- Zhang, Y. *et al.* (2017) 'Modeling of the axon membrane skeleton structure and implications for its mechanical properties', *PLOS Computational Biology*, 13(2), p. e1005407. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005407>.
- Zhang, Y. *et al.* (2018) 'High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of  $\alpha$ -synuclein monomers and dimers', *The Journal of Chemical Physics*, 148, p. 123322. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.5008874>.
- Zhang, Y. *et al.* (2022) 'Tauopathies: new perspectives and challenges', *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), p. 28. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00533-z>.
- Zhao, T. *et al.* (2024) 'Time-dependent effects of high-fat diet on cognition and cerebral insulin signaling: Window for recovery and potential therapeutic target', *Mechanisms of Ageing and Development*, 220, p. 111955. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2024.111955>.
- Zhou, Y. *et al.* (2020) 'Polysaccharides from *Lycium barbarum* ameliorate amyloid pathology and cognitive functions in APP/PS1 transgenic mice', *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, pp. 1004–1012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.177>.