
**Desenvolvimento de métodos em microscopia óptica
para obtenção de parâmetros biomecânicos de células e
moléculas únicas**

Lívia Siman Gomes

Desenvolvimento de métodos em microscopia óptica para obtenção de parâmetros biomecânicos de células e moléculas únicas

Lívia Siman Gomes

Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Co-orientador: Prof. Ubirajara Agero

Tese apresentado à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências – Física**.

Belo Horizonte

Junho de 2013

Aos meus pais

Sumário

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
1 Introdução	1
1.1 Método 1: Análise quantitativa da relação entre elasticidade de moléculas de DNA e a ligação cooperativa de ligantes. . . .	1
1.2 Método 2: Determinação da forma e das flutuações de altura de objetos de fase usando Microscopia de Desfocalização: uma aplicação em hemácias	3
2 Método 1: Materiais e Técnicas	7
2.1 DNA	7
2.1.1 A estrutura do DNA	7
2.1.2 O modelo de Worm-Like Chain (WLC)	12
2.1.3 O DNA e a Ciclodextrina	14
2.2 Pinças Ópticas	16
2.3 Montagem e Medidas Experimentais	20
3 Método 1: Desenvolvimento e Resultados	28
3.1 Resultados Experimentais	28
3.1.1 Ciclodextrina	28
3.1.2 Proteína HU	29
3.2 Modelo Proposto	33
3.3 Ajustes e Conclusões	39

3.3.1	Ciclodextrina	39
3.3.2	Proteína HU	43
4	Método 2: Materiais e Técnicas	46
4.1	Hemácias	46
4.1.1	Geometria de Hemácias	46
4.1.2	Propriedades Viscoelásticas	48
4.1.3	Flutuação de membranas	50
4.2	Microscopia de Desfocalização	59
4.3	Montagem e Medidas Experimentais	61
5	Método 2: Desenvolvimento e Resultados	67
5.1	Análise do Contraste	67
5.1.1	Métodos	68
5.1.2	Resultados	76
5.2	Análise de flutuação do contraste	82
5.2.1	Métodos	83
5.2.2	Resultados	85
6	Conclusões e Perspectivas Futuras	107
A	O DNA como uma corda "biológica"	111
B	Cálculo do comprimento de persistência para um modelo de desordem do tipo <i>quenched</i>	116
C	Condições de convergência para o método iterativo	120
D	Microscopia de Desfocalização	124
	Lista de Figuras	149
	Referências Bibliográficas	161

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao meu marido, Rudá, quem esteve literalmente ao meu lado em todos os anos deste doutorado. Agradeço por todo o apoio, pelo incentivo em fazer o doutorado sanduíche, pela companhia indispensável que me fez nos EUA, pela firmeza nos momentos difíceis e pelo carinho e paciência ao longo de todo o caminho. Ao lado dele me senti segura, confiante e feliz em passar por mais esta etapa da minha formação.

Em seguida agradeço ao meus pais, Lana e José Batista, a quem dedico esta tese. Ao longo da minha vida eles me mostraram o quão valioso e transformador é o conhecimento. Espero saber passar aos meus filhos esta perspectiva de vida maravilhosa. Agradeço também às minhas irmãs, sempre carinhosas, protetoras e prestativas. Nada como ter irmãs como Maíra e Cecília. Agradeço também à minha nova família Grossi e Coimbra. Ganhei uma nova irmã, também de nome Maíra, e Valni e Paulo como pais "postigos", que também me apoiaram ao longo de todo o trajeto. Agradeço também à Dona Ivone, outra mãe postiça que me acompanha desde que voltamos do Canadá, em 92.

Agradeço agora aos meus amigos, e pela sorte em ter vocês como companheiros nesta vida. Agradeço especialmente aos mais próximos: Letícia, Camilla, Marcos e Luiz. Letícia e suas risadas sem fim, sempre confiante que tudo dará certo. Camilla sempre a postos para me ajudar, como um anjo da guarda. Luiz e Marcos pela chatice que eu adoro. Agradeço também aos meus novos amigos, que fiz quando estava nos EUA: Seham, M'hamed, Janaína, e claro, meus vizinhos queridos de Bethesda, Elisa, Arthur e Fernando.

Agradeço aos meus amigos da Física e do laboratório pela prazerosa convivência e troca de conhecimentos. Paula, Ana, Babi e Ulisses, mais amigos maravilhosos para minha coleção. Ive, minha companheira de tese, sempre

comigo durante as crises, choros e alegrias. Agradeço ao meu co-orientador Ubirajara pelos ensinamentos, ajuda indispensável em programação, e pela leveza que ele traz ao nosso dia-a-dia de laboratório. E falando em programação, obrigada Felipe Tayer por me apresentar o Algoritmo Genético! Agradeço também ao Bechara, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório no NIH.

Faço um agradecimento especial ao meu orientador, Oscar. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência e confiança depositada em mim e em meu trabalho. Agradeço principalmente pela convivência com este exemplo de ser humano, apaixonado pela pesquisa, e vitorioso na vida. Com ele aprendi a abraçar a Física e o ofício de pesquisador.

Agradeço também às agências financiadoras: Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (PRONEX-FACEPE). Me sinto privilegiada em ter sido financiada por todos estes anos, e espero poder retribuir ao país todo este investimento.

Por fim agradeço à vida e pela oportunidade de fazer parte deste mundo. Espero que a maturidade que adquiri durante o desenvolvimento desta tese me ajude a torná-lo cada vez mais justo e encantador.

Resumo

A tese teve como objetivos o desenvolvimento de novas metodologias experimentais para auxiliar no entendimento de processos básicos presentes em células e moléculas únicas. Foram desenvolvidos dois métodos em Microscopia Óptica: o primeiro (Método 1) relacionado ao estudo da interação de moléculas únicas de DNA com fármacos, e o segundo (Método 2) relacionado ao estudo das propriedades mecânicas de hemácias.

A ligação de ligantes, como fármacos e proteínas, à moléculas de DNA podem ser estudadas via experimentos de moléculas únicas, medindo-se as mudanças no comprimento de persistência (A) do complexo formado. Nesta tese é proposta uma metodologia para a análise do comprimento de persistência baseada em um modelo estatístico de desordem congelada (*quenched*), e descrevendo a isoterma de ligação por uma equação do tipo Hill. Uma expressão geral para o comprimento de persistência efetivo do complexo DNA/ligantes em função da concentração total de ligantes é obtida e aplicada a dados experimentais. Ao ajustar os dados de DNA/ β -ciclodextrina e DNA/proteína HU, o primeiro obtido durante o mestrado da doutoranda e o último retirado da literatura, os valores para comprimentos de persistência local, constante de dissociação e grau de cooperatividade da interação foram determinados. Em ambos os casos o comprimento de persistência se comporta de forma não monotônica em função da concentração de ligantes e os resultados obtidos possibilitaram a discussão de aspectos físicos da interação entre elasticidade-DNA e cooperatividade entre a ligação dos ligantes. O desenvolvido do método 1 deu origem ao artigo *Quantitative assessment of the interplay between DNA elasticity and cooperative binding of ligands*.

O segundo método apresentado na tese envolve medidas do contraste de hemácias obtidas pela técnica de Microscopia de Desfocalização (MD). A MD

é uma técnica de microscopia óptica, desenvolvida no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos da UFMG, e que possibilita a obtenção de informação quantitativa sobre objetos de fase. Nesta tese a equação de contraste para um objeto desfocalizado é deduzida, e a partir dela são apresentadas metodologias simples para obtenção do perfil de espessura, volume, reconstrução tridimensional e índice de refração de hemácias. Além disso, como uma novidade da técnica, o perfil de altura de cada superfície da célula (membranas superior e inferior, a última aderida ao substrato) é acessado, separadamente. A flutuação quadrática média do contraste também é apresentada, e sua relação com a flutuação de altura de membranas (efeito *flickering*) é mostrada. Modelando o espectro de flutuações como dependente de um termo de curvatura k_c , de uma tensão superficial σ , e de um potencial de confinamento γ , todos os três variando lentamente ao longo do raio da célula, as flutuações em altura para cada membrana celular são determinadas, separadamente. Além disso, os comportamentos radiais dos parâmetros elásticos k_c , σ e γ de cada superfície da célula são monitorados, permitindo a discussão de aspectos físicos da membrana de hemácias. Finalmente, todos os métodos desenvolvidos foram aplicados a um conjunto de dados experimentais de 42 hemácias, coletados durante o doutorado da estudante. O artigo *Shape reconstruction and height fluctuation of phase objects using DM: an application to red blood cells* contendo todos os resultados do Método 2 está em fase de submissão.

Abstract

The aim of this thesis is the development of new experimental tools to improve the understanding of single cells and molecules basic processes. Two different methods in Optical Microscopy have been developed: the first (Method 1) regarding the interaction between DNA molecules and drugs, and the second (Method 2) regarding mechanical properties of red blood cells.

Binding of ligands to DNA can be studied by measuring the change of the persistence length of the complex formed, in single-molecule assays. A methodology for persistence length data analysis based on a quenched disorder statistical model and describing the binding isotherm by a Hill-type equation is proposed. An general expression for the effective persistence length as a function of the total ligand concentration is obtained and applied to the experimental data of the DNA-cationic β -cyclodextrin and to the DNA-HU protein data, the first one obtained by the Ph. student during her master degree and the last one gotten from the literature, determining the values of the local persistence lengths, the dissociation constant and the degree of cooperativity for each set of data. In both cases the persistence length behaves non-monotonically as a function of ligand concentration and based on the results obtained some physical aspects of the interplay between DNA-elasticity and cooperative binding of ligands are discussed. The development of Method 1 generated the paper *Quantitative assessment of the interplay between DNA elasticity and cooperative binding of ligands*.

The second method presented is based on contrast measurements of red blood cells (RBC) using Defocusing Microscopy (DM) technique. DM is a bright-field microscopy technique developed in the Laboratory of Biological Systems of UFMG, used to obtain quantitative information of phase objects.

In this thesis the contrast equation for a defocused microscope is deduced, and based on it very simple methodologies to obtain refractive index, thickness profile, volume and three dimensional (3D) reconstruction of red blood cells (RBC) are presented. In addition, as a new feature of the technique, the shape profile of each of the red cell surfaces (upper and lower membranes, the last one adhered to the substrate) are obtained, separately. The DM mean square contrast fluctuation equation is also presented, and its relation to red cell surface membrane fluctuations (RBC flickering) is shown. Modeling the membrane height fluctuation spectrum as dependent of a bending modulus (κ_c), a surface tension (σ) and a confining potential (γ), all of them slowly varying along the cell radius, the surface fluctuations of the cell free interface and of the one in contact with the substrate is obtained, separately. Moreover, the behaviour of the elastic parameters κ_c , σ and γ for each interface along the cell radius is monitored and some physical aspects of the red cell membranes are discussed. Finally, all the developed methods are applied to the experimental data of 42 RBC and the average biomechanical properties are shown. The development of Method 2 generated the paper *Shape reconstruction and height fluctuation of phase objects using DM: application to red blood cells*, which is in submission process.

Capítulo 1

Introdução

A tese “Desenvolvimento de métodos em microscopia óptica para obtenção de parâmetros biomecânicos de células e moléculas únicas” foi desenvolvida no Laboratório de Física Biológica da UFMG, sob a orientação do Prof. Oscar Nassif de Mesquita e do Prof. Ubirajara Agero. Além disso, um ano do trabalho foi desenvolvido no Laboratório do Dr. Fechara Achar, *M.D. Chief, Section on Structural Cell Biology and Chief, Laboratory of Cell Structure and Dynamics, NIDAL, National Institutes of Health (NIGH)* como estágio sanduíche PEDE CAPES. A tese teve como objetivos o desenvolvimento de novas metodologias experimentais para auxiliar no entendimento de processos básicos presentes em células e moléculas únicas. Neste sentido, foram desenvolvidos dois métodos em Microscopia Óptica: o primeiro (Método 1) relacionado ao estudo da interação de moléculas únicas de DNA com fármacos, e o segundo (Método 2) relacionado ao estudo das propriedades mecânicas de hemácias.

1.1 Método 1: Análise quantitativa da relação entre elasticidade de moléculas de DNA e a ligação cooperativa de ligantes.

O estudo da interação entre DNA e ligantes, como drogas ou proteínas, é um tópico essencial em várias áreas do conhecimento, que englobam desde a

compreensão de processos intracelulares até o tratamento de doenças. Nos últimos anos o tópico vem sido pesquisado e revisado por diversos autores [1]. Uma das formas de se estudar a interação de ligantes com a molécula de DNA é via estiramentos de moléculas únicas de DNA, medindo-se a mudança no comprimento de persistência (A) do complexo formado entre as moléculas. O primeiro método a ser apresentado nesta tese foi desenvolvido a partir de medidas de elasticidade de moléculas únicas de DNA, via a técnica de pinçamento óptico.

Durante o mestrado, a doutoranda realizou medidas do comprimento de persistência de moléculas de DNA complexadas com diferentes concentrações da (*6-monodeoxy-6-monoamine- β -cyclodextrin*), uma ciclodextrina (CD) catiônica conhecida por induzir a compactação da molécula de DNA [2]. O objetivo destas medidas era obter informações sobre o processo de compactação, como as concentrações ideais, tempo de incubação, entre outras, de forma a orientar o uso do fármaco em terapia gênica. O projeto foi realizado em colaboração com a Prof. Mônica Cristina de Oliveira, da Faculdade de Farmácia da UFMG, e como resultado foi possível determinar a concentração ideal de CD para a máxima compactação do DNA, bem como as concentrações inadequadas para a terapia gênica, já que estas podem danificar a integridade do DNA.

As medidas do comprimento de persistência foram finalizadas no mestrado da estudante e revelaram um comportamento não-monotônico para A em função da concentração de ligantes, ainda não observado na literatura. Sendo assim, o desenvolvimento do projeto se estendeu durante o doutorado, porém com o novo objetivo de se criar um modelo teórico capaz de descrever a interação DNA/CD. Visando obter alguns parâmetros da interação, como a constante de ligação e número de ligantes envolvidos, outros tipos de experimentos foram realizados. No entanto, não foi possível obter as informações desejadas, o que nos motivou a criar de um método capaz de determinar parâmetros da interação DNA/CD, somente via as medidas de elasticidade.

Isto posto, um dos objetivos desta tese é apresentar o método desenvolvido a partir das medidas de elasticidade, e não as medidas de elasticidade em si, que foram finalizadas durante o mestrado da doutoranda. Sendo assim, não consta nesta tese uma descrição detalhada da preparação de amostras

e das medidas experimentais, e todas estas informações estão contidas na dissertação de mestrado "O estudo da interação DNA-Ciclodextrina via técnica de pinçamento óptica com aplicação em terapia gênica", defendida pela estudante em Março de 2009 [3].

A apresentação do Método 1 será feita em dois capítulos. No capítulo 2, “*Método 1: Materiais e Técnicas*”, faremos uma descrição das estruturas do DNA e da Ciclodextrina utilizadas no trabalho. Em seguida, apresentaremos a técnica de Pinças Ópticas e faremos uma breve descrição das medidas de elasticidade realizadas. No capítulo 3, “*Método 1: Desenvolvimento e Resultados*”, todo o desenvolvimento do método será exposto, bem como os resultados obtidos com sua aplicação em dois problemas específicos. Como será visto, propomos uma metodologia para a análise do comprimento de persistência baseada em um modelo estatístico de desordem *quenched*, e descrevendo a isoterma de ligação por uma equação do tipo Hill. Com esta abordagem obtém-se uma expressão geral para o comprimento de persistência efetivo do complexo DNA/ligantes, em função da concentração total de ligantes. Esta expressão é usada para ajustar os dados experimentais de DNA-CD e de DNA-proteína HU, o último retirado da literatura. Como resultado são determinados os valores para comprimentos de persistência local, a constante de dissociação e o grau de cooperatividade da interação, possibilitando a discussão de aspectos físicos da interação entre elasticidade-DNA e cooperatividade entre a ligação dos ligantes. O método desenvolvido deu origem ao artigo *Quantitative assessment of the interplay between DNA elasticity and cooperative binding of ligands*, publicado em 2012 [4].

1.2 Método 2: Determinação da forma e das flutuações de altura de objetos de fase usando Microscopia de Desfocalização: uma aplicação em hemácias

A forma e motilidade de células são determinadas, em grande extensão, pela interação entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto celular. Esta interação

é dinâmica e sustentada pelo metabolismo da célula, levando este sistema a operar longe do equilíbrio termodinâmico. Portanto, a célula é um sistema complexo longe do equilíbrio termodinâmico, com auto-regulação através das várias proteínas de controle que participam deste processo. Para estudar este sistema é necessário desenvolver métodos quantitativos para medir as suas propriedades, e fazer uso de modelagem Física, analítica e computacional, para entender os processos básicos que ocorrem. Além disso, para a análise de sistemas complexos extensos espacialmente como células, as propriedades estatísticas das flutuações de forma e altura da membrana (bicamada lipídica + citoesqueleto) constituem um alvo importante para medidas experimentais. Estes efeitos, que ocorrem na escala mesoscópica do problema (escala micrométrica), são passíveis de serem estudados com técnicas de microscopias ópticas.

O caso considerado "mais simples" para início do estudo da interação bicamada/citoesqueleto consiste na medida e análise da forma e das propriedades elásticas de hemácias, que são as células vermelhas do sangue. A hemácia é uma célula sem núcleo e, portanto, sem síntese de proteínas. Além disso, a célula possui citoesqueleto e membrana lipídica relativamente simples, passíveis de modelagem física. Existe uma extensa literatura a este respeito, tanto de medidas experimentais quanto de modelagem física [5–17]. Apesar disso, ainda existem muitas controvérsias a respeito das propriedades elásticas de hemácias, e é neste contexto no qual o Método 2 se insere. Na realidade, o Método 2 é composto por uma coleção de metodologias em microscopia, a partir das quais seremos capazes de determinar propriedades relacionadas à forma e à elasticidade de hemácias. Como será visto, as metodologias são baseadas em medidas de microscopia óptica, e também envolvem o uso de modelagem Física e computacional.

Isto posto, o segundo método apresentado na tese envolve medidas de contraste de hemácias obtidas pela técnica de Microscopia de Desfocalização (MD). A MD foi desenvolvida no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos da UFMG, e tem sido objeto de pesquisa de dissertações e teses [18–20], além de artigos do grupo [21–25]. Como será mostrado, uma das vantagens da MD em relação a outras microscopias ópticas, é que ela possibilita a discriminação da superfície livre da célula da superfície em contato com o substrato. Esta

exclusividade da técnica viabiliza a definição de parâmetros específicos de cada superfície celular.

A apresentação das metodologias desenvolvidas no Método 2 e os resultados originados de sua aplicação em hemácias também serão feitas em dois capítulos. No capítulo 4, “*Método 2: Materiais e Técnicas*”, faremos uma descrição da geometria de hemácias, bem como da modelagem física utilizada para a descrição da sua membrana (bicamada lipídica + citoesqueleto). Em seguida, iremos expor a teoria da Microscopia de Desfocalização, chamando a atenção para novos aspectos da técnica. Como a teoria MD é muito extensa, apresentaremos aqui uma versão resumida dos cálculos (Apêndice D). Uma versão detalhada pode ser vista na tese de Giuseppe Gliona [18] defendida em Junho de 2009. No final do capítulo 4 descreveremos os experimentos realizados com as hemácias. O capítulo 5, “*Método 2: Desenvolvimento e Resultados*”, será dividido em duas partes principais. Na primeira apresentaremos as metodologias desenvolvidas a partir de medidas do contraste MD em hemácias. A partir destas definiremos o perfil de espessura, o volume, a reconstrução tridimensional da espessura, o índice de refração da hemácia e o perfil de altura de cada superfície da célula. Na segunda parte apresentaremos as metodologias desenvolvidas a partir de medidas da flutuação temporal do contraste MD. A partir destas seremos capazes de determinar o perfil radial das flutuações em altura das superfícies da célula. Além disso, teremos informação sobre os parâmetros elásticos de cada superfície, bem como seu comportamento ao longo da extensão celular. Como será mostrado, para acessar as informações de cada superfície celular faremos uso de um algoritmo genético. Um artigo contendo todos os resultados do Método 2 está em fase de submissão [26].

No último capítulo, capítulo 6 “*Conclusões e Perspectivas*”, faremos um resumo de todo o trabalho realizado, bem como uma discussão sobre os futuros projetos a serem desenvolvidos utilizando os métodos apresentados. Por fim, é importante dizer que os projetos desenvolvidos pela doutoranda no período em que estive nos EUA não constam nesta tese. Durante o período em que estive no NIH, a estudante desenvolveu um projeto ligado às medidas de motilidade de queratócitos e outro ligado à presença de canais mecano-sensíveis em células sanguíneas, sendo o último uma aplicação direta

do Método 2 desenvolvido. Para a realização dos projetos a estudante desenvolveu habilidades em outras técnicas de microscopia, e aprofundou seu conhecimento em biologia e cultivo celular, técnicas de transfecção, entre outros. O projeto ligado à motilidade de queratócitos está sendo retomado atualmente pela aluna de doutorado Ana Paula Alves do Laboratório de Física de Sistemas Biológicos. O projeto ligado às hemácias foi submetido ao CNPq para pedido de uma bolsa de pós-doc (*“Estudo do papel dos canais iônicos mecano-sensíveis na regulação do volume de hemácias via técnicas de microscopia e pinça óptica aplicadas em células únicas”*), a ser realizado no Laboratório de Física Biológica, utilizando os métodos em MD desenvolvidos. O projeto foi recentemente aprovado pelo CNPq e maiores detalhes serão dados no capítulo de Conclusões e Perspectivas.

Capítulo 2

Método 1: Materiais e Técnicas

2.1 DNA

O DNA (ácido desoxyribonucleic) é uma das moléculas biológicas mais essenciais do corpo humano, pois possui como função biológica conservar e transferir informação genética. A molécula é classificada como um polímero, da subclass de biopolymer, que são macromoleculas formadas pela repetição de monomers produzidos por organismos vivos. A composição química e a seqüencia na qual estes monomers são arranjados é denominada estrutura primária do DNA. Além disso, a molécula é caracterizada pelas suas estruturas secundária e terciária. A caracterização destas formas é importante, pois elas determinam as funções biológicas do biopolymer.

2.1.1 A estrutura do DNA

O ácido desoxyribonucleic (DNA) é formado pela junção de dois polímeros lineares que possuem como monomers os nucleotídeos. Cada nucleotídeo é composto por três componentes: um açúcar (desoxirribose), uma base heterocíclica (5 carbonos) e um grupo fosfato (PO_4), conforme ilustrado na figura 2.1. Existem quatro tipos diferentes de bases, sendo duas purinas - adenina (A) e guanina (G)- e duas pirimidinas - timina (T) e citosina (C). Cada polímero linear é denominado uma fita do DNA, e a associação de duas fitas

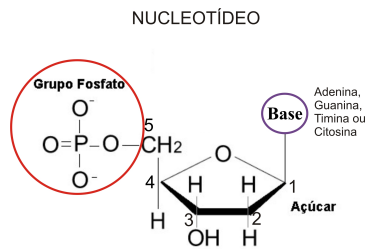


Figura 2.1: Representação dos nucleotídeos presentes na molécula de DNA. Cada nucleotídeo é composto por três componentes: um açúcar, uma base e um fosfato.

ocorre da seguinte forma (Fig. 2.2):

- (a) as fitas permanecem paralelas mas com polaridades (terminais 3'ou 5') opostas;
- (b) as bases ficam para dentro e se conectam por pontes de hidrogênio;
- (c) duas bases conectadas formam um par de bases, e existem somente dois tipos de pares de base no DNA: pare A-T e pares G-C.

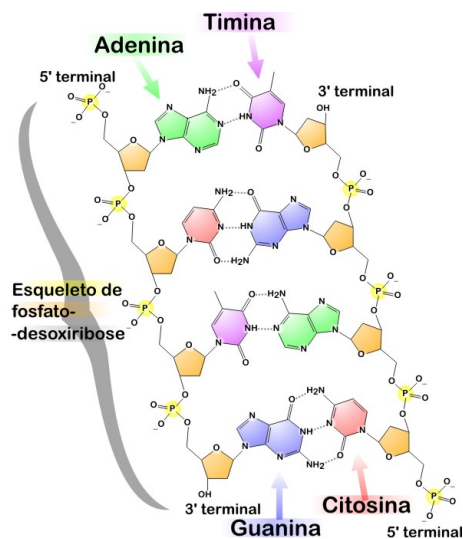


Figura 2.2: Representação da ligação entre as duas fitas de DNA. As ligações de hidrogênio entre as bases A,T,G e C são representadas pelas linhas pontilhadas.

A molécula formada pela associação das fitas possui uma parte regular chamada de esqueleto (*backbone*) que consiste de alternações entre açúcares e grupos fosfatos ligados entre si, e uma parte não-regular, que é composta pelas bases ligadas aos açúcares, formando uma seqüência ao longo da cadeia. A seqüência das bases determina a chamada estrutura primária do DNA e é única para cada organismo. Como já se sabe, alterações nesta seqüência podem provocar mudanças cruciais nas propriedades e funcionamento do organismo [27].

A forma de conexão ente as duas fitas de DNA é denominada estrutura secundária da molécula, e foi proposta por Watson e Crick em 1953, o que lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina. Segundo Watson e Crick [28], as fitas se enrolam ao redor de um eixo comum formando uma estrutura de dupla hélice, conforme ilustrado na figura 2.3. Pela figura vemos que a distância entre bases adjacentes ao longo deste eixo de rotação é de 0,34 nm, de forma que o ângulo de rotação entre elas é de 36 graus. Notamos também que as bases são localizadas dentro da estrutura de dupla hélice, enquanto os fosfatos e os açúcares ficam localizados fora da estrutura. Uma importante observação é que cada grupo fosfato da molécula adquire carga $-1e$ quando o polímero está imerso em solução fisiológica, o que confere à molécula de DNA um caráter predominantemente negativo.

A estrutura de dupla hélice da molécula se mantém estável devido a três tipos básicos de interações: ligações de pontes de hidrogênio entre bases pareadas, interações de stacking (empilhamento) entre as bases vizinhas ao longo da fita de DNA e forças de longo alcance intra e inter esqueleto.

As ligações de hidrogênio são responsáveis por manterem as duas fitas unidas e ocorre entre duas bases (uma de cada fita), nas combinação AT e CG. Mais especificamente, entre as bases A e T são formadas duas pontes de hidrogênio e entre bases C e G são formadas três pontes. As ligações são do tipo



e são relativamente fracas (quando comparadas a ligações covalentes, por exemplo, as ligações de hidrogênio são 20 ou 30 vezes mais fracas)*, e portanto

*A energia de uma ligação C-C é 83.1kcal/mol e de uma ligação C-H é 98.8 kcal/mol,

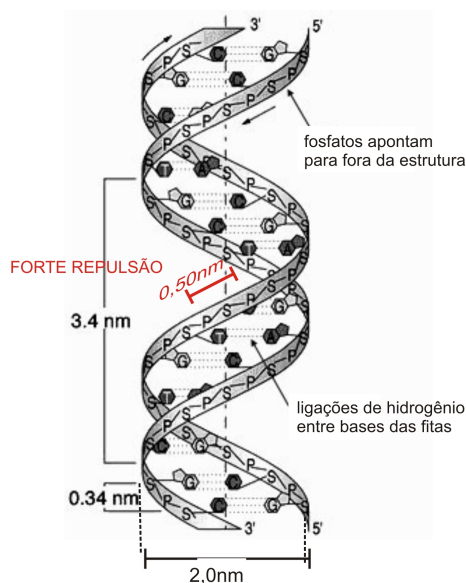


Figura 2.3: Representação da estrutura de dupla hélice do DNA. A distância entre os pares de base ao longo da hélice é de 0,34 nm. No caso dos fosfatos, a distância interfosfatos ao longo da hélice é de aproximadamente 0,5 nm, e entre as fitas é de 2,0 nm.

facilmente quebradas por fármacos a temperaturas fisiológicas. As interações de empilhamento (*stacking*) também são da mesma ordem de grandeza das ligações de hidrogênio, e são responsáveis por manterem uma base próxima a outra, ao longo do eixo da hélice.

As forças de longo alcance são relacionadas à presença dos grupos fosfatos nas fitas de DNA. Como indicado na figura 2.3, a distância entre fosfatos de fitas diferentes é de aproximadamente 2,0 nm, o que caracteriza uma interação muito fraca. Diferentemente, a distância entre fosfatos ao longo de uma mesma fita é da ordem de 0,5 nm, o que promove o surgimento de forte repulsão eletrostática, já que em solução fisiológica cada grupo adquire carga $-1e$. Para minimizar esta repulsão, o DNA na sua forma nativa deve ser mantido imerso em um meio capaz de fornecer cátions para que as cargas negativas sejam suficientemente blindadas, garantindo assim a estabilidade da estrutura de dupla hélice. Em decorrência desta blindagem, as cadeias que são ligações covalentes. Já uma ligação de hidrogênio do tipo O-H...O tem energia de 3 – 6 kcal/mol [27].

de DNA em condições fisiológicas se tornam bastante flexíveis, de forma que a dupla hélice do DNA pode adquirir várias formas terciárias, entre elas a super-hélice ou superenrolamento. Esta última é definida como sendo o enrolamento da dupla-hélice sobre si mesma, o que possibilita o empacotamento do DNA dentro das células. O superenrolamento reduz o espaço ocupado pelo DNA na sua forma natural e permite que maior quantidade de DNA seja empacotada dentro do núcleo. Nas células humanas este superenrolamento é possível graças à presença de proteínas chamadas histonas, que se ligam às moléculas de DNA formando complexos denominados nucleossomas. Como mencionado na Introdução, neste trabalho foi utilizado um fármaco com o intuito de promover o empacotamento da molécula.

Por fim, é importante dizer que todos os parâmetros da dupla hélice descritos acima podem sofrer modificações dependendo da umidade relativa do ambiente, da espécie de cátions dissolvidos na solução no qual o DNA está imerso, entre outros [27]. Sendo assim, existem três formas estáveis para a estrutura de dupla hélice: A, B e Z. A forma B, descrita por Watson e Crick, é aquela mais comum na natureza e é definida por possuir pares de base quase perpendiculares ao eixo da hélice. A forma A possui pares de base não perpendiculares ao eixo da hélice e a forma Z tem hélice crescente no sentido anti-horário.

Desnaturação e Renaturação do DNA

Os fenômenos de desnaturação e renaturação são fenômenos físicos fundamentais para os processos biológicos executados pelo DNA. A desnaturação caracteriza-se pelo rompimento das pontes de hidrogênio levando à separação das fitas complementares do DNA, e o inverso deste processo é a renaturação. No processo de replicação o DNA deve ser localmente desnaturado por proteínas especializadas, para então ser copiado. A desnaturação do DNA pode ser provocada por diversos fatores, entre eles o aumento da temperatura, a titulação com ácidos e o estiramento da molécula na presença de substâncias intercalantes [29,30]. Uma das maneiras de se medir a desnaturação da molécula de DNA é através da medida da absorvância da luz ultravioleta (UV). As bases do DNA são as maiores responsáveis pela absorção de luz -

a absorção é máxima para $\lambda = 260$ nm - de forma que quando as fitas da dupla-hélice do DNA estão completamente separadas, a absorbância é 37% maior do que aquela obtida para o DNA em sua forma nativa [29]. Como será visto no capítulo 3, a molécula de ciclodextrina utilizada neste trabalho possivelmente promove a desnaturação do DNA em determinadas concentrações do fármaco em solução.

2.1.2 O modelo de Worm-Like Chain (WLC)

Para retirar informações a partir do estiramento de moléculas únicas de DNA devemos inicialmente saber como a molécula se comporta sob a ação de uma força de módulo F , aplicada em uma de suas extremidades, conforme representado na figura 2.4(a). Como o tipo de monômero tem pouca influência no comportamento macroscópico de um polímero, a extensão ou alongamento do DNA resultante desta força pode ser aproximada pela extensão de um polímero semi-flexível. Quando um polímero deste tipo é colocado numa solução aquosa ele se choca com as moléculas do meio (e entre si), de forma que suas extremidades se aproximam ou se afastam, adquirindo as configurações possíveis para as características daquele polímero. Cada configuração corresponde a uma determinada energia e uma mesma energia pode corresponder a várias configurações. Para um sistema de N polímeros e uma dada energia total, a distribuição de equilíbrio (a uma temperatura T) dos polímeros do sistema entre as configurações possíveis corresponde ao valor máximo da entropia:

$$S = k_B \ln \Omega, \quad (2.1)$$

onde Ω é o número total de configurações acessíveis ao sistema para aquelas condições.

Quando o polímero atinge o equilíbrio termodinâmico com o meio, se quisermos esticá-lo devemos aplicar uma força às suas extremidades, afastando-as uma da outra. Estas forças são denominadas forças entrópicas, pois são forças capazes de esticar o polímero, mas não a ponto de deformar as ligações químicas. Neste regime de forças, denominado regime entrópico, a elasticidade do polímero é chamada de elasticidade entrópica. Em nossos experimentos realizamos estiramento de moléculas únicas de DNA no regime

de forças entrópicas. Tipicamente este é o regime para $F < 10$ pN, no caso do DNA.

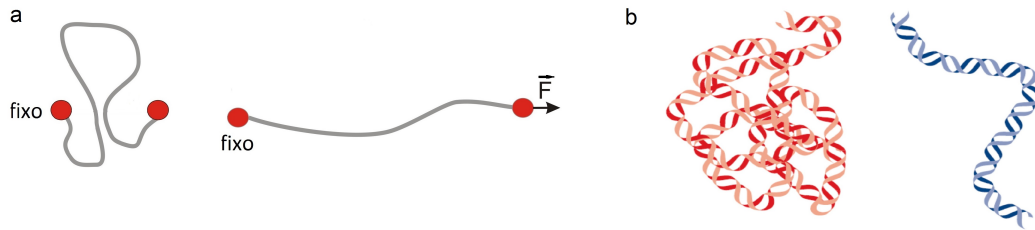


Figura 2.4: (a) Representação de um polímero semi-flexível preso por uma de suas extremidades e sujeito a uma força \vec{F} , aplicada na outra extremidade. (b) Representação de dois polímeros com comprimentos de persistência A diferentes. Quanto menor o valor de A , mais flexível é o polímero, apresentando muitas dobras. De forma contrária, quanto maior A , mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras.

O comportamento de polímeros semi-flexíveis é normalmente descrito pelo modelo de Worm-Like Chain (WLC), também conhecido como modelo de Krakty-Porod, formulado em 1949 [60]. Em 1994, Marko e Siggia mostraram que o diagrama de força x extensão de uma molécula de DNA submetida a estiramentos é bem descrito pelo modelo WLC [31,32], e desde então o modelo vem sendo utilizado com sucesso em diversos trabalhos [29,30,33–35,54]. De acordo com Marko e Siggia [33], o modelo WLC possibilita uma excelente descrição da elasticidade do DNA quando este é submetido a forças de estiramento de até $10pN$ (regime de forças entrópicas). Macroscopicamente, o WLC trata o DNA como uma vara flexível que sofre deformações suaves devido a flutuações térmicas. Microscopicamente, o modelo assume que cada segmento da molécula obedece a lei de Hooke, de forma que ao aplicarmos uma força entrópica em uma das extremidades da molécula de DNA, cada segmento é sujeito a uma força elástica restauradora proporcional à deformação da molécula [33,34]. Dentro do intervalo de forças até 10 pN, o modelo descreve o comportamento elástico do DNA tanto para estiramentos pequenos (molécula próxima à sua conformação de equilíbrio) quanto longos (molécula próxima à conformação retilínea). Para explicar o comportamento elástico para estiramentos realizados próximo à conformação superenrolada

do DNA, o modelo ainda é discutível. Alguns pesquisadores argumentam que nesse limite o DNA é muito mais flexível do que previsto pelo modelo WLC e propõem um novo modelo (Sub-elastic Chain model) no qual a elasticidade não segue a Lei de Hooke [34]. Neste trabalho nos limitamos ao regime de forças baixas ($F < 10$ pN) e utilizamos o modelo WLC para a análise dos nossos resultados.

A equação de força x estiramento proposta por Marko e Siggia [32] é função do comprimento de persistência A , do comprimento de contorno L da molécula (distância entre as extremidades do polímero na configuração esticada), da distância média entre as extremidades da molécula z (figura 2.4(b)), da temperatura T e da constante de Boltzmann k_B :

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (2.2)$$

A definição física do comprimento de persistência (A) de um polímero é o comprimento de correlação da cadeia polimérica. Ou seja, o comprimento A é uma medida do alcance de perturbações locais na conformação da molécula. Sendo assim, este parâmetro nos dá informação sobre a rigidez/elasticidade da molécula. Quanto maior o valor de A , mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras. Por outro lado, quando menor o valor de A , mais flexível é o polímero, apresentando muitas dobras. A figura 2.4(b) ilustra estes dois limites. Uma dedução formal deste parâmetro pode ser vista no Apêndice A desta tese.

2.1.3 O DNA e a Ciclodextrina

Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos compostos de n -unidades de D-glucose, conectadas entre si por glucosídios. O subtipo β , que foi utilizado neste trabalho, consiste em uma molécula com sete unidades de D-glucose, organizadas em uma estrutura molecular que lembra um cone truncado, com grupos hidroxila localizados na superfície de fora do cone, conforme ilustrado na figura 2.5. Esta organização molecular confere às CDs a propriedade de serem solúveis em água, porém com uma cavidade interna relativamente hidrofóbica capaz de acomodar polímeros e formar complexos de inclusão

do tipo hóspede-hospedeiro (host-guest complex). A ciclodextrina catiônica monovalente (6-monodeoxy-6-monoamine- β -cyclodextrin), obtida pela substituição de um grupo hidroxila por um grupo amino, tem sido usada na condensação de moléculas de DNA, possibilitando então a sua introdução em pequenas vesículas [36]. A introdução de vesículas carregadas de material genético é cada vez mais utilizada em terapia gênica, de forma que existe interesse em experimentos que possam acessar com maiores detalhes a interação DNA-CD, otimizando os parâmetros para a condensação do DNA, e garantindo a integridade da molécula.

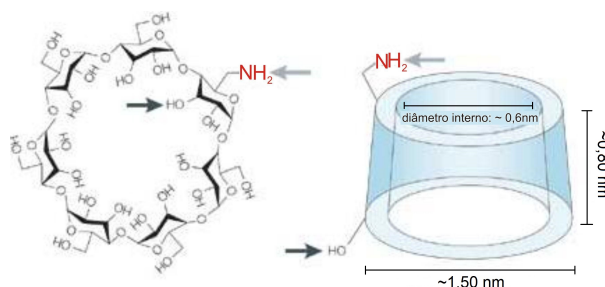


Figura 2.5: Desenho esquemático da ciclodextrina modificada denominada 6 – monodeoxy – 6 – monoamino – β – ciclodextrina (*Am – beta – CD*). O derivado é formado pela substituição de um radical hidroxila por um grupo amina (NH_2), conferindo à molécula uma carga $+1e$ quando imersa em meio fisiológico. A molécula possui diâmetro interno de ~ 0.6 nm, diâmetro externo de ~ 1.5 nm e altura de ~ 0.8 nm.

A motivação inicial das medidas experimentais realizadas durante o mestrado da estudante foi testar a capacidade da *Am- β -CD* em formar complexos com moléculas de DNA, visando uma condensação do DNA. Existem na literatura relatos sobre a capacidade de derivados catiônicos da ciclodextrina em formar complexos com moléculas de DNA [2,37]. No entanto, não existe nenhum estudo sistemático sobre variações das propriedades elásticas do DNA quando interage com a CD.

2.2 Pinças Ópticas

Em 1873 Maxwell demonstrou com a teoria do eletromagnetismo que a luz pode exercer pressão de radiação, ou seja, força óptica devido à absorção, espalhamento ou emissão de luz na matéria. No entanto, esta força é muito pequena (alguns miliwatts de potência produzem força da ordem de piconewtons) e somente por volta de 1960, com a descoberta do laser, que pesquisadores passaram a estudar de forma efetiva e sistematicamente a pressão de radiação [38]. Em 1970 Arthur Ashkin demonstrou que forças ópticas poderiam deslocar e levitar partículas dielétricas micrométricas [39]. Este trabalho eventualmente levou ao desenvolvimento de forças ópticas formadas por um feixe único de luz, atualmente conhecido como pinça óptica. Ashkin e seus colaboradores utilizaram a pinça óptica em vários experimentos, desde o resfriamento e aprisionamento de átomos neutros até a manipulação de vírus e bactérias vivas. Hoje em dia a pinça óptica continua a ter aplicações em física e em biologia, sendo empregada no estudo de motores moleculares no nível de molécula-única, na física de colóides e sistemas mesoscópicos, além do estudo de propriedades mecânicas de polímeros e biopolímeros [40]. Com a possibilidade de se aplicar forças da ordem de piconewtons, podemos esticar, dobrar ou distorcer macromoléculas únicas como DNAs ou componentes do citoesqueleto celular (como microtúbulos e filamentos de actina) simulando a ação de enzimas mecânicas [38]. Neste trabalho utilizamos a técnica para promover estiramentos de moléculas únicas de DNA.

Princípio de funcionamento da pinça óptica

Uma pinça óptica consiste basicamente em um feixe de laser focalizado por uma objetiva de grande abertura numérica. Quando um feixe deste tipo incide em uma pequena esfera dielétrica, cada raio de luz do feixe dá origem a um raio refletido e outro refratado. Sendo assim, a esfera experimenta uma força óptica que pode ser decomposta em duas componentes: 1) uma força de espalhamento devido à reflexão e à absorção, na direção de propagação da luz e, 2) uma força de gradiente devido à refração. Para que haja pinçamento óptico a força de gradiente deve ser maior que a força de espalhamento, e uma condição para que isso ocorra é que o índice de refração da esfera seja

maior do que o do meio que a circunda. A seguir será feita uma rápida análise destas forças sob o ponto de vista da óptica geométrica, e portanto válida apenas para o limite em que o raio da esfera é muito maior do que o comprimento de onda do laser.

1. Força de espalhamento

A força de espalhamento é uma força devido à reflexão e à absorção da luz pela esfera. Como é sabido, a luz transporta momento em seus fótons e, portanto, quando um feixe de luz incide em uma microesfera há transferência de momento linear. Por exemplo, seja um único fóton com momento linear \vec{p} e módulo $|\vec{p}|$:

$$|\vec{p}| = \frac{h\nu}{c} = \frac{E}{c}$$

onde h é a constante de Planck, c a velocidade da luz, ν a frequência da onda eletromagnética e E a energia do fóton. Para o caso de incidência da luz normal à superfície da esfera, e considerando que o fóton é totalmente refletido ao atingir a microesfera, o módulo da variação de momento linear do fóton é dado por:

$$|\Delta\vec{p}| = |\vec{p}_f - \vec{p}_i| = \frac{2E}{c}.$$

Sendo assim, o momento máximo transferido à esfera terá módulo igual a $|\Delta\vec{p}|$. Para uma taxa de N fótons por segundo a microesfera sofrerá uma força denominada força de espalhamento, dada por:

$$|\vec{F}| = \left| \frac{d\vec{p}}{dt} \right| = \frac{2}{c} \frac{dE_{total}}{dt} = \frac{2}{c} P_{total}, \quad (2.3)$$

onde P_{total} é a potência total do feixe incidente. Para se ter uma idéia da magnitude dessa força, um feixe de laser com uma potência de 1mW resulta em uma força de espalhamento de ~ 7 pN.

Na figura 2.6(a) está ilustrada a força de espalhamento sob ponto de vista da óptica geométrica. Na figura, dois raios de luz provenientes de um feixe de laser gaussiano incidem sobre uma esfera dielétrica. Os raios são refletidos na superfície da esfera e, por conseqüência, ocorre o aparecimento das forças \vec{F}_1 e \vec{F}_2 . Somando-se \vec{F}_1 e \vec{F}_2 , aparece uma força resultante que tende a empurrar a esfera pra cima, na direção de propagação da luz.

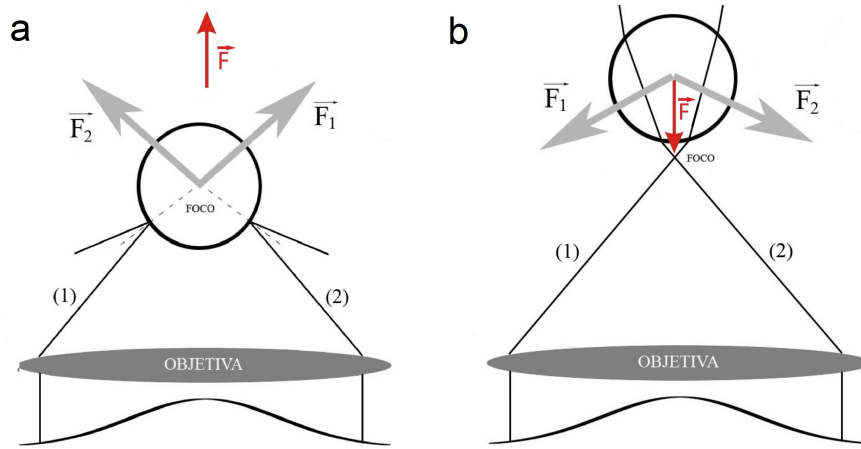


Figura 2.6: (a) Força de espalhamento: parte da luz incidente é refletida na superfície da microesfera. Neste caso a força resultante tende a empurrar a microesfera para cima, na direção de propagação da luz. (b) Força de gradiente atuando em microesfera situada no centro do perfil gaussiano, porém acima do foco do laser. A força resultante tende a empurrar a esfera para a região do foco do laser. Figura retirada de [29].

2. Força de gradiente

Outra componente responsável pelo pinçamento é uma força devido à refração da luz no objeto. Quando um raio de luz incide em uma pequena esfera com índice de refração diferente daquele do meio de incidência, o raio é desviado da sua trajetória inicial. Este desvio provoca uma variação no momento linear do raio, de forma que a esfera é sujeita a uma força de refração de módulo:

$$|\vec{F}| = \left| \frac{d\vec{p}}{dt} \right|$$

onde dp é variação do momento linear da esfera.

Na figura 2.6(b) está esquematizada a força devido a refração, sob ponto de vista da óptica geométrica. Uma esfera no centro do perfil gaussiano do laser, porém abaixo do foco está representada. Nesta situação, quando o raio de luz 1 incide na microesfera uma parte é refletida e outra a refratada. Como já dito, a parte refletida provoca o surgimento de uma força de espalhamento que tende a empurrar a esfera na direção de propagação feixe. Já a parte

refratada sofre um desvio de sua trajetória inicial e uma variação no momento linear $\Delta\vec{p}$. Pela segunda e terceira Leis de Newton, a esfera sofre então uma variação no momento linear $|\Delta\vec{p}|$ e uma força \vec{F}_1 , dada pela Eq.2.3. \vec{F}_1 é proporcional à intensidade da luz incidente, e quando o índice de refração da esfera é maior que o índice de refração do meio, a força resultante tem sentido e direção do gradiente de intensidade. O mesmo acontece com o raio de luz 2 proveniente da extremidade direita do feixe. Como o perfil de intensidade do laser é gaussiano, o raio 1 proveniente da parte central do feixe possui a mesma intensidade do raio 2, e a força resultante apontará para a região do foco do laser. É importante ressaltar para qualquer posição do perfil gaussiano, a força resultante na esfera tende a empurrá-la para o foco.

Resumindo, sob o ponto de vista da óptica geométrica cada raio de luz incidente na microesfera dá origem a um raio transmitido e um outro refletido, cujas intensidades dependem dos coeficientes de reflexão e de transmissão na interface meio-esfera, além da posição no perfil gaussiano do qual foram originados. O efeito da refração é deslocar o centro da esfera para o foco do feixe (força de gradiente), enquanto o efeito da reflexão é empurrar a esfera no sentido da incidência do feixe (força de espalhamento) [29]. Para um pinçamento estável nas três dimensões, a força de gradiente deve ser maior do que a força de espalhamento na direção axial da microesfera. Como resultado desta soma, a posição de equilíbrio axial da esfera aprisionada é localizada levemente acima ou levemente abaixo do foco. Sendo assim, para pequenos deslocamentos (~ 150)nm a força restauradora (força de gradiente) é proporcional ao deslocamento em relação à posição de equilíbrio. Desta forma o aprisionamento óptico funciona como uma mola que obedece a Lei de Hooke, com constante elástica proporcional à intensidade do laser [40]. Ou seja, o perfil das forças perto do foco caracteriza um poço de potencial harmônico, confinando a microesfera que realiza pequenos movimentos aleatórios em torno da sua posição de equilíbrio. Neste limite, a constante de força da pinça k é inversamente proporcional ao raio da microesfera [41].

Quando o raio da microesfera é muito menor do que o comprimento de onda do laser, a análise das forças sob o ponto de vista da óptica geométrica não é mais válida. Neste caso as condições para espalhamento Rayleigh são

satisfeitas e as forças ópticas podem ser calculadas tratando a partícula como um dipolo elétrico induzido [30]. Por outro lado, quando o raio da esfera tem dimensão comparável ao comprimento de onda do laser incidente, não é possível usar a óptica geométrica nem a aproximação de Rayleigh. Para este caso uma teoria eletromagnética mais completa é necessária para a descrição do fenômeno no pinçamento. Infelizmente, a maioria dos objetos que são interessantes de serem pinçados caem na faixa de 0.1 a 10λ , onde λ é o comprimento de onda do laser (as microesferas dielétricas são tipicamente do tamanho de 0.2 a $5\mu\text{m}$ que também é o tamanho de amostras biológicas que podem ser pinçadas diretamente). Em 2003, Mazolli, Maia Neto e Nussenzveig [42] calcularam as forças axial e transversa que uma pinça óptica exerce em uma microesfera com raio e índice de refração arbitrários. O nome da teoria é Teoria MDSA⁺ (iniciais de Mie-Debye Spherical Aberration Plus) e é a mais geral que existe na atualidade. Maiores detalhes da teoria podem ser encontrados nas referências [42,43].

2.3 Montagem e Medidas Experimentais

Na figura 2.7 uma representação da montagem experimental utilizada para a realização das medidas é apresentada. A montagem utilizada consiste basicamente na associação de um microscópio óptico invertido (NIKON *TE300*) operando em campo claro, com óptica corrigida no infinito, e dois lasers, sendo um infravermelho IV (modelo *YLR-S-1064-LP*, $\lambda = 1020 - 1120$ nm) e um laser de He-Ne (modelo *SP-127*, $\lambda = 632,8$ nm). Como pode ser visto na figura, os dois lasers percorrem caminhos ópticos ligeiramente distintos até atingirem a amostra, localizada no estágio do microscópio. Como amostra está representada uma microesfera aprisionada no poço de potencial da pinça. No centro da microesfera encontra-se o sistema de referência utilizado para as medidas, e a indicação da distância h entre o centro da bolinha e a lamínula. Abaixo da lamínula há um deslocador piezoelétrico acoplado ao estágio do microscópio, que possibilita que a amostra seja deslocada com precisão nanométrica nos eixos x, y e z . Além disso, são utilizados três espelhos na montagem. O espelho E1 é um espelho dicróico transparente ao laser de He-Ne e refletor ao laser IV. Acoplado a este espelho há um motor de passo,

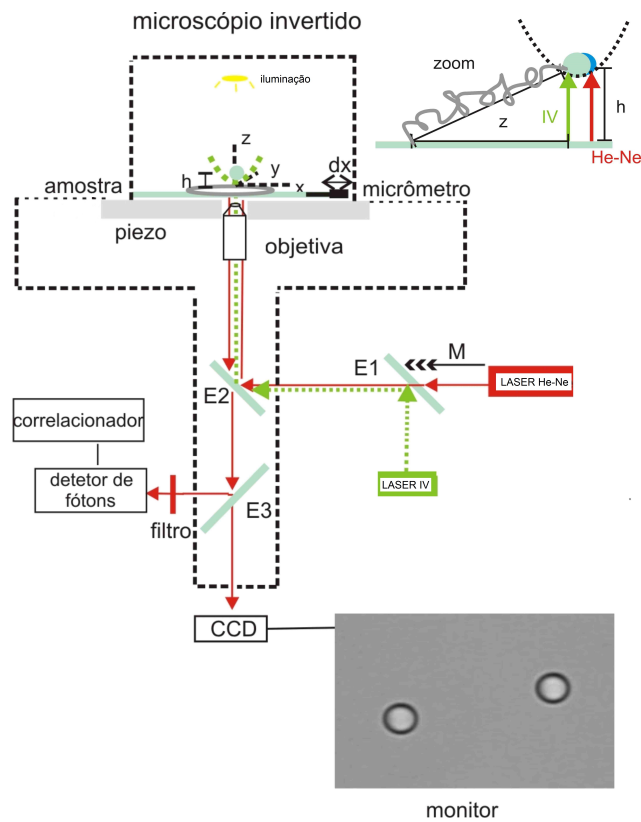


Figura 2.7: (a) Desenho esquemático da montagem experimental de pinça óptica do Laboratório de Física de sistemas biológicos.

representado pela letra M, que permite um ajuste fino na sua inclinação. O espelho E2 é composto por um espelho dicróico e um semi-espelho de forma a refletir o feixe IV para a objetiva e transmitir o feixe He-Ne. O espelho E3 é um espelho refletor para o laser de He-Ne. Após este espelho o feixe de luz retroespalhada passa por um filtro passa faixa centrado em 632 nm de 20 nm de largura. Esse garante que a luz coletada no detector seja exclusivamente proveniente do laser de He-Ne. A objetiva utilizada nos experimentos é uma objetiva com aumento de 100X e abertura numérica de 1.4. A objetiva é a responsável por focalizar o feixe de IV na amostra, originando a pinça óptica. Para o laser de He-Ne ela possui a função de coletar a luz retroespalhada pela amostra. Vê-se pela figura que uma parte desta luz retroespalhada vai para uma saída do microscópio, na qual está acoplada uma câmera e a outra parte desta luz vai para uma outra saída, na qual está acoplado o detector de fótons

e um correlacionador. O detector de fótons (EGG-Photo Counting Module, SPCM-200 – PQ – F500), possui abertura de 150 micrômetros de diâmetro e fica montado em um deslocador XY para ser posicionado no local de melhor razão sinal-ruído. Para cada fóton que chega ao detector, um pulso elétrico é enviado ao correlacionador digital (Brookhaven BI9000AT), que fornece as funções de autocorrelação temporal das flutuações de intensidade de luz retroespalhada pela microesfera da amostra.

Medidas Experimentais

A medida do comprimento de persistência do DNA, ou da flexibilidade entrópica do DNA, é feita a partir de estiramentos de moléculas únicas de DNA. Para entender como esta medida é realizada, é necessário entender primeiramente como a amostra de DNA é produzida. Todas as amostras consistem basicamente de moléculas de DNA imersas em um meio fisiológico (PBS - solução tampão, pH 7,4 e $[NaCl] = 150mM$), ao qual adiciona-se bolinhas de poliestireno com diâmetro de $3\mu m$. O DNA utilizado nos experimentos é o λ DNA, um DNA extraído de um vírus comumente utilizado em pesquisa. O λ DNA possui aproximadamente 48500 pares de base (pb) e a concentração utilizada nos experimentos foi de $C_{pb} = 11\mu M$. Seguindo um protocolo estabelecido por nosso grupo [3], e inspirado em [44], são produzidos sistemas de DNA+bolinha de forma que uma das extremidades do DNA é presa ao substrato onde a amostra é depositada (lamínula) e a extremidade livre é ligada a uma bolinha de poliestireno. Infelizmente, este protocolo é pouco efetivo e nem todas as moléculas adquirem esta configuração. Na figura 2.8(a) outras configurações possíveis são ilustradas, e em (b) a configuração desejada para o estiramento é representada.

Para realizar o estiramento seguimos os seguintes passos:

- 1) Após colocar a amostra no microscópio procuramos com a pinça óptica bolinhas de poliestireno que estejam executando movimento browniano. Esta procura é monitorada pela imagem fornecida pela câmera CCD, acoplada ao microscópio, conforme ilustrado na figura 2.7. Para descobrir se a bolinha encontrada está na configuração desejada, utilizamos a pinça para capturar a bolinha e em seguida puxá-la no plano xy da amostra, conforme ilustrado na

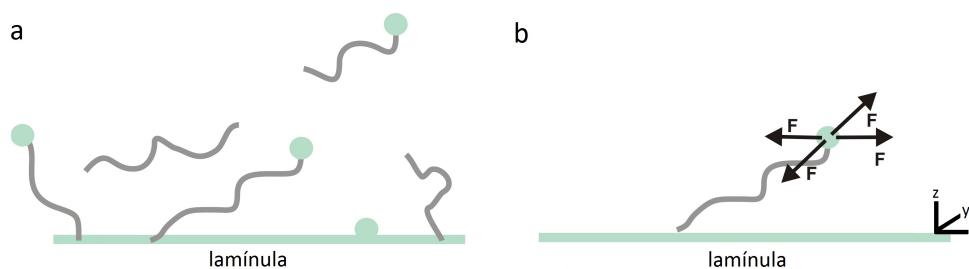


Figura 2.8: a) Configurações possíveis para as moléculas de DNA da amostra e b) Configuração desejada: a extremidade livre do DNA é presa à uma microesfera e a outra é presa à lamínula do microscópio. Após encontrar esta configuração, a molécula é estirada para todas as direções. Se o estiramento é o mesmo, temos um forte indício de que há apenas uma molécula presa à microesfera.

figura 2.8.b. Se durante o estiramento a bolinha desloca uma certa distância e repentinamente volta à sua posição inicial, então encontramos uma microesfera com a configuração desejada. Deixamos então a microesfera presa no potencial da pinça e partimos para a calibração da força da pinça. Esta etapa consiste basicamente em medir a constante de força da pinça (κ) e é realizada no início de cada experimento. Maiores detalhes podem ser vistos em [3]. Os valores para (κ) utilizado em nosso laboratório são da ordem de dezenas de nanoNewtons por centímetro, o que corresponde a forças da ordem de picoNewtons.

2) O próximo passo no procedimento experimental é determinar a curva de intensidade x estiramento para as moléculas de DNA, durante um estiramento controlado. Para isso o laser de He-Ne é ligado sobre a bolinha e o deslocador acoplado ao microscópio é utilizado para controlar o deslocamento. Como está ilustrado na figura 2.9(b), o deslocamento ocorre ao longo do eixo x e quem desloca é o estágio do microscópio, e portanto, a amostra, deixando a pinça e o laser de He-Ne fixos nas suas posições iniciais. Durante o deslocamento a luz retroespalhada pela bolinha I é coletada em função do tempo. Este procedimento é repetido ao menos 4 vezes para cada sistema DNA+bolinha encontrado.

Para transformar a curva de intensidade x tempo em um gráfico de força

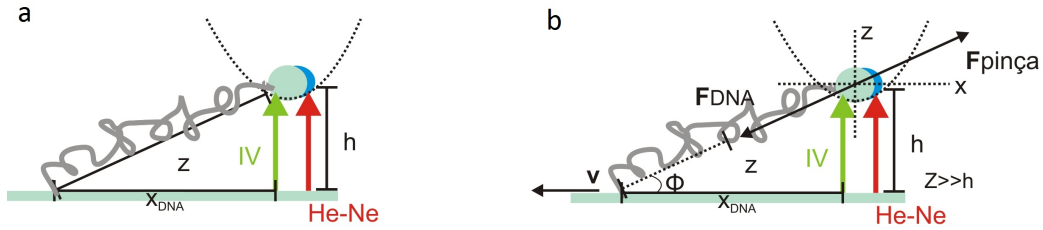


Figura 2.9: (a) Esquema mostrando como são realizadas as medidas de estiramento de moléculas únicas de DNA. É importante notar que denotamos x como a posição do centro da microesfera no poço potencial e por x_{DNA} o estiramento da molécula de DNA. (b) F_{pinca} é a força que a pinça óptica exerce sobre a microesfera quando esta é afastada de sua posição de equilíbrio. No entanto, esta força é igual em módulo à força exercida pela molécula de DNA durante o estiramento.

x estiramento, transformamos inicialmente o eixo x (tempo) em extensão absoluta ao longo do eixo (paralelo ao estágio do microscópio), o qual denominamos x_{DNA} . Esta extensão é facilmente encontrada, já que a velocidade do estágio do microscópio é conhecida ($v = 58 \text{ nm/s}$). Esta velocidade é baixa o suficiente para garantir que o DNA passe pelas configurações de equilíbrio e de forma que a força de Stokes sobre a microesfera possa ser desprezada. A distância entre as extremidades da molécula de DNA z é relacionada ao x_{DNA} através de:

$$z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2} \quad (2.4)$$

e a microesfera de poliestireno é mantida a uma distância fixa do estágio do microscópio ($h = 3,5 \mu\text{m}$) durante todo o experimento. Um gráfico de intensidade x deslocamento está representado em 2.10(a). Por este vemos que o DNA é continuamente estirado até um certo tamanho $x \sim 22 \mu\text{m}$, a partir do qual o estiramento vai subitamente a zero. Este decaimento corresponde ao momento em que a distância entre as extremidades do DNA (z) se aproxima ao comprimento de contorno do DNA (L). Neste ponto o DNA exerce uma força contrária à força de estiramento, capaz de retirar a bolinha do poço de potencial da pinça.

Como último passo convertemos a intensidade de luz retroespalhada em força aplicada ao DNA. Para isso, escrevemos a posição x em função da

intensidade I , de forma a determinar a posição da microesfera em cada instante no perfil de estiramento. Em seguida, determinamos a posição inicial x_0 (correspondente à intensidade inicial no perfil de estiramento) e a variação de posição para cada ponto, dada por $\Delta x = x - x_0$. Finalmente, a força na direção x é determinada multiplicando-se a variação de posição pela constante de força da pinça óptica, ou seja, $F_x = \kappa \Delta x$. É importante frisar que chamamos de x a posição do centro da microesfera no poço potencial e por x_{DNA} o estiramento da molécula de DNA.

A força calculada é a força que a pinça óptica exerce sobre a microesfera, quando esta é afastada de sua posição de equilíbrio. No entanto, assim como ilustrado a figura 2.9(b,) esta força é igual em módulo à força exercida pela molécula de DNA para afastar a bolinha da posição de equilíbrio. Sendo assim, obtemos uma curva que mostra a força em função da extensão para a molécula de DNA.

A figura 2.10(b) mostra uma curva típica de força x estiramento obtida com o procedimento narrado acima. Vê-se que o comportamento do estiramento em função da força é do tipo $1/(F_x^{1/2})$, o que é uma assinatura clara da elasticidade do modelo WLC. Fazemos o ajuste desta curva com a expressão teórica de Marko e Siggia [32] (eq. 2.2) para obtermos o comprimento de contorno L e o comprimento de persistência A da molécula de DNA e dos complexos DNA-CD.

Mais especificamente, como trabalhamos experimentalmente na direção x , somente a componente x da equação de força é utilizada para fazer o ajuste. Esta componente é determinada conhecendo-se a altura fixa da microesfera em relação à lamínula. Na figura 2.9 a extensão do DNA é dada pela equação 2.4 e

$$F_x = F \cos \phi = F \left(\frac{x_{DNA}}{z} \right) \quad (2.5)$$

Fazendo estas considerações, a expressão final da componente x da força é:

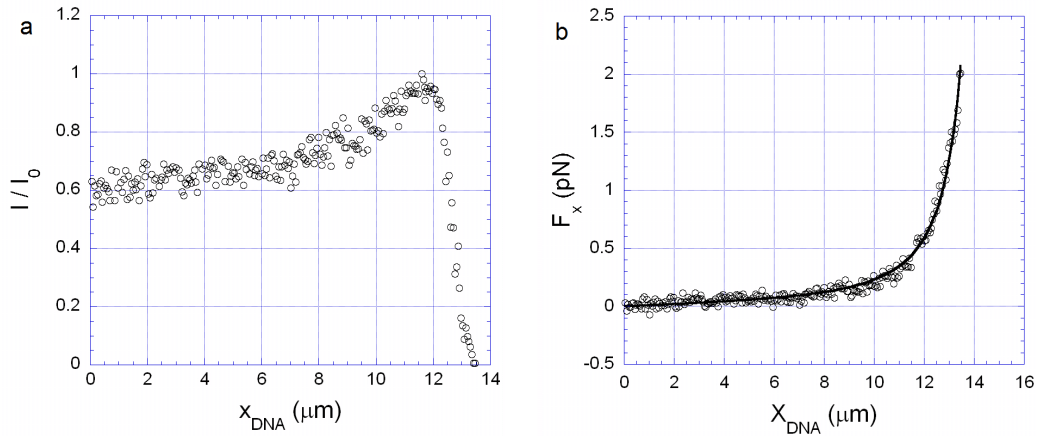


Figura 2.10: (a) Intensidade versus estiramento e (b) Força versus estiramento para um DNA puro com o ajuste da equação de Marko e Siggia. Gráficos retirados de [29].

$$F_x = \frac{\kappa_B T}{A} \left[\frac{(x_{DNA}^2 + h^2)^{\frac{1}{2}}}{L_c} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{(x_{DNA}^2 + h^2)^{\frac{1}{2}}}{L_c}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{(x_{DNA}^2 + h^2)^{\frac{1}{2}}}, \quad (2.6)$$

Na equação, F_x é a componente x da força, κ_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, A o comprimento de persistência do DNA, L_c o seu comprimento de contorno, h a altura da microesfera em relação ao estágio do microscópio. Vemos que o ajuste concorda muito bem com o dado experimental.

Durante o mestrado a estudante realizou medidas do comprimento de persistência de moléculas únicas de DNA complexadas com diferentes concentrações da CD catiônica (*6-monodeoxy-6-monoamine-β-ciclodextrin*). Para complementar estas medidas o professor Márcio Rocha (UFV), co-orientador de mestrado da estudante, realizou medidas do comprimento de persistência de DNA com diferentes concentrações da β -ciclodextrina neutra. Em ambos casos a equação 2.2 foi utilizada para ajustar as curvas e força x extensão obtidas a partir dos experimentos de estiramento de moléculas de DNA. Os resultados para A e L obtidos para os complexo de DNA/CD serão apresen-

tados no capítulo seguinte, junto ao novo método de análise desenvolvido no doutorado da estudante.

Capítulo 3

Método 1: Desenvolvimento e Resultados

A partir de medidas de elasticidade entrópica de complexos de DNA desenvolvemos um novo método de análise para o comprimento de persistência da molécula do bacteriófago λ . Utilizando este método ajustamos os nossos dados experimentais para interação DNA/CD monovalente e obtivemos informações sobre o processo de ligação, além de parâmetros químicos da reação. Com o intuito de testar a validade do método para outros ligantes, ajustamos também os dados do comprimento de persistência de complexos de DNA-HU para diferentes concentrações de HU, um pequeno dímero (19kDa) que se liga de forma não específica ao DNA, como explicado nas seções seguintes. Estes dados foram retirados de experimentos realizados por J. van Noort *et al.*, publicados em 2004 no trabalho “*Dual architectural roles of HU: Formation of flexible hinges and rigid filaments*” [45].

3.1 Resultados Experimentais

3.1.1 Ciclodextrina

Durante o mestrado da estudante foram realizadas medidas do comprimento de persistência de complexos de DNA-CD para diferentes concentrações de CD. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, para β -CD

neutra e β -CD monovalente, utilizando as seguintes concentrações de ciclodextrina: 11, 22, 33, 44, 55 e 66 μM .

Na figura 3.1 os dados para o comprimento de persistência (A) em função da concentração total de ligantes em solução (C_T) para as ciclodextrinas neutra (círculos vermelhos) e monovalente (círculos azuis) são apresentados. Cada ponto experimental corresponde a uma média sobre quatro moléculas de DNA diferentes, sendo que cada uma é estirada quatro vezes. Como pode ser visto, para a faixa de concentrações utilizadas não há nenhuma interação visível entre a CD neutra e o DNA, já que o comprimento de persistência assume valores em torno de 50 nm, que é o valor típico de A para o λ -DNA puro utilizado nos experimentos. No entanto, para a CD catiônica o comprimento de persistência se comporta de forma não usual. Nota-se que este comportamento é não-monotônico, apresentando valores decrescentes para pequenas concentrações, seguido de valores crescentes para concentrações maiores. Além disso, quando a concentração crítica é atingida ($C_T = 55 \mu\text{M}$), o comprimento de persistência decresce abruptamente de 160 nm para 7 nm, permanecendo constante para concentrações ainda maiores de ciclodextrina. Para o comprimento de contorno (L), nenhuma alteração significativa foi observada. Para o caso da CD monovalente, por exemplo, a média dos valores obtidos para todas as concentrações foi de $\bar{L} = 18 \pm 2 \mu\text{m}$. Como este valor é próximo ao comprimento de contorno do λ -DNA puro ($L \sim 16 \mu\text{m}$), é seguro dizer que as concentrações de ciclodextrina utilizadas não provocam mudanças no comprimento de contorno do DNA.

3.1.2 Proteína HU

Um comportamento não monotônico para o comprimento de persistência também foi observado na interação entre DNA e a proteína bacteriana HU [45,46]. A proteína HU é uma das proteínas mais abundantes na *Escherichia coli* e acredita-se que ela desenvolve um papel importante na regulação e organização nuclear da bactéria, via modulações na estrutura do DNA. A proteína é um pequeno dímero (19kDa) que se liga de forma não específica ao DNA, cobrindo um sítio de cerca de 8 – 9 pares de bases. No artigo de John van Noort *et al.* [45] os autores utilizam pinças magnéticas e medidas

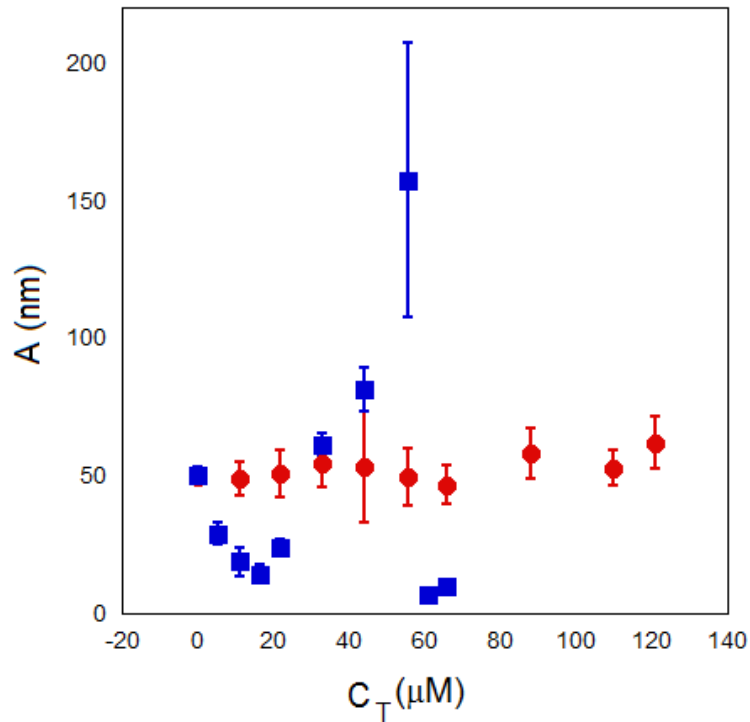


Figura 3.1: Comprimento de persistência em função da concentração total de ciclodextrina em solução. Os quadrados em azul representam os valores obtidos para a ciclodextrina monovalente e os pontos em vermelho representam os valores medidos para a ciclodextrina neutra.

de AFM para quantificar a indução de flexão (*bending*) no DNA, via a interação com proteínas HU. Como resultado, os autores observam que a HU pode gerar dois efeitos contrários, dependendo da concentração utilizada. Na figura 3.2(a) temos o gráfico para o comprimento de persistência em função da concentração de HU em solução. Assim como observado em nossos experimentos com a CD monovalente, conforme a concentração de HU aumenta, o comprimento de persistência varia de forma não monotônica, enquanto L permanece inalterado (gráfico em [45]).

Segundo Noort, para concentrações de HU menores do que 100 nM, unidades individuais do dímero induzem um aumento na flexibilidade do DNA, proporcionando sua compactação (figura 3.2(b)). No entanto, para concentrações maiores que 100 nM um filamento rígido de DNA+HU é formado, no

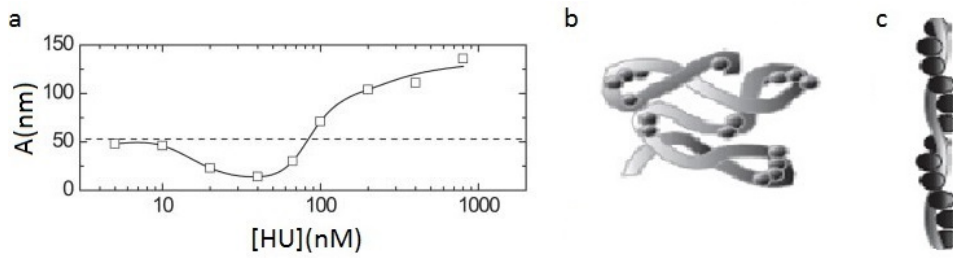


Figura 3.2: (a) Comprimento de persistência em função da concentração total de HU em solução. As linhas são somente guias para os olhos. (b) Ilustração de um DNA condensado por unidades individuais de HU. (c) Ilustração de um filamento rígido de DNA ligado a dímeros de HU (esferas) de forma helicoidal. As figuras a e c foram retirados de [45].

qual as proteínas de HU parecem se ligar de forma helicoidal à molécula de DNA (figura 3.2(c)). Para complementar estas medidas, imagens de AFM foram realizadas para diferentes concentrações de HU em solução. Conforme ilustrado na figura 3.3(a-d), a partir das imagens foi possível medir os ângulos de curvatura induzidos pela ligação de dímeros de HU. Segundo Noort, os ângulos medidos apresentaram uma larga distribuição entre 0 e 180° graus, o que está de acordo com relatos anteriores que prevêm ângulos entre 105° e 139° [45]. Um outro trabalho sobre a interação DNA-HU foi realizado por Sagi *et al.* [46], no qual a técnica de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) é utilizada para analisar a indução de flexão no DNA via moléculas de HU. Assim como observado por Noort, as medidas de Sagi mostraram um comportamento não monotônico para a elasticidade do DNA em função da concentração de HU. Além disso, Sagi faz uma estimativa do ângulo de curvatura induzido no DNA pela ligação de um único dímero de HU e encontra um ângulo de 53°.

Alguns anos após os experimentos de Noort e Sagi, Rappaport *et al.* [47] formularam um modelo para explicar a indução de flexão no DNA via a ligação não específica de proteínas. Os autores trabalham com a ligação de dímeros de HU ao DNA e para explicar o comportamento experimental observado anteriormente [45,46], é proposto um modelo no qual a proteína HU induz uma curvatura espontânea no DNA, resultando em um comprimento de persistência local menor do que o usual. Para maiores concentrações de

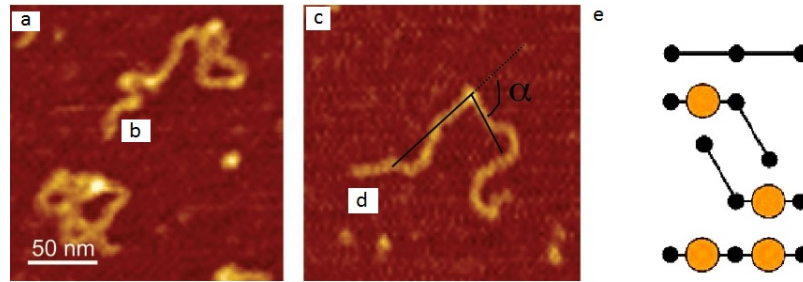


Figura 3.3: (a, b, c) Zooms de DNAs de 1000 pares de base (pb) incubados com uma concentração de 18 nM de HU (1 dímero por 92 pb). Em (d) temos a representação de como foi medido o ângulo de curvatura induzido pelas proteínas HU. (e) Esquema representando o modelo proposto por Rappaport *et al.*, retirado de [47].

HU, quando dois dímeros de HU se tornam vizinhos próximos, eles enrijecem o DNA e provocam um aumento do comprimento de persistência local. Um esquema do modelo proposto pode ser visto na figura 3.2(e): o polímero é formado por segmentos (sítios) rígidos conectados entre si por junções flexíveis, e o ângulo (θ) de flexão preferido entre dois segmentos vizinhos depende se o sítio está ocupado ou não. Se dois sítios vizinhos não estão ocupados tem-se que $\theta = 0$. Se um está ocupado e outro livre, um ângulo θ finito e uma curvatura espontânea são gerados. Finalmente, se dois sítios vizinhos são ocupados, então $\theta = 0$ novamente. O modelo reproduz o comportamento não monotônico do comprimento de persistência e prevê uma cooperatividade negativa entre os dímeros, de forma que a probabilidade de uma proteína se ligar a um sítio do DNA é reduzida se o sítio vizinho está ocupado.

No entanto, Sagi *et al.* [46] mencionam em seu trabalho que a ligação de uma única proteína ao DNA não é capaz de produzir os grandes ângulos de curvatura observados experimentalmente, de forma que uma cooperatividade positiva deve existir. Neste sentido, eles estimam que a ligação de quatro ou cinco moléculas adjacentes de HU ao DNA é necessária para causar o efeito observado. Além disso, eles consideram que com o aumento da concentração de HU estes grupos se fundem e dão origem aos filamentos rígidos de DNA-HU observados [45].

Inspirados nas idéias discutidas acima desenvolvemos um modelo estatís-

tico de desordem do tipo *quenched*, combinado com a equação de Hill, capaz de reproduzir o comportamento não monotônico dos dados experimentais para o comprimento de persistência. O método se traduz em uma equação que ajusta os dados para DNA-CD e DNA-HU muito bem, retornando valores quantitativos para parâmetros químicos da reação.

3.2 Modelo Proposto

A dedução do modelo é apresentada em três partes. Primeiro definimos os grupos-ligados (*bound-clusters*), que são as unidades fundamentais da nossa proposta. Em seguida descrevemos a interação entre as moléculas de DNA e CD, e a conseqüente formação dos grupos-ligados, utilizando a equação de cooperatividade de Hill. Por fim, para simular o efeito dos grupos-ligados no comprimento de persistência do DNA, propomos um modelo estatístico de desordem do tipo *quenched* para dois sítios, e obtemos então uma equação para o comprimento de persistência do DNA. Ao combinar os resultados do segundo e terceiro passos chegaremos então à equação final que representa o nosso modelo.

Primeiro passo: grupos-ligados ou *bound-clusters*

Para explicar o comportamento não monotônico do comprimento de persistência observado para ambos HU e CD sugerimos um modelo baseado na ligação em grupos-ligados (*bound-cluster*). Um grupo-ligado é uma unidade composta por um número n de ligantes (CD ou HU) ligados ao DNA. Propomos que a formação de um único grupo-ligado torna o DNA mais flexível, diminuindo localmente o comprimento de persistência do DNA para um valor $A_1 < A_0$, sendo A_0 o valor para o comprimento de persistência do DNA puro. No entanto, quando ocorre a formação de grupos-ligantes vizinhos, o DNA torna-se localmente mais rígido e assume um comprimento de persistência $A_2 > A_0$. Partindo destas definições, para modelar o efeito não monotônico observado experimentalmente é necessário fazer três suposições:

- os grupos-ligados são distribuídos de forma aleatória ao longo da cadeia de DNA;

- a distribuição de tamanho dos grupos-ligados é uma distribuição estreita, com um tamanho médio de n ligantes por grupo;
- o número de grupos-ligados aumenta com a concentração de ligantes em solução, porém mantendo sempre o tamanho médio n . Desta forma, um grupo com tamanho duplo ocorre quando dois grupo-ligados são vizinhos, e não devido ao crescimento do grupo em si.

Para avaliar a efetividade destas suposições, analisamos alguns cenários físicos nos quais grupos de proteínas ou colóides podem ter tamanho estável n , de forma que um aumento na concentração de ligantes provoca um aumento da quantidade de grupos, mas não no tamanho do grupo. Conforme relatado por Strander *et al.* [48], este é o caso de um sistema no qual coexistem uma atração de curto alcance e uma repulsão de longo alcance. Considerando a ligação das CD monovalentes ao DNA, vemos que este balanço de forças pode existir. Neste caso, a interação atrativa ocorreria entre os ligantes, mediada pela interação elástica com o DNA, e seria a responsável pela formação dos grupos-ligados. Combinada a isso, uma repulsão eletrostática entre grupos poderia ocorrer devido à cargas residuais das CDs catiônicas. Apesar do comprimento de Debye para a solução utilizada ($[NaCl] = 150mM$) ser da ordem de $\sim 1nm$, a repulsão resultante entre os grupos pode ser suficiente para estabilizar o tamanho dos grupos-ligantes ao longo da cadeia de DNA. Um outro cenário físico coerente com as suposições propostas é o rápido processo de ligação que ocorre em sistemas com conservação de massa. Neste caso, vários grupos-ligados seriam simultaneamente formados ao longo da molécula de DNA, consumindo rapidamente todos os ligantes disponíveis em solução. O processo resulta em uma distribuição de tamanho muito estreita para os grupos-ligados aleatoriamente distribuídos ao longo do DNA. Este cenário é condizente com nosso método de preparação de amostras, no qual a solução de ligantes é injetada na solução de DNA de forma rápida e enérgica, similarmente ao processo de nucleação de partículas [49].

Segundo passo: a equação de Hill

Para descrever a interação entre as moléculas de DNA e CD e a conseqüente formação dos grupos-ligados utilizamos a equação de cooperatividade de Hill.

Esta equação, derivada empiricamente por Archibald Hill em 1910 [50] para descrever o caráter sigmóide da curva de ligação de moléculas de oxigênio à hemoglobina, é comumente usada nas áreas de bioquímica, fisiologia e farmacologia para analisar o equilíbrio de ligação entre interações do tipo ligante-receptor [51]. Respostas sigmóides são geralmente vistas em interações que envolvem receptores multiméricos, ou seja, receptores compostos pela repetição de subunidades, e portanto, compostos por mais de um sítio. Neste tipo de interação, quando um sítio é ocupado por um ligante, a afinidade de ligação dos sítios restantes pode ser afetada, caracterizando uma cooperatividade. Se a ligação de um ligante induz um aumento na afinidade de ligação de ligantes subseqüentes, então tem-se cooperatividade positiva. Como mencionado acima, este é o caso observado por Sagi *et al.* [46] nas interações DNA/HU. Ao contrário, quando a ligação de um ligante provoca uma diminuição na afinidade de ligação de ligantes subseqüentes, tem-se então uma interação com cooperatividade negativa.

Para a derivação da equação de Hill analisamos a interação entre um receptor multimérico (R) de n subunidades, com um sítio por subunidade, e ligantes (L). Vamos supor que quando o primeiro ligante se liga a um sítio do receptor, a afinidade de ligação dos sítios restantes muda de tal forma que todos os ligantes remanescentes se ligam simultaneamente. Esta reação pode ser representada da seguinte forma:



No equilíbrio, teremos que:

$$k_d = \frac{[R][L]^n}{[RL]}, \quad (3.2)$$

onde k_d é a constante de dissociação e os símbolos $[]$ representam as respectivas concentrações de receptores e ligantes. Nesta situação, a concentração total de receptores será dada por $[R_T] = [R] + [RL]$, de forma que a razão entre as concentrações de receptores (ou sítios) ligados e totais será dada por:

$$r_{hill} = \frac{[RL]}{[R] + [RL]} = \frac{[L]^n}{k_d + [L]^n} = \frac{\frac{[L]^n}{k_d}}{1 + \frac{[L]^n}{k_d}}, \quad (3.3)$$

Esta é a equação de Hill, e n é chamado de expoente de Hill. Para valores de n menores, iguais ou maiores do que 1, tem-se cooperatividade negativa, nula e positiva, respectivamente. Além disso, o valor de n indica o número mínimo de sítios (ou ligantes) cooperativos envolvidos na interação. É comum representar a equação 3.3 em termos da constante k_H , que é a constante de dissociação quando $r_{hill} = 0.5$. Neste caso, obtemos que $[k_H] = (k_d)^{\frac{1}{n}}$ e a equação de Hill é reescrita como:

$$r_{hill} = \frac{\left(\frac{[L]}{k_H}\right)^n}{1 + \left(\frac{[L]}{k_H}\right)^n}, \quad (3.4)$$

No nosso modelo definimos C_f e C_b como as concentrações de ligantes livres e ligados, respectivamente, e a concentração total de ligantes em solução C_T é então dada por $C_T = C_f + C_b$. Como já dito anteriormente, C_{pb} é a concentração total de pares de base (ou sítios) em solução. Sendo assim, a fração entre ligantes ligados e o total de sítios é dada por $r = C_b/C_{bp}$. Além disso, como consideramos que cada ligante ocupa um único sítio do DNA, a quantidade de sítios ligados é proporcional a concentração de ligantes ligados, e portanto, a razão entre sítios ligados e sítios totais também é dada por r . Chamando de r_{max} a máxima fração de sítios (ou ligantes) ocupados (ligados), a probabilidade de um sítio estar ocupado é definida como r/r_{max} e será dada pela equação de Hill (eq.3.5), onde $r_{hill} \equiv r$:

$$r = \frac{r_{max} \left(\frac{C_f}{k_H}\right)^n}{1 + \left(\frac{C_f}{k_H}\right)^n} \equiv r_{max} H(C_f). \quad (3.5)$$

Quando aplicada ao nosso modelo, é importante notar duas particularidades da equação de Hill. Primeiro, no nosso modelo n é uma medida do número mínimo de ligantes cooperativos envolvidos, e portanto, representa o tamanho médio dos grupos-ligados. Segundo, a fração r/r_{max} é a mesma para moléculas-ligadas ou grupos-ligados, já que a relação entre grupos e moléculas é somente uma constante.

Geralmente, a concentração livre de ligantes em solução não é um valor sabido e tem-se somente acesso ao valor para a concentração total C_T . Técnicas experimentais como diálise de equilíbrio, microcalorimetria e técnicas

de microscopia ópticas podem estimar C_f a partir de C_T . No entanto, estas técnicas não são facilmente aplicadas dependendo do ligante estudado. Durante o doutorado da estudante foram realizadas várias medidas experimentais utilizando as técnicas de calorimetria, absorção óptica e microscopia de fluorescência, na tentativa de se determinar a concentração de ligantes livres em solução. No entanto, possivelmente devido à presença de cargas elétricas em solução, nenhuma medida retornou resultados reprodutivos, o que motivou o desenvolvimento deste trabalho. Para driblar este problema, pode-se usar $C_f = C_T - rC_{bp}$ e resolver a equação de Hill $r = r_{max}H(C_T - rC_{bp})$. Esta equação pode ser resolvida de forma recursiva e possui uma solução única de ponto fixo, conforme condições estabelecidas no Apêndice C. Neste sentido, para a aproximação de ordem zero temos que:

$$H_0(C_f) \simeq H(C_T), \quad (3.6)$$

e para a aproximação de primeira ordem,

$$H_1(C_f) \simeq H[C_T - C_{bp}r_{max}H(C_T)]. \quad (3.7)$$

Isto posto, é possível determinar a probabilidade de um sítio estar ocupado via iterações da equação de Hill.

Terceiro passo: modelo estatístico de desordem do tipo *quenched*

Seguindo no desenvolvimento do nosso modelo, para simular o efeito dos grupos-ligados no comprimento de persistência do DNA propomos um modelo estatístico de desordem do tipo *quenched* para dois sítios. Muitos modelos estatísticos para sistemas físicos possuem algum grau de aleatoriedade, e dependendo das escalas de tempo envolvidas podemos classificar o tipo de desordem do sistema. Quando a variável aleatória estiver associada a escalas de tempo muito longas em relação às demais variáveis do sistema, e portanto podendo ser considerada como um parâmetro fixo, temos uma desordem do tipo *quenched*, ou desordem congelada em português. Diferentemente, quando a escala de tempo da variável aleatória é comparável às demais escalas de tempo envolvidas no sistema, temos uma desordem do tipo *annealed*, ou móvel em português.

Neste trabalho utilizamos um modelo de desordem *quenched*, pois assumimos que os ligantes se ligam de forma aleatória ao DNA, mas permanecem fixos no sítio ao qual se ligam. Definimos então a distribuição de probabilidade de um sítio estar ocupado (P) da forma mais simples possível, supondo que cada segmento do DNA possui somente dois sítios e que um grupo-ligante pode aleatoriamente se conectar a qualquer sítio. Sendo assim, cada sítio do segmento é ocupado com probabilidade $x = \frac{r}{r_{max}}$, e um segmento sem sítios ocupados é caracterizado por um comprimento de persistência $A_0 = \beta K_0$ e possui probabilidade $(1 - x)^2$ de ocorrer. Além disso, um segmento se torna muito flexível quando ocupado somente por um único grupo-ligante, o que ocorre com probabilidade $2x(1 - x)$ e é caracterizado por um comprimento de persistência A_1 . Finalmente, quando os dois sítios de um segmento são ocupados, o que ocorre com probabilidade x^2 , o segmento se torna localmente rígido e adquire o comprimento de persistência A_2 . Utilizando esta abordagem obtemos então a equação para o comprimento de persistência do DNA:

$$\frac{1}{A} = \frac{(1 - \frac{r}{r_{max}})^2}{A_0} + \frac{2r}{r_{max}} \frac{(1 - \frac{r}{r_{max}})}{A_1} + \frac{(\frac{r}{r_{max}})^2}{A_2} = \frac{1}{A_0} + (\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0}) (\frac{r}{r_{max}}) + (\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2}) (\frac{r}{r_{max}})^2. \quad (3.8)$$

Detalhes da dedução desta equação podem ser visto no Apêndice *B* desta tese.

Substituindo as equações 3.5 e 3.7 na equação 3.8, temos a seguinte expressão para o comprimento de persistência efetivo, em função da concentração total de ligantes C_T ,

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + (\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0}) (H[C_T - C_{bp} r_{max} H(C_T)]) + (\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2}) (H[C_T - C_{bp} r_{max} H(C_T)])^2. \quad (3.9)$$

Esta equação pode ser ajustada ao dado experimental de A , com quatro parâmetros ajustáveis (A_1 , A_2 , k_H e n), para valores A_0 e r_{max} conhecidos. A equação 3.9 é o principal resultado do método desenvolvido, pois ela possibilita extrair informação sobre os dados de interação DNA/ligante a partir

somente de medidas mecânicas. Para valores cada vez maiores de C_{pb} a convergência da equação de Hill pode requerer um número maior de iterações, e o uso de $H_{m+1} = H[C_T - r_{max}C_{bp}H_m(C_T)]$ na Eq. 3.9.

3.3 Ajustes e Conclusões

3.3.1 Ciclodextrina

Na figura 3.4 é mostrado o dado experimental para a interação DNA/CD catiônica e o ajuste utilizando a Eq.3.9, para os valores fixos $A_0 = 50$ nm e $r_{max} = 0.67$. O valor para r_{max} é calculado sabendo-se que o diâmetro da molécula de β -CD é aproximadamente 1.5 nm, e portanto, cobre três fosfatos ao longo da cadeia de DNA, que estão separados por cerca de 0.5 nm (figura 2.3). Sendo assim, a fração máxima de CD ligadas em cada fita do DNA é 1/3 e para duas fitas este valor é $2/3 \sim 0.67$. O ajuste, que é consideravelmente melhor utilizando a primeira ordem do que utilizando a ordem zero da equação de Hill, é robusto e retorna os seguintes parâmetros:

$$A_1 = 7.9 \pm 0.2nm; \quad A_2 = 125 \pm 20nm; \quad k_H = 9.6 \pm 0.3\mu M; \quad n = 3.45 \pm 0.15.$$

Se $r_{max}C_{bp}$ também é utilizado como parâmetro livre, um ajuste ligeiramente melhor é obtido ($r_{max}C_{bp} = 8.2 \pm 1.9 \mu M$), porém ao custo de um aumento nas incertezas dos parâmetros. Se consideramos $r_{max} = 0.67$, então obtemos $C_{bp} = 12.2 \pm 2.8 \mu M$, o que está de acordo com o valor experimental para a concentração de pares de base $C_{bp} = 11 \mu M$. Sendo assim, os ajustes retornam parâmetros realistas e coerentes, além de apresentarem pequenas incertezas. Como pode ser observado, os últimos dois pontos experimentais da Fig.3.1 não foram incluídos nos ajustes, já que acreditamos que eles correspondem à desnaturação do DNA [52]. O modelo desenvolvido ainda não inclui este efeito e é aplicável somente em DNA de fita dupla.

Os resultados dos ajustes realizados permitem duas conclusões importantes sobre a interação DNA/CD. Primeiro, o fato do ajuste não ser possível para ($n=1$), que corresponde ao caso de nenhuma cooperatividade, implica que existe cooperatividade entre as moléculas de CD. Segundo, o fato do ajuste ser possível com um único k_H indica que a interação é um processo

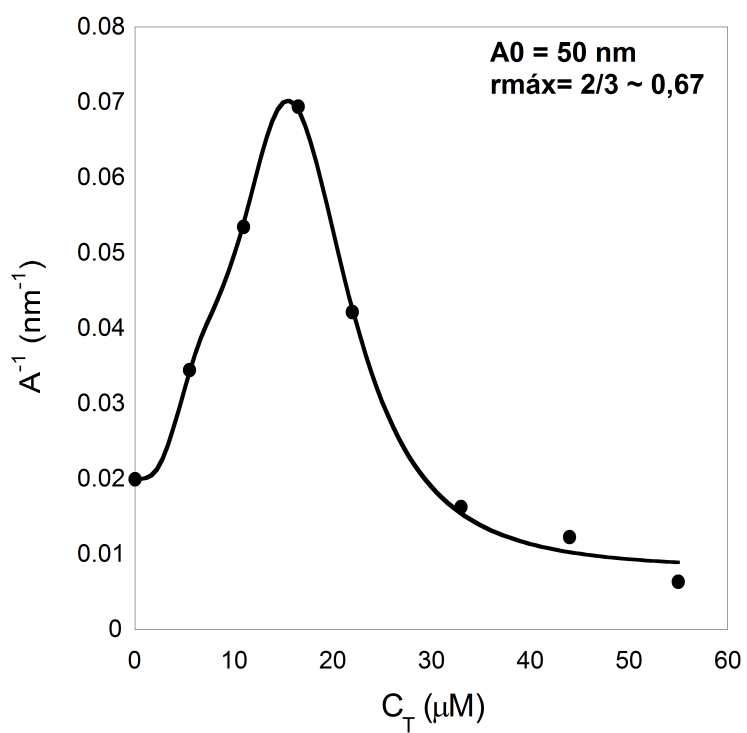


Figura 3.4: Inverso do comprimento de persistência em função da concentração total de ciclodextrina em solução. Os pontos representam os pontos experimentais e a curva contínua é o ajuste utilizando a equação 3.9.

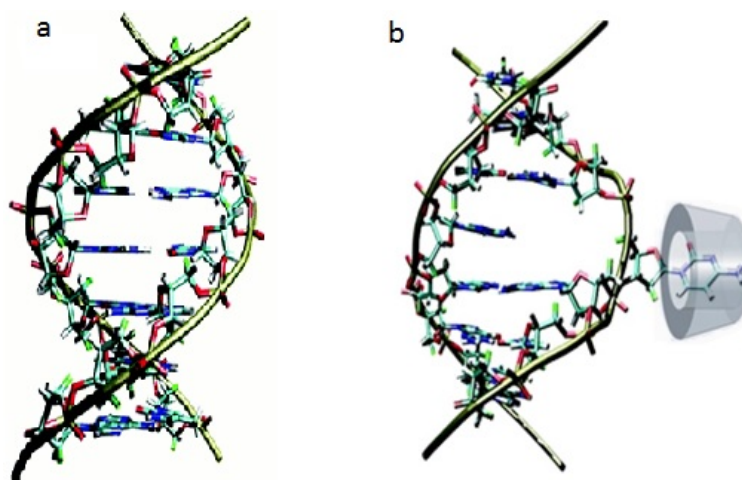


Figura 3.5: (a) Representação de uma cadeia de DNA em sua configuração normal e (b) com uma base purina "flipada" formando um complexo de inclusão com a CD monovalente. A proporção entre os tamanho não foi mantida para melhor representação da ligação.

que ocorre somente com um modo de ligação. Isto posto, propomos um cenário físico para explicar a interação DNA/CD no qual o modo de ligação entre as moléculas ocorre via complexos de inclusão. Como mencionado no capítulo 2, devido à organização molecular das ciclodextrinas, estas moléculas possuem uma cavidade interna hidrofóbica capaz de acomodar polímeros, formando assim complexos de inclusão do tipo hóspede-hospedeiro (*host-guest complex*). Inspirados no trabalho de Spies *et al.* [53], propomos um cenário no qual a CD forma complexos do tipo hóspede-hospedeiro com bases purinas do DNA (adenina e guanina), que possuem tendência natural de "flipar" (do inglês *to flip*), ou girar, para fora da cadeia. Além disso, quando o complexo é formado ocorre uma desnaturação local do DNA. Segundo Spies, a taxa natural com que as bases do DNA "flipam" é da ordem de $10^{-5} s^{-1}$. No entanto, na presença de β -CDs este valor aumenta pelo menos 100 vezes, indicando que a formação dos complexos induz de fato uma desestruturação da cadeia de DNA. Este modo de ligação está ilustrado na figura 3.5, na qual uma base purina do DNA acomoda-se na cavidade hidrofóbica da molécula da CD, formando um complexo estável, porém induzindo uma desnaturação local do DNA.

A desnaturação local é acompanhada por uma diminuição no comprimento de persistência do DNA, e conforme o DNA vai sendo "decorado" por outras CDs, é esperado que A diminua cada vez mais, porém mantendo-se sempre acima do valor de A para uma molécula de DNA totalmente desnaturada. O valor do comprimento de persistência medido para uma fita única é entre 1.5 – 3 nm [57], e portanto, estima-se que um DNA de dupla fita desnaturado apresente um comprimento de persistência da ordem de 3 – 6 nm. Pelo nosso ajuste, o valor encontrado para a situação em que o DNA está com o número máximo de CDs ligadas é $A_1 = 7.9 \pm 0.2$ nm, o que está de acordo com nossa interpretação. Já para o alto valor encontrado para o comprimento de persistência A_2 acreditamos que é possivelmente devido a interações entre CDs, ou devido à efeitos de exclusão de volume.

O expoente de Hill obtido pelos ajustes, $n = 3.45 \pm 0.15$, indica que a interação DNA-CD exibe uma cooperatividade positiva, e sugere que os grupos-ligados são compostos por no mínimo, três ou quatro moléculas. Como é sabido, o processo de desnaturação é um processo cooperativo, de forma que quando um par de bases do DNA é desnaturado por um grupo de CDs, o par de bases vizinho se torna mais sujeito a desnaturar, aumentando portanto a taxa com que suas bases purinas "flipam" para fora do DNA, conseqüentemente possibilitando a formação de complexos do tipo hóspede-hospedeiro entre DNA-CD. Uma evidência que reforça esta interpretação física é que para $C_T > 55 \mu\text{M}$ há um decréscimo abrupto nos dados experimentais do comprimento de persistência, que passa a assumir valores médios de $A_3 = 8.5 \pm 4.2$ nm, que pode ser associado com a desnaturação do DNA [52]. Sendo assim, o valor para A após a queda abrupta deve de fato ser próximo ao valor de A_1 . Como pode ser visto pela equação Eq. 3.8, conforme a fração de ligantes se aproxima do valor para r_{max} , o comprimento de persistência começa a assumir valores maiores ($A_2 > A_0$). No entanto, próximo à saturação, que ocorre quando $\sim 70\%$ ($r_{max} = 0.67$) da cadeia de DNA é coberta por CDs, a molécula de DNA começa a se tornar estruturalmente instável, de forma que qualquer perturbação externa (como a própria força de estiramento da pinça) pode causar a desnaturação do DNA, explicando a queda abrupta em A .

A análise dos dados de comprimento de persistência para os complexos

DNA/CD neutra também concorda com o cenário físico que propusemos anteriormente. A CD neutra também forma complexos do tipo hóspede-hospedeiro com o DNA, porém somente em temperaturas próximas à temperatura de fusão ($\sim 61^\circ\text{C}$), quando a taxa com que as bases "flipam" para fora da dupla hélice é maior [53]. Como os experimentos são realizados à temperatura ambiente, a probabilidade de interação entre DNA/CD é muito baixa, o que é refletido no comportamento estável para o comprimento de persistência em função do aumento da concentração de CD neutra. A CD catiônica, ao contrário, permanece por um período de tempo maior próximo aos grupos fosfatos, negativamente carregados, aumentando então a probabilidade de capturar uma base purina do DNA e formar um complexo estável do tipo hóspede-hospedeiro.

Por fim, a partir da equação para o comprimento de persistência desenvolvida pudemos ajustar com robustez os dados experimentais para a interação DNA/CD monovalente. Com o ajuste determinamos os valores dos comprimentos de persistência locais (A_1 e A_2), além da constante de dissociação k_H e o valor para o tamanho médio dos grupos-ligados. A partir destes resultados propomos um cenário físico para explicar a interação DNA/CD, baseado na hipótese de que o DNA é localmente desnaturado ao formar complexos de inclusão com bases purinas do DNA. Com o intuito de testar a validade do método para outros ligantes, na seção seguinte apresentamos os resultados do ajuste dos dados de comprimento de persistência de complexos de DNA/HU.

3.3.2 Proteína HU

A figura 3.6 representa os dados de comprimento de persistência medidos para interação entre DNA e a proteína HU e o ajuste realizado utilizando nosso modelo. No gráfico, a linha contínua representa o ajuste utilizando a ordem zero da equação de Hill (Eq. 3.6), o que equivale a usar $r_{max}C_{bp} = 0$ na Eq. 3.9. O ajuste é muito bom e sugere que o valor para $r_{max}C_{bp}$ é pequeno, da ordem de alguns nM. Para este ajuste A_0 foi também considerado como um parâmetro livre, e os resultados retornados foram:

$$A_0 = 51.7 \pm 3.6 \text{ nm}; \quad A_1 = 8.2 \pm 0.2 \text{ nm}; \quad A_2 = 125 \pm 15 \text{ nm};$$

$$k_H = 36.9 \pm 0.9 \mu\text{M}; \quad n = 3.2 \pm 0.1$$

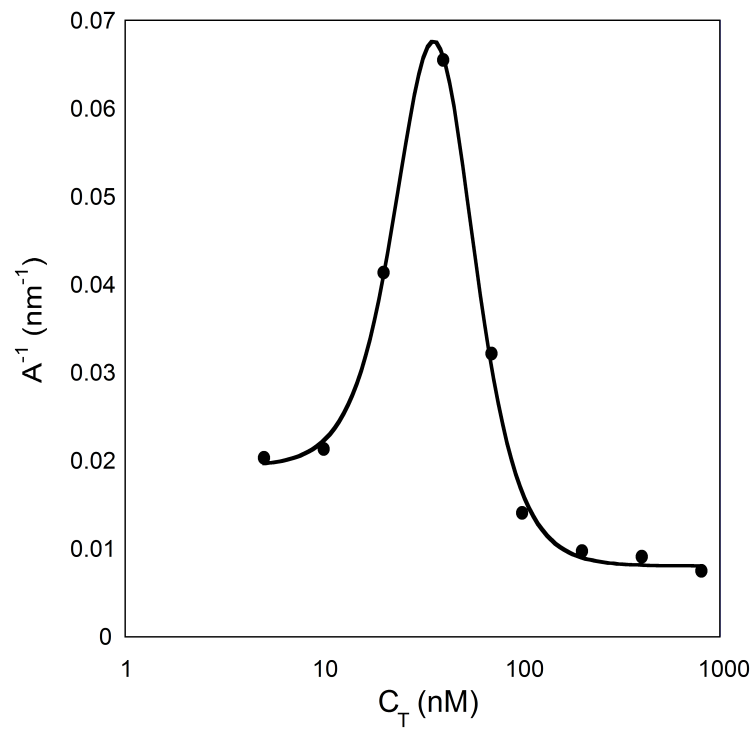


Figura 3.6: Inverso do comprimento de persistência em função da concentração total de proteína HU em solução. Os círculos representam os pontos experimentais de J. van Noort et al. [45] e a curva contínua é o ajuste utilizando a equação 3.9, com a aproximação de ordem zero para a equação de Hill.

O valor obtido para o expoente de Hill $n = 3.2$ sugere que os grupos são compostos por no mínimo, três ou quatro moléculas de HU, o que está de acordo com a estimativa de Sagi *et al.* [46], segundo a qual quatro ou cinco moléculas são necessários para induzir curvatura no DNA. Conforme informado por Noort, o valor para C_{bp} não é conhecido nestes experimentos de comprimento de persistência, pois a preparação de amostras inclui uma lavagem da lamínula na qual o DNA é depositado [45]. Um ajuste utilizando o valor $A_0 = 52$ nm para o comprimento de persistência do DNA puro e $r_{max}C_{bp}$ como parâmetro livre também foi realizado. O ajuste é ligeiramente melhor do que o anterior e retorna $r_{max}C_{bp} = (12 \pm 8)$ nM, o que é plausível já que a amostra é lavada. Considerando que para a proteína HU a fração máxima de moléculas ligadas ao DNA é $r_{max} = 0.11$, então $C_{bp} = (109 \pm 73)$ nM. Os outros parâmetros permanecem basicamente iguais aos do ajuste anterior.

Concluindo, utilizando o método desenvolvido fomos capazes de ajustar os dados de comprimentos de persistência resultantes da interação do DNA com um outro tipo de ligante. Como o dímero de HU é uma molécula muito diferente da CD em termos de tamanho, carga e modo de ligação ao DNA, este ajuste confirma a aplicabilidade do método em outros problemas. Os resultados retornados pelo ajuste são realistas e concordam com observações obtidas por outras técnicas. É importante ressaltar que em nenhum dos artigos que reportam interações entre DNA-HU o comprimento de persistência é ajustado por algum modelo, de forma a extrair parâmetros quantitativos. Sendo assim, foi apresentado neste capítulo uma ferramenta inédita para a determinação de parâmetros químicos da interação DNA/ligantes, a partir somente de medidas mecânicas do comprimento de persistência do complexo.

Capítulo 4

Método 2: Materiais e Técnicas

4.1 Hemácias

4.1.1 Geometria de Hemácias

As hemácias, ou eritrócitos, são células constituintes do sangue que circulam pelos vasos sanguíneos presentes em todo o corpo dos seres vivos. As células sanguíneas diferem de células comuns, pois como não possuem núcleo na sua fase madura não promovem a síntese de ácidos nucleicos ou proteínas. Diferentemente, as hemácias contêm em seu citoplasma uma proteína chamada hemoglobina, que é responsável por absorver o oxigênio do ar respirado e transportá-lo aos tecidos. Quando se liga ao oxigênio a hemoglobina recebe o nome de oxi-hemoglobina, e adquire a coloração vermelha viva que é característica do sangue arterial. A hemoglobina também leva de volta o sangue aos pulmões, onde será eliminado, o CO_2 (sangue venoso) [61].

Conforme ilustrado na figura 4.1(a), as hemácias humanas na sua forma natural possuem a forma de um disco bicôncavo (discócito), com um diâmetro médio de $\sim 8 \mu\text{m}$ e uma espessura de $\sim 2 \mu\text{m}$. As células são basicamente formadas por uma membrana plasmática e um citoesqueleto, interligados por proteínas específicas, e englobam um citoplasma carregado de hemoglobina. Na figura 4.1(b) temos ilustrado um corte da seção reta de uma hemácia, que é como iremos representá-la de agora em diante.

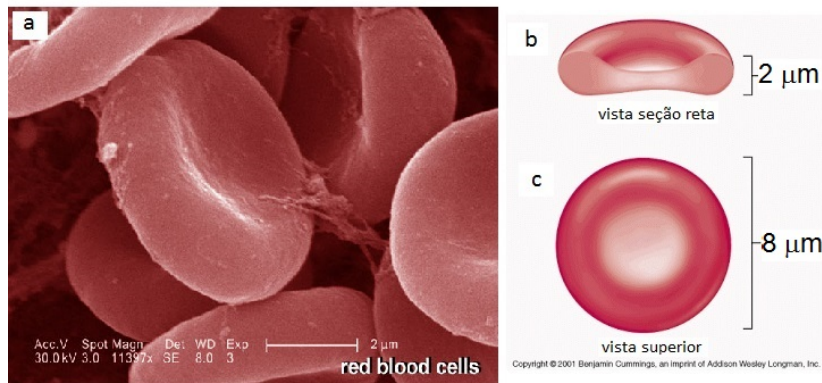


Figura 4.1: (a) Imagem de hemácias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. No corpo humano uma hemácia dura de 90 a 120 dias e percorre cerca de 483 km dentro dos vasos sanguíneos. As células são produzidas em uma taxa de 2 milhões por segundo e seres humanos possuem cerca de 5 milhões de eritrócitos por mm^3 de sangue. Retirado de Nucleus Medical Media, Inc. 2009. (b) Ilustração do corte da seção reta de uma hemácia. (c) Ilustração da vista superior de uma hemácia.

Apesar de exercerem funções diferenciadas, todas as membranas plasmáticas de células possuem uma estrutura geral em comum: elas são finas camadas de lipídios e proteínas, mantidas por ligações não-covalentes, e caracterizadas por formarem uma estrutura dinâmica e fluida. Os lipídios são organizados em uma dupla camada de aproximadamente 5 nm de espessura, conforme ilustrado na figura 4.2(a), e desempenham um papel importante na manutenção da flexibilidade e deformabilidade celular, além de servir de barreira para a passagem de moléculas. As proteínas existentes na bicamada podem ser divididas em proteínas transmembrânicas (que atravessam a bicamada lipídica) e proteínas interiores (situadas na base da bicamada lipídica). Como será discutido a seguir, algumas destas proteínas servem como junções estruturais que conectam a membrana lipídica ao citoesqueleto celular [61].

O citoesqueleto das hemácias é um emaranhado de proteínas cujo principal componente é a espectrina, uma molécula cilíndrica longa, fina e flexível, com cerca de 100 nm de comprimento e 5 nm de espessura de persistência. Conforme ilustrado na figura 4.2(b), este citoesqueleto é formado por filamentos de espectrina de $\simeq 200$ nm que se ligam através de complexos de

junção, formando uma rede bidimensional do tipo triangular com um *mesh size* de 80 – 100 nm. Como mostrado em detalhe, os complexos de junção são compostos por pequenos filamentos da proteína actina e pela proteína banda 4.1, entre outras. Além destes complexos de junção, o citoesqueleto é ligado à membrana lipídica em pontos discretos por outros complexos que envolvem proteínas do tipo banda 3, anquirinas, glicoforinas e banda 4.1 [61]. Durante a circulação sanguínea as hemácias fluem por vasos estreitos e é o citoesqueleto que capacita as células a suportar as deformações e tensões de cisalhamento sofridas durante este fluxo. Sendo assim, esta estrutura é essencial para a manutenção da forma e elasticidade da célula [41].

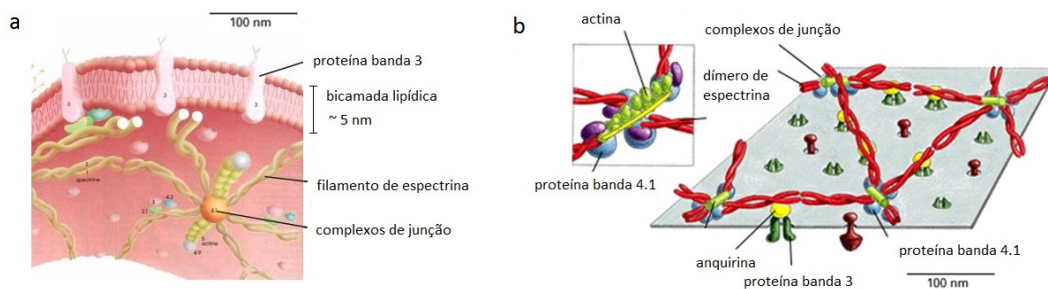


Figura 4.2: (a) Representação da bicamada lipídica das células sanguíneas e suas conexões ao citoesqueleto de espectrina. (b) Esquema do citoesqueleto das hemácias e sua estrutura bidimensional tipo triangular. Figuras retiradas do livro 'The molecular biology of the cell', Garland Science.

4.1.2 Propriedades Viscoelásticas

Sob o ponto de vista da mecânica clássica, as hemácias podem ser tratadas como biomateriais da matéria condensada mole, exibindo propriedades elásticas únicas. Como é sabido, as propriedades elásticas de um material caracterizam a deformabilidade de um corpo quando este é sujeito a forças externas, definindo módulos elásticos ($\text{tensão} = \text{módulo de elasticidade} \times \text{deformação}$) e energias quadráticas. Como o citoplasma das células sanguíneas é composto essencialmente por hemoglobina, as propriedades elásticas das hemácias são determinadas pela membrana lipídica e citoesqueleto. Em conjunto, a bicamada e o citoesqueleto possuem uma espessura de cerca de

$\simeq 50$ nm [62], e portanto podem ser tratados por um modelo bidimensional contínuo. Apesar da deformação sofrida pela membrana de hemácias ao fluir pelos vasos sanguíneos ser altamente complexa, ela pode ser explicada por três modos fundamentais de deformação: expansão/compressão de área, cisalhamento e curvatura da membrana, como ilustrado na figura 4.3. Isto posto, as propriedades elásticas de uma membrana bidimensional podem ser caracterizadas por três módulos elásticos: K_A (módulo de compressão), μ (módulo de cisalhamento) e k_c (módulo de curvatura).

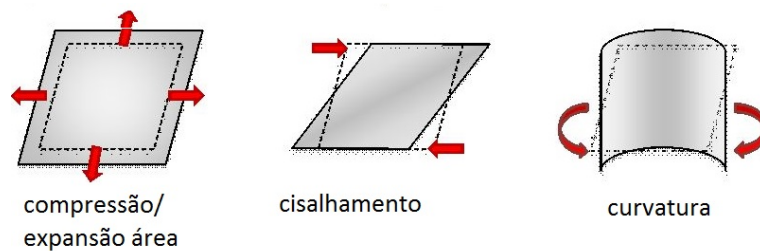


Figura 4.3: Representação dos três modos fundamentais de deformação de uma hemácia. Da esquerda para direita temos ilustrados a expansão/compressão, o cisalhamento e a curvatura de uma determinada área.

O módulo de compressão K_A reflete a energia elástica envolvida em uma compressão/expansão isotrópica da superfície da membrana. Este módulo é descrito por:

$$T_t = K_A \left(\frac{\Delta A}{A} \right), \quad (4.1)$$

onde T_t é o tensor de força isotrópica, A é a área original da membrana e ΔA é a variação da área devido à força aplicada [63]. Os valores para o módulo de compressão para membranas de células sanguíneas encontrados na literatura podem ser divididos em dois grupos: (1) valores resultantes de experimentos de aspiração por micropipeta, que estão na faixa de 300–500 nN/m [64] e (2) valores mais recentes, resultantes de medidas de flutuações de membranas, na faixa de 10–100 μ N/m [6,15,17]. É importante ressaltar que estas técnicas experimentais analisam a resposta mecânica das hemácias sob condições muito diferentes, envolvendo componentes distintos da célula.

O módulo de cisalhamento μ de uma estrutura bidimensional é a força por unidade de comprimento necessária para se introduzir a deformação in-

dicada na figura 4.3. Em hemácias, esta deformação é atingida aplicando-se forças tangenciais contrárias nas extremidades da membrana. O módulo de cisalhamento para uma hemácia é descrito como:

$$T_s = \frac{\mu}{2}(\lambda^2 - \lambda^{-2}), \quad (4.2)$$

onde T_s é a tensão de cisalhamento e λ é a razão da extensão da membrana ao longo do raio da célula [64]. O módulo de cisalhamento da bicamada lipídica é basicamente nulo devido à sua fluidez, e portanto, este módulo nas hemácias é basicamente referente ao citoesqueleto. O valor reportado na literatura está na faixa de $6 - 10 \mu\text{N/m}$ para experimentos envolvendo diferentes técnicas como pinças ópticas [65] e medidas de flutuação de membranas [15,17].

Por fim, o módulo de curvatura k_c de uma membrana é relacionado à energia necessária para deformar uma membrana de sua curvatura original para outra curvatura. Para uma membrana bidimensional, k_c é dado por:

$$M = k_c(C_1 + C_2 - C_0) \quad (4.3)$$

onde M é o momento envolvido na curvatura, C_1 , C_2 e C_0 são as curvaturas principais e espontânea, respectivamente, e serão definidas na seção seguinte. Para uma bicamada lipídica isolada k_c é determinado pela composição química dos lipídios e apresenta valores diversos entre $1 - 100 k_B T$, onde k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura em Kelvin. Para a membrana das células sanguíneas os valores encontrados por diversas técnicas estão entre $1 - 50 k_B T$. Particularmente, medidas com micropipetas encontram valores para k_c próximos a $50 k_B T$ [66], enquanto medidas a partir de flutuações de membrana reportam valores menores, da ordem de $10 k_B T$ [15,17,67].

Nesta tese usaremos medidas de flutuação de membrana para discutir os parâmetros elásticos das hemácias. Na seção a seguir mostramos como esta medida possibilita a determinação destes parâmetros.

4.1.3 Flutuação de membranas

Há mais de um século atrás Browicz constatou a existência de movimento vibratório em hemácias humanas (*efeito flickering*) usando microscopia óptica. Em 1975, Brochard e Lennon [67] quantificaram este movimento e

interpretaram as vibrações como flutuações de espessura da membrana (u) resultantes do movimento Browniano, ou seja, do bombardeamento da fina membrana celular pelas moléculas exteriores e interiores. Além disso, Brochard e Lennon propuseram que a resistência a esta deformação térmica é principalmente devido à energia de curvatura da membrana, de forma que as flutuações poderiam ser descritas por um espectro de potência do tipo:

$$\langle |u(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_c q^4} \quad (4.4)$$

onde k_c é o módulo de curvatura da membrana e q é o vetor de onda da flutuação observada.

Com o aprimoramento das técnicas experimentais e modelagem teórica, a interpretação e o espectro de flutuações propostos por Brochard e Lennon começaram a ser questionados. Por exemplo, uma outra explicação para a origem das flutuações de espessura é que elas também seriam resultantes da transformação de energia química em energia mecânica nas células, ou seja, relacionadas ao metabolismo celular e à presença de ATP (nucleotídeo responsável pelo transporte de energia química) na célula. Além disso, o espectro de potência proposto por Brochard e Lennon mostrou-se muito simples para descrever as flutuações observadas, levando à necessidade de inserção de outros termos relacionados às energias de cisalhamento e devido à compressão/expansão de área da membrana.

A discussão sobre a origem das flutuações em altura de hemácias ainda continua em aberto, com a publicação recente de resultados contraditórios sobre a contribuição de ATPs para o fenômeno [13,16]. Além disso, novos modelos teóricos para a membrana de hemácias têm sendo propostos, juntamente com espectros de potência mais complexos do que aquele elaborado por Brochard e Lennon. Ainda assim, nenhum deles é capaz de explicar todos os valores experimentais obtidos para os parâmetros elásticos das membranas de hemácias. Por exemplo, experimentos que medem diretamente as flutuações de membrana obtêm parâmetros elásticos que descrevem a membrana como algo fluido. Por outro lado, experimentos que envolvem deformações estáticas da membrana, como aspiração por micropipetas, obtêm parâmetros que descrevem a membrana como algo sólido e rígido. O fato da membrana das células sanguíneas possuir uma composição dupla (citoesqueleto + bica-

mada lipídica), além do possível efeito dinâmico do ATP e da distribuição das flutuações ao longo da superfície da célula não ser homogênea, podem ser possíveis causas das discrepâncias observadas.

O modelo mais simples proposto para descrever a membrana de hemácias trata a bicamada lipídica e o citoesqueleto como uma única membrana com propriedades mistas. A membrana é então descrita pelo módulo de curvatura da bicamada e pelo módulo de cisalhamento do citoesqueleto [8]. No entanto, este modelo é incapaz de descrever a distribuição das amplitudes de flutuações entre os diferentes modos de deformação e sobre a superfície da hemácia. Desta forma, já é estabelecido que as ligações esparsas entre a bicamada e o citoesqueleto devem ser levadas em consideração na modelagem de membranas. A seguir iremos apresentar o modelo de membranas de hemácias mais geral presente na literatura, que é um modelo para membranas planas. O modelo, formulado por N. Gov *et al.* em 2003 [6–10] e aprimorado ao longo dos anos, será utilizado na obtenção dos resultados obtidos pela nossa técnica.

Na apresentação do modelo faremos a descrição das superfícies de membranas utilizando a parametrização de Monge [68], conforme ilustrado na figura 4.5. A parametrização de Monge é freqüentemente utilizada na litera-

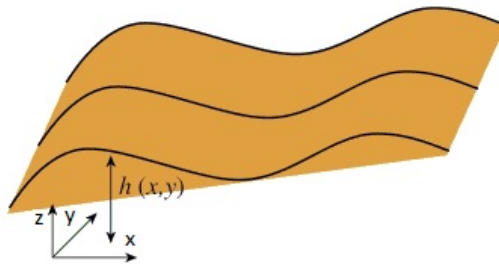


Figura 4.4: Figura de uma superfície descrita com a parametrização de Monge. Cada ponto \vec{r} da superfície é representado por $\vec{r} = [x, y, h(x, y)]$, onde a coordenada z é parametrizada pela função $h(x, y)$.

tura para a descrição de superfícies do tipo *single-valued*, e permite descrever qualquer ponto $\vec{r} = (x, y, z)$ da superfície por $\vec{r} = [x, y, h(x, y)]$. Nesta repre-

sentação, o vetor tangente à superfície no ponto \vec{r} é dado por:

$$\hat{n} = \frac{\vec{r}_x \times \vec{r}_y}{|\vec{r}_x \times \vec{r}_y|} = \frac{(-\frac{\partial h}{\partial x}, -\frac{\partial h}{\partial y}, 1)}{\sqrt{1 + (\frac{\partial h}{\partial x})^2 + (\frac{\partial h}{\partial y})^2}}, \quad (4.5)$$

onde $\vec{r}_x = (1, 0, \frac{\partial h}{\partial x})$ é o vetor tangente à superfície ao longo da direção x e $\vec{r}_y = (0, 1, \frac{\partial h}{\partial y})$ é o vetor tangente à superfície ao longo da direção y . Como sabemos, o produto vetorial destes vetores nos dá o elemento de área dA desta superfície, tal que:

$$dA = dxdy|\vec{r}_x \times \vec{r}_y| = dxdy\sqrt{1 + \left(\frac{\partial h}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial h}{\partial y}\right)^2}. \quad (4.6)$$

O termo $\sqrt{1 + (\frac{\partial h}{\partial x})^2 + (\frac{\partial h}{\partial y})^2}$ é chamado métrica da superfície e será utilizado na dedução da energia de curvatura associada a uma membrana, porém com a variável $h(x, y)$ representando a flutuação em altura $u(x, y)$.

Modelo Nir Gov *et al.*

No modelo de Gov *et al.*, as ligações esparsas entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto já são levadas em conta. Conforme ilustrado na figura 4.5(a), o modelo trata o citoesqueleto das hemácias como uma rede triangular de molas entrópicas, quase bidimensional, com uma espessura total de ~ 30 nm. Já a bicamada lipídica é tratada como uma membrana fluida que apresenta flutuações de altura em z representadas por $u(x, y)$, onde (x, y) representa um ponto na bicamada. As molas são conectadas à bicamada lipídica por pontos discretos, formando uma área de contato muito pequena em relação à distância entre os pontos (~ 100 nm) e limitando as flutuações de altura da bicamada. Segundo Gov, a presença deste citoesqueleto é responsável por induzir uma força restauradora ao longo de toda a bicamada, e deve ser modelada como um potencial harmônico (γ). Para calcular a energia associada a esta força restauradora podemos fazer um paralelo com a força gravitacional. Como sabemos, a variação da energia potencial de uma partícula colocada a uma altura $h(x, y)$, acima do plano $z = h = 0$, é dada por mgh onde m é a massa da partícula e g é a constante gravitacional. A variação da energia gravitacional por unidade de área é então dada por $\int_0^h \rho_0 g z dz$ onde ρ_0 é a

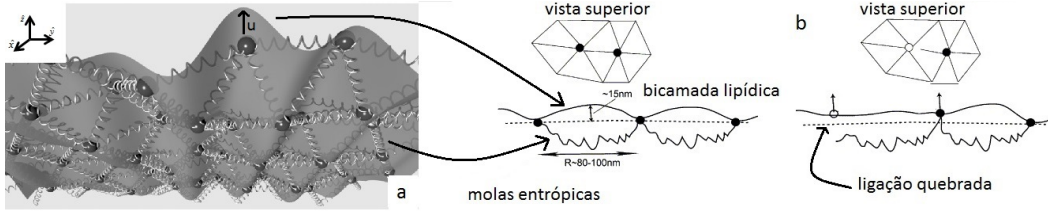


Figura 4.5: (a) Representação do citoesqueleto de hemácias como uma rede triangular de molãs entrópicas. As molãs são conectadas à bicamada lipídica por pontos discretos que limitam as flutuações de altura da bicamada. Para visualizar as molãs entrópicas o desenho representa a visão interna do acoplamento bicamada/citoesqueleto. (b) Representação de uma ligação membrana/citoesqueleto quebrada devido à ação de ATPs, ocasionando um aumento temporário nas flutuações de altura da bicamada.

densidade da partícula. Integrando em z chegamos que a variação da energia potencial da partícula é $\Delta F_g = \frac{\rho_0 g}{2} \int h^2 dA$, onde dA é o elemento de área no plano xy . Identificando $\rho_0 g \equiv \gamma$, obtemos que a variação da energia livre referente a força restauradora na bicamada é dada por:

$$\Delta F_\gamma = \frac{1}{2} \gamma \int u^2(\vec{\rho}) dA, \quad (4.7)$$

onde u é o deslocamento em z para cada ponto $\vec{\rho} = x\hat{x} + y\hat{y}$ da membrana de área A (fig. 4.5).

Além do potencial de confinamento, o modelo de Gov considera que os pontos discretos de ligação entre a bicamada e o citoesqueleto são responsáveis por induzir uma tensão superficial efetiva na bicamada (σ). O conceito de tensão efetiva é originalmente definido para uma interface entre meios diferentes. Neste sentido, σ é dada pela variação da energia livre conforme a área da interface entre os dois meios é variada ($\sigma = \frac{\partial F}{\partial A}$), e portanto,

$$F_\sigma = \int \sigma dA, \quad (4.8)$$

onde σ é a tensão superficial da interface. No entanto, quando o conceito é introduzido na teoria de membranas a sua definição é distorcida devido a duas principais diferenças entre membranas e interfaces:

1. no caso das interfaces geralmente assume-se que a superfície é plana. Ao contrário, as membranas são tratadas como superfícies com flutuações

de altura, com respostas elásticas influenciadas pela entropia associada às flutuações térmicas;

2. as mudanças de área nos dois sistemas são originadas de efeitos muito diferentes. No caso das interfaces, as mudanças são resultantes da transferência de moléculas entre os meios e é essencialmente um potencial químico. No caso das membranas, raramente há transferência de lipídios, e as mudanças de área da bicamada são produzidas por deformações elásticas (compressão/expansão) da membrana que modificam a densidade molecular de lipídios [63].

Sabendo disso, a variação de energia livre para uma bicamada que passa de um estado plano para um estado comprimido é dado por [68]:

$$\Delta F_\sigma = \int \sigma \sqrt{1 + \left(\frac{\partial u}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial y}\right)^2} dA - \int \sigma dA, \quad (4.9)$$

onde $\sqrt{1 + \left(\frac{\partial u}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial y}\right)^2}$ é a métrica da superfície. Para flutuações pequenas e suaves podemos considerar que $\frac{\partial u}{\partial x} \ll 1$ e $\frac{\partial u}{\partial y} \ll 1$, de forma que a expansão $\sqrt{1 + \left(\frac{\partial u}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial y}\right)^2} \simeq 1 + \frac{1}{2}\left(\frac{\partial u}{\partial x}\right)^2 + \frac{1}{2}\left(\frac{\partial u}{\partial y}\right)^2$ é válida. Aplicando na equação 4.9, tem-se que a variação da energia livre associada à tensão superficial σ é dada por:

$$\Delta F_\sigma = \frac{1}{2}\sigma \int |\nabla u(\vec{\rho})|^2 dA. \quad (4.10)$$

Por fim, o modelo de Gov leva em conta a energia associada à curvatura da bicamada lipídica, pois o valor para k_c do citoesqueleto é desprezível. Antes de apresentar a variação da energia livre relacionada a curvatura, vamos introduzir o conceito de curvatura de superfícies. Vamos considerar uma superfície bidimensional curvada (Fig.4.6). Em qualquer ponto desta superfície colocamos um sistema de referência tangente, especificado pelas coordenadas x e y . Na representação de Monge a altura de qualquer ponto desta superfície em relação ao plano tangente será dada por uma função unívoca $h(x, y)$. Na origem do sistema de referência criado, o plano é tangente, e portanto, $h(0, 0) = 0$ e $\frac{dh}{dx} = \frac{dh}{dy} = 0$. Expandindo um ponto qualquer $h(x, y)$ até a

segunda ordem, temos que:

$$h(x, y) \cong \sum_{i,j=1}^2 \frac{\partial^2 h}{\partial x_i \partial y_j} x_i x_j \quad (4.11)$$

onde $C_{ij} \equiv \frac{\partial^2 h}{\partial x_i \partial y_j}$ é o tensor de curvatura. Este tensor é um tensor de segunda ordem, e portanto, possui quatro elementos: C_{11} , C_{12} , C_{21} e C_{22} . O tensor possui dois invariantes: o traço $\text{TC} = C_{11} + C_{22}$ e o determinante $\det = C_{11}C_{22} - C_{12}^2$, a partir dos quais definimos a curvatura média H e a curvatura gaussiana K ,

$$H = \frac{1}{2}\text{TC} = \frac{C_{11} + C_{22}}{2} \quad e \quad K = C_{11}C_{22} - C_{12}^2. \quad (4.12)$$

No entanto, \bar{C} é um tensor simétrico que pode ser diagonalizado, com elementos C_1 e C_2 como os elementos da diagonal. Isto posto, as curvaturas média e gaussiana passam a ser dadas por:

$$H = \frac{1}{2}\text{TC} = \frac{C_1 + C_2}{2} \quad e \quad K = C_1 C_2. \quad (4.13)$$

As curvaturas são definidas para cada ponto da superfície. Naturalmente \bar{C} pode depender da posição e da superfície, e é então um campo tensorial.

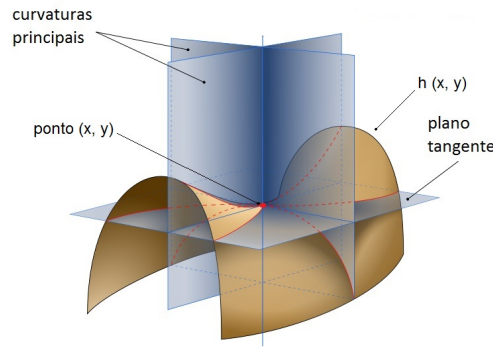


Figura 4.6: Representação das curvaturas principais de uma superfície.

Em 1973 Wolfgang Helfrich [69] deduziu a expressão para a energia elástica por unidade de área da membrana como:

$$e_c = \frac{1}{2}k_c(C_1 + C_2 - C_0)^2 + \frac{1}{2}\bar{k}_c C_1 C_2 \quad (4.14)$$

onde C_0 é a curvatura espontânea, k_c é o módulo de curvatura e \bar{k}_c é o módulo de *saddle play*. O termo C_0 é atribuído a curvatura média de uma bicamada com composição lipídica assimétrica, o que não é o caso das bicamadas de hemácias. Além disso, pelo Teorema de Gauss-Bonnet, quando a topologia da superfície é preservada em uma deformação de curvatura, o termo $\frac{1}{2}\bar{k}_c C_1 C_2$ é uma constante. Sendo assim, a variação da energia livre de curvatura quando uma superfície passa de uma configuração plana para curvada é dada por:

$$\Delta F = \frac{1}{2}k_c \int (C_1 + C_2)^2 dA. \quad (4.15)$$

Substituindo o termo $(C_1 + C_2)$ pela equação 4.11, temos:

$$\Delta F \simeq \frac{1}{2}k_c \int |\nabla^2 u(\vec{\rho})|^2 dA. \quad (4.16)$$

Juntando os termos 4.7, 4.10 e 4.16 obtemos a equação do modelo de Gov *et al.* para a variação de energia livre para uma membrana submetida a deformações [6]:

$$\Delta F \simeq \int \left[\frac{1}{2}k_c |\nabla^2 u(\vec{\rho})|^2 + \frac{1}{2}\sigma |\nabla u(\vec{\rho})|^2 + \frac{1}{2}\gamma u^2(\vec{\rho}) \right] dA. \quad (4.17)$$

Em coordenadas de Fourier podemos definir [68]:

$$u(\vec{\rho}) = \frac{1}{\sqrt{A}} \sum_{\vec{q}} u(\vec{q}) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \quad (4.18)$$

e

$$u(\vec{q}) = \frac{1}{\sqrt{A}} \int d\vec{\rho} u(\vec{\rho}) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \quad (4.19)$$

e em vez da coordenada $\vec{\rho}$ do espaço real, a membrana pode ser caracterizada pelos vetores de onda $\vec{q} = (\frac{2\pi}{\lambda_x}, \frac{2\pi}{\lambda_y})$ e comprimentos de onda λ_x e λ_y das flutuações. Aplicando estas definições à equação 4.17, obtemos a seguinte expressão para a variação da energia livre da membrana:

$$\Delta F \simeq \sum_{\vec{q}} \frac{1}{2}k_c u^2(\vec{q})q^4 + \frac{1}{2}\sigma u^2(\vec{q})q^2 + \frac{1}{2}\gamma u^2(\vec{q}). \quad (4.20)$$

Além disso, podemos aplicar o teorema de equipartição da energia para cada termo da energia livre,

$$\frac{k_B T}{2} = \sum_{\vec{q}} \frac{\sigma}{2} u^2 q^2, \quad \frac{k_B T}{2} = \sum_{\vec{q}} \frac{k_c}{2} u^2 q^4; \quad e \quad \frac{k_B T}{2} = \sum_{\vec{q}} \frac{\gamma}{2} u^2, \quad (4.21)$$

de forma a obter o espectro de potência das flutuações da membrana proposto por Gov *et al.* [6]:

$$|u(\vec{q})|^2 = \frac{k_B T}{k_c q^4 + \sigma q^2 + \gamma}. \quad (4.22)$$

Com o passar dos anos, o modelo de Gov *et al.* foi aprimorado [7,9,10] e algumas modificações foram realizadas. Por exemplo, para levar em conta a possível contribuição dos ATPs nas flutuações de membrana das células sanguíneas, Gov *et al.* [7] sugeriu que o espectro de potência das flutuações fosse dado pela mesma equação 4.22, porém substituindo a temperatura T por uma temperatura efetiva T_{ef} . Segundo Gov, o ATP é capaz de cortar as ligações entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto, aumentando temporariamente as flutuações da bicamada até que as ligações sejam refeitas. Este efeito, ilustrado na figura 4.5(b), é incorporado ao modelo pela constante fenomenológica $T_{ef} > T_{ambiente}$. Neste trabalho não iremos explorar a questão da contribuição ou não dos ATPs para a flutuação de membranas, e para uma discussão mais completa sobre o assunto sugerimos as referências [7,9].

Além desta modificação, em 2007 [10] um tratamento teórico mais rigoroso sobre a interação bicamada/citoesqueleto foi realizado, no qual determinou-se que existe um acoplamento entre os módulos de elasticidade. Neste trabalho foi proposto que para flutuações de altura com comprimentos de onda maiores do que a distância típica entre pontos de ligação bicamada/citoesqueleto (~ 100 nm), há um acoplamento entre o módulo de curvatura da bicamada lipídica e o módulo de cisalhamento do citoesqueleto, de forma que a bicamada e o citoesqueleto flutuam juntos, como representado na figura 4.7(a). Neste limite, a tensão superficial da membrana é dada por:

$$\sigma = \frac{9\mu k_B T}{16\pi k_c} \quad (4.23)$$

onde μ é o módulo de cisalhamento do citoesqueleto. Além disso, é proposto que potencial de confinamento depende da curvatura local da hemácia, de

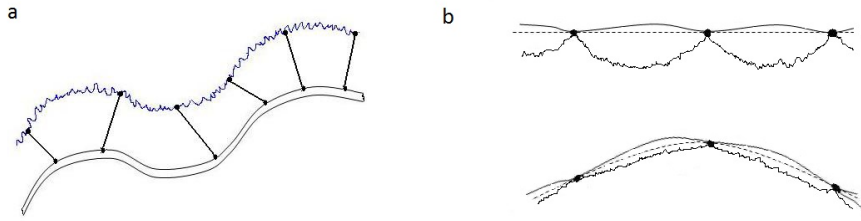


Figura 4.7: (a) Representação do acoplamento da bicamada lipídica e citoesqueleto, que passam a flutuar juntos. (b) Representação do acoplamento da curvatura local da membrana com o potencial de confinamento γ : quanto maior a curvatura local da membrana, maior o confinamento.

forma que quanto maior a curvatura local da hemácia, maior o potencial de confinamento:

$$\gamma = \frac{4\mu}{A} \int dA(2H^2 - K) \quad (4.24)$$

Esta relação pode ser ilustrada pela figura 4.7(b), na qual vemos que o aumento de curvatura é acompanhado por um estiramento das molas entrópicas, o que tenciona a estrutura e explica o aumento do potencial de confinamento. Isto posto, o modelo prevê que regiões da membrana com maiores curvaturas possuem γ maior e, portanto, apresentam menor flutuação em altura. Apesar destas modificações, a equação para o espectro de potência das flutuações continua igual àquela formulada em 2003 e dada pela equação 4.22. Como será visto no próximo capítulo, o espectro acima foi utilizado para a obtenção dos resultados de flutuações em altura das membranas. Uma discussão mais detalhada da efetividade deste espectro será feita junto à análise dos resultados obtidos.

4.2 Microscopia de Desfocalização

A Microscopia de Desfocalização (MD) é uma técnica de microscopia óptica que foi desenvolvida no Laboratório de Física Biológica, e que permite a observação de objetos de fase por um microscópio operando em campo claro. De forma simplificada, objetos de fase são aqueles que ao serem atravessados por um feixe de luz modificam a fase e não a amplitude da luz, se tornando

portanto, transparentes ao feixe incidente. Já há alguns anos, a comprovação, o aprimoramento e a aplicação da MD têm sido objeto de pesquisa de dissertações, teses e artigos do grupo do Laboratório de Física Biológica [18–25]. No ano de 2009 foi publicado o artigo "Tomography of fluctuating biological interfaces using defocusing microscopy", do qual a doutoranda também é autora, no qual foi apresentada uma nova versão da teoria da MD, além de resultados inéditos da aplicação da técnica em hemácias. Como já mencionado, a doutoranda também é a autora do artigo "Shape reconstruction and height fluctuation of phase object using Defocusing Microscopy: application to red blood cells", que está em processo de submissão. Neste artigo alguns pontos importantes da teoria são revistos e são apresentados métodos para a determinação de parâmetros biomecânicos de hemácias (forma, volume, reconstrução tridimensional e índice de refração), com o diferencial da obtenção das flutuações de altura da membrana de hemácias livre e aderida ao substrato, separadamente. Esta medida é exclusiva da MD e possibilita a obtenção dos parâmetros elásticos de cada membrana. A partir destes parâmetros são sugeridos novos termos para a modelagem da interação membrana/citoesqueleto.

No Apêndice *D* iremos expor a teoria da MD. No entanto, por se tratar de uma teoria com deduções muito extensas, iremos apresentar nesta tese uma versão resumida dos cálculos envolvidos. Uma demonstração completa dos cálculos pode ser vista na tese de Giuseppe Glionna [18]. Primeiramente iremos definir contraste de intensidade de luz, que é a grandeza fundamental da microscopia óptica, e mostrar como é possível obter contraste não nulo para objetos de fase observados por um microscópio óptico desfocalizado operando em campo claro. Para a dedução deste contraste iremos inicialmente supor que o objeto de fase é composto por uma interface fina e plana, como uma rede de difração. Em seguida, iremos obter o contraste para uma interface espessa e curvada, e mostrar quais as diferenças introduzidas. Por fim vamos obter o contraste para uma hemácia, que é modelada como duas interfaces curvadas, e a flutuação quadrática média deste contraste. Estes dois últimos resultados são fundamentais para a compreensão do Método 2: a partir do contraste iremos obter a forma, volume, reconstrução tridimensional e o índice de refração das células, e a partir da flutuação quadrática média do

contraste iremos obter a flutuação de altura de cada membrana separadamente, possibilitando a discussão dos parâmetros biomecânicos envolvidos.

4.3 Montagem e Medidas Experimentais

Os experimentos de microscopia de desfocalização são simples e consistem basicamente na coleta de imagens/filmes de hemácias em diferentes desfocalizações (z_f). A desfocalização pode ser feita movendo-se a objetiva, e portanto o plano focal, ou senão movendo-se a própria amostra, utilizando o nanodeslocador acoplado ao microscópio. A captura de imagens é feita por câmeras acopladas às saídas do microscópio, e é feita em diferentes taxas de captura, dependendo do resultado desejado. Como sabemos, as câmeras fornecem imagens formadas por pixels com diferentes níveis de cinza. No entanto, todos os resultados da MD são obtidos a partir do contraste de intensidade de luz, e portanto, é sempre necessário fazer uma transformação do nível de cinza N dos pixels em intensidade de luz I . Para obter contraste de intensidade deve-se encontrar a relação entre nível de cinza (N) e intensidade de luz (I), que é obtida através de uma curva de calibração, na qual são coletados pares de intensidade e nível de cinza para diferentes níveis de iluminação do microscópio. Na figura 4.8 temos o exemplo de uma calibração para a câmera UNIQ com ganho de 20,11db e filtro vermelho passa banda, de forma que o comprimento de onda da luz incidente é 638nm. A presença do filtro é importante neste experimento, pois evita efeitos de absorção pela hemácia.

Pelo gráfico vê-se que a relação entre N e I é linear ($N = a + bI$) de forma que o contraste de intensidade, definindo pela equação D.1, é dado por:

$$C = \frac{N - N_0}{N_0 - a}, \quad (4.25)$$

onde N_0 é o nível de cinza do *background*, ou seja, da luz não difratada. Nas nossas câmeras atuais esta calibração no contraste gera uma diferença de somente 2% para os níveis de cinza médio utilizado. Após a conversão do nível de cinza em contraste, obtemos então imagens representando o contraste de intensidade de hemácias desfocalizadas. Para a análise deste contraste

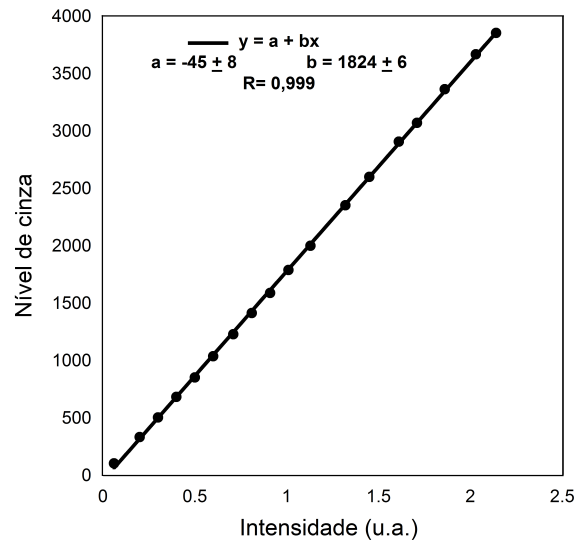


Figura 4.8: Calibração da câmera UNIQ para experimento com hemácias. Para um ganho de 20,11db o parâmetro a da reta $N = a + bI$ é $a = -45 \pm 8$, atestando a linearidade da câmera.

são utilizados o programa de processamento de imagens ImageJ (software livre do NIH, disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) e o programa Matlab (MathWorks), os quais possibilitam a criação de plugins (rotinas) para a execução de operações sobre o valor dos pixels das imagens.

Uma importante observação acerca dos valores utilizados nos experimentos para a desfocalização deve ser feita. Como já foi dito, a equação de contraste D.59 é uma aproximação para pequenos vetores de onda e pequenas desfocalizações, de forma que ($\sin x \sim x$). Se esta aproximação é válida, o contraste para uma hemácia desfocalizada é:

$$C(\vec{\rho}) = \frac{\Delta n}{n_0} \left((z_f - h_1) \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) - (z_f - h_2) \nabla^2 h_2(\vec{\rho}) \right), \quad (4.26)$$

e portanto, linear com a curvatura de cada membrana da célula, já que $\nabla^2 h \equiv \kappa$. A comprovação desta aproximação, bem como a determinação dos valores limites de z_f para os quais ela é válida pode ser vista pelos gráficos 4.9. O gráfico representa o contraste médio em uma pequena área de curvatura constante de uma hemácia, em função da desfocalização. A região selecionada foi no centro da hemácia. Vê-se que para esta região o contraste

é linear para o intervalo de $[-2, 2]\mu\text{m}$. Sendo assim, todos os experimentos foram realizados respeitando-se este limite.

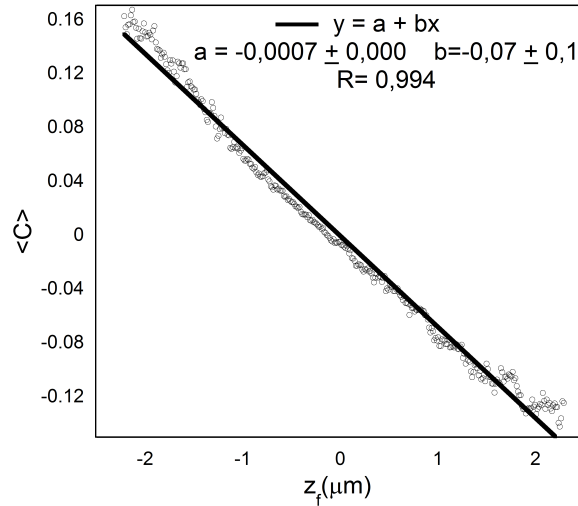


Figura 4.9: Contraste médio $\langle C \rangle$ (pontos) em uma pequena área de curvatura constante de uma hemácia, em função da desfocalização z_f . Pelo ajuste $y = a + bx$ (linha contínua), vê-se que o contraste é linear para o intervalo de $[-2, 2]\mu\text{m}$.

Montagem experimental

Os experimentos de microscopia de desfocalização foram realizados no laboratório de Física de Sistemas Biológicos utilizando os microscópios invertidos Nikon TE300 e Nikon Eclipse, conforme mostrado na foto 4.10. No estágio do Nikon TE300 está acoplado um nanodeslocador (PZT) que controla a quantidade de desfocalização do sistema, e no Nikon Eclipse tem-se um sistema de controle de foco (PFS Perfect Focus System) que mantém estável a posição focal desejada. Além disso, acoplada às saídas dos microscópios existem câmeras CCD (UNIQ UP1800 CL) e CMOS (SILICON VIDEO 642M) responsáveis pela captura de imagens. Os experimentos foram realizados utilizando-se objetiva Nikon com aumento de 100X (Nikon Plan APO DIC H, 100X, 1,30 NA). Para esta magnificação a câmera UNIQ possui pixel quadrado com lado de $0,064 \mu\text{m}$ e a câmera CMOS possui pixel quadrado de lado $0,098 \mu\text{m}$. A taxa de captura utilizada nos experimentos foi de 15

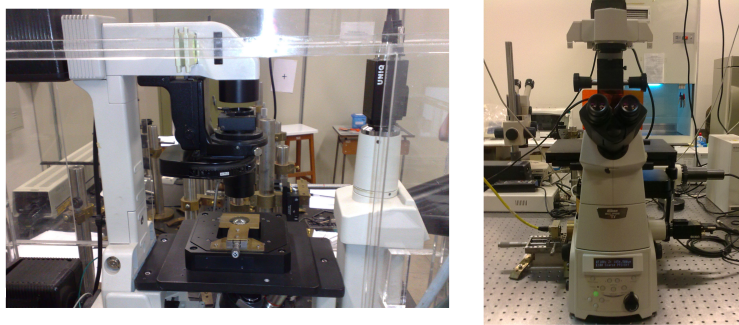


Figura 4.10: Foto dos microscópios nos quais foram realizadas as medidas de MD. No estágio do Nikon TE300 (à esquerda) está acoplado um nanodeslocador (PZT) que controla a quantidade de desfocalização do sistema, e no Nikon Eclipse (à direita) tem-se um sistema de controle de foco (PFS Perfect Focus System) que mantém estável a posição focal desejada. Acoplado às saídas dos microscópios existem câmeras CCD (UNIQ UP1800 CL) e CMOS (SILICON VIDEO 642M) responsáveis pela captura de imagens.

imagens (frames) por segundo (fps) para a obtenção dos resultados de forma, volume, reconstrução $3D$ e índice de refração, e uma taxa de 333 fps para a obtenção dos resultados de flutuação de membranas. Ambos resultados foram obtidos com a câmera CCD, que retorna imagens mais homogêneas do que a câmera CMOS. No entanto, como a CCD possui taxa máxima de 15 frames por segundo, foi feita uma calibração no nível de cinza das imagens coletadas pela câmera CCD de forma a corresponder a uma taxa de captura de 333 frames por segundo. A calibração é feita utilizando a câmera CMOS, e consiste em medir a flutuação quadrática média do contraste $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ em uma dada região da hemácia para diferentes taxas de captura. Na figura 4.11 temos o gráfico de calibração para taxas de 15 até 900 fps, para qual a flutuação do contraste já saturou ($\langle (\Delta C_{max})^2 \rangle$). Relacionando-se o valor obtido para $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ em cada taxa, dividido pelo valor máximo $\langle (\Delta C_{max})^2 \rangle$, obtém-se que para uma taxa de 15 fps ser convertida em uma taxa de 333 fps, o nível de cinza das imagens deve ser multiplicado por 1.4.

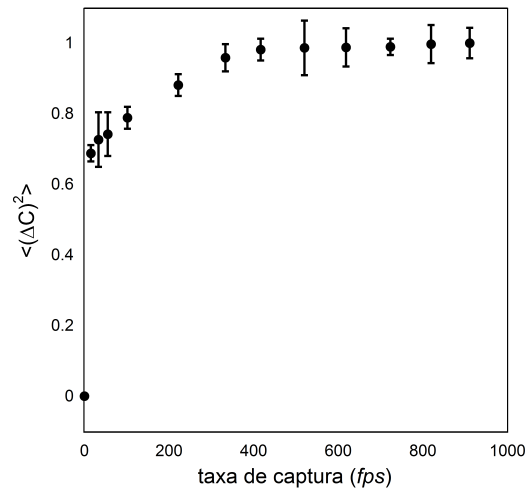


Figura 4.11: Gráfico da calibração da taxa de captura da câmera CMOS. A flutuação quadrática média do contraste $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ é medida para diferentes taxas de captura entre 15 e 900 frames por segundo, para a qual a flutuação já saturou e é representada por $\langle (\Delta C_{max})^2 \rangle$. Pelos valores de $\frac{\langle (\Delta C)^2 \rangle}{\langle (\Delta C_{max})^2 \rangle}$ obtém-se que para uma taxa de 15 fps ser convertida em uma taxa de 333 fps, deve-se multiplicar o nível de cinza das imagens por 1.4.

Protocolo de preparação de amostras

As amostras de hemácias possuem protocolo de preparação simples e rápido e por isso são preparadas no momento do experimento. O sangue é retirado do próprio dedo ($\sim 5 \mu\text{L}$), e diluído em 1.5 mL de uma solução tampão fosfato-salina ($[NaCl] = 150 \text{ mM}$), pH fisiológico (7.4), misturado com soro albumina bovino na concentração de 1 mg/ml. Esta solução possui osmolaridade $\sim 290 \text{ mOsm}$, índice de refração $n = 1.333$ e é fundamental para que as hemácias mantenham sua forma natural (discócita) durante a realização do experimento [24]. Para cada experimento, 500 μL desta solução de hemácias são transferidos para um porta-amostra formado por uma cubeta de acrílico ou anel (*o-ring*) de borracha colado sobre uma lamínula de vidro de espessura $l \sim 170 \mu\text{m}$ (Corning). O porta-amostra é tampado para evitar evaporação de água. Para as medidas de índice de refração, uma solução diluída de bolinhas de poliestireno (Sigma Aldrich) de raio $r_b = 0.189 \mu\text{m}$ é previamente depositada sobre a lamínula que será usada como substrato da

amostra. Espera-se um tempo para esta solução secar, de forma que as bolinhas permanecem grudadas ao substrato. Em seguida, cola-se a cubeta/anel sobre esta lamínula e despeja-se a solução com as hemácias. Todas as amostras são preparadas imediatamente antes dos experimentos e deixadas em repouso no estágio do microscópio por aproximadamente 20 minutos, para permitir a adesão das células ao substrato. Toda a preparação é realizada em ambiente estéril (capelas de fluxo laminar) para evitar a contaminação das amostras por fungos e bactérias.

Para ilustrar as medidas experimentais realizadas, temos na figura 4.12 o exemplo de imagem de uma hemácia observada acima e abaixo do plano focal da objetiva, e seu respectivo nível de cinza ao longo de uma linha (linha branca).

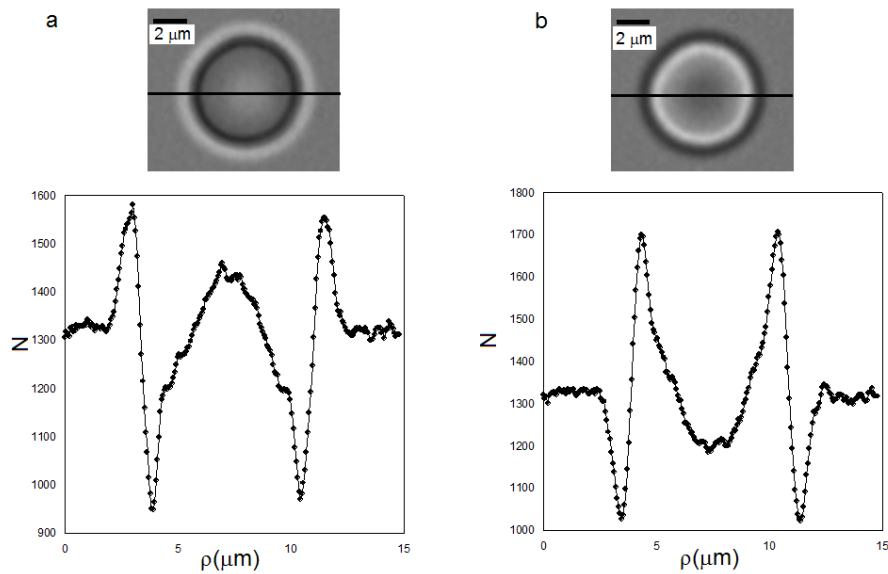


Figura 4.12: Observação de uma hemácia utilizando um microscópio desfocado. Os gráficos são do nível de cinza N em função do raio em micrômetros, para a linha traçada sobre as imagens. Na letra *a* a desfocalização é positiva e portanto, o objeto de fase está localizado abaixo do plano focal da objetiva. Em *b* a desfocalização é negativa e portanto, a célula está acima do plano focal da objetiva.

Capítulo 5

Método 2: Desenvolvimento e Resultados

5.1 Análise do Contraste

Nesta primeira parte do capítulo iremos apresentar os métodos desenvolvidos a partir do contraste MD de hemácias. Como será mostrado, o contraste permite a determinação do perfil de espessura, volume, reconstrução *3D* e índice de refração de hemácias. Os resultados alcançados a partir dos métodos são robustos e retornam valores que concordam com os resultados de outras técnicas, porém com a vantagem de serem obtidos por uma técnica extremamente simples e acessível. Como visto no capítulo anterior, a MD não necessita de nenhum componente óptico extra, como anéis de fase, prismas ou polarizadores, o que facilita a sua aplicabilidade. Além desses resultados, apresentaremos um método inédito na literatura e exclusivo da técnica, que é a determinação dos perfis de altura h_1 e h_2 de cada membrana da célula sanguínea. Como em nossos experimentos as hemácias estão aderidas ao substrato, determinamos o perfil de altura da membrana livre para flutuar e o perfil da membrana aderida ao substrato. Como será visto nas próximas seções, o efeito de adesão tem influência nesse perfil. Para testar todos os métodos propostos iremos analisar o contraste de 42 hemácias. Começaremos

apresentando os métodos e em seguida os resultados obtidos desta análise.

5.1.1 Métodos

Perfil de espessura, volume e reconstrução tridimensional

Para obter o perfil de espessura de uma hemácia, representado por $H(\vec{\rho}) = h_1(\vec{\rho}) + h_2(\vec{\rho})$, bem como seu volume e reconstrução 3D, é necessário medir os contrastes MD das células em duas desfocalizações distintas: $\langle C_1 \rangle$ em z_{f_1} e $\langle C_2 \rangle$ em z_{f_2} , com $\langle C_x \rangle = \frac{\Delta n}{n_o} [(z_{fx} - h_1) \nabla^2 h_1 - (z_{fx} - h_2) \nabla^2 h_2]$ (eq. D.59). Como mencionado anteriormente, os símbolos $\langle \rangle$ são utilizados para indicar uma média sobre vários frames coletados durante um período de tempo t . Subtraindo, pixel a pixel, os contrastes $\langle C_2 \rangle$ e $\langle C_1 \rangle$, uma nova imagem é obtida onde o valor de cada pixel é dado por:

$$\begin{aligned} \langle C_2 \rangle - \langle C_1 \rangle &= \frac{\Delta n}{n_o} [(z_{f_2} - h_1 - z_{f_1} + h_1) \nabla^2 \langle h_1 \rangle - \\ &- (z_{f_2} - h_2 - z_{f_1} + h_2) \nabla^2 \langle h_2 \rangle] = \frac{\Delta n}{n_o} [(z_{f_2} - z_{f_1}) \nabla^2 \langle h_1 \rangle - \\ &- (z_{f_2} - z_{f_1}) \nabla^2 \langle h_2 \rangle] = \frac{\Delta n}{n_o} (z_{f_2} - z_{f_1}) \nabla^2 \langle (h_1 - h_2) \rangle. \end{aligned} \quad (5.1)$$

Reescrevendo cada perfil de altura h em série de Fourier (eq.D.26), e aplicando uma transformada de Fourier bidimensional $\mathfrak{F}\{\langle C \rangle\} = \int_{-\infty}^{+\infty} \langle C \rangle \exp^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho}$ nos pixels desta imagem, obtemos o seguinte resultado:

$$\begin{aligned} \mathfrak{F}\{\langle C_2 \rangle - \langle C_1 \rangle\} &= -\frac{\Delta n}{n_o} \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} (2\pi)^2 \delta(\vec{q} - \vec{q}') q'^2 (z_{f_2} - z_{f_1}) \times \\ &\times \langle h_1(\vec{q}') - h_2(\vec{q}') \rangle. \end{aligned} \quad (5.2)$$

Dividindo esta nova imagem por q'^2 e em seguida aplicando uma transformada inversa de Fourier, definida por $\mathfrak{F}^{-1}\{\langle C \rangle\} = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle C \rangle \exp^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}$, uma imagem final é obtida onde o valor de cada pixel é dado pela espessura H :

$$H = (h_1 - h_2) = \frac{n_o}{\Delta n (z_{f_1} - z_{f_2})} \mathfrak{F}^{-1} \left\{ \frac{\mathfrak{F}\{\langle C_2 - C_1 \rangle\}}{q^2} \right\}. \quad (5.3)$$

Para demonstrar algebricamente este resultado, vamos analisar a mesma operação para o caso de um contraste gerado por uma única interface fina de

perfil de altura h : $\langle C \rangle = \frac{\Delta n}{n_o} (z_f - h) \nabla^2 h$. Neste caso, a transformada de Fourier nos dá:

$$\mathfrak{F}\langle C \rangle = \frac{\Delta n}{n_o} z_f \int_{-\infty}^{+\infty} \nabla^2 h(\vec{\rho}) \exp^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho}. \quad (5.4)$$

Utilizando a expansão do perfil de altura em h em série de Fourier como anteriormente, temos que:

$$\mathfrak{F}\langle C \rangle = -\frac{\Delta n}{n_o} z_f \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} q'^2 h(\vec{q}') \int_{-\infty}^{+\infty} \exp^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} \exp^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho}. \quad (5.5)$$

A transformada de Fourier de uma exponencial é uma integral conhecida e é dada por $\int_{-\infty}^{+\infty} \exp^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} \exp^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho} = (2\pi)^2 \delta(\vec{q} - \vec{q}')$. Substituindo na equação 5.5, dividindo por q'^2 e aplicando a transformada inversa, temos que:

$$\begin{aligned} \mathfrak{F}^{-1}\left\{\frac{\mathfrak{F}\{\langle C \rangle\}}{q'^2}\right\} &= -\frac{\Delta n}{n_o} z_f \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} \int_{-\infty}^{+\infty} h(\vec{q}') \delta(\vec{q} - \vec{q}') \exp^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}' = \\ &= \frac{\Delta n}{n_o} z_f \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \exp^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} = \frac{\Delta n}{n_o} z_f h(\vec{\rho}). \end{aligned} \quad (5.6)$$

Ou seja, recuperamos o perfil de altura do objeto observado. A partir deste resultado é fácil fazer uma generalização e obter a equação 5.3. Voltando a esta última equação, se os valores de z_f , n_o , Δn são conhecidos é possível obter a imagem final que representa o mapa de espessura da célula observada.

Para sistematizar a obtenção do perfil de espessura de uma célula sanguínea, o procedimento descrito acima foi implementado em uma rotina no Matlab. O programa desenvolvido requer como entrada o valor para $\Delta n = n_h - n_{meio}$, duas imagens de contraste em posições focais diferentes ($\langle C_1 \rangle$ e $\langle C_2 \rangle$) e o tamanho do pixel da câmera utilizada para a captura das imagens. Como resultado, o programa retorna uma imagem representando o mapa de espessura da hemácia observada. Na figura 5.1 temos representada uma hemácia e seu mapa de espessura (a) obtido pelo programa. Como pode ser visto, ao traçar uma linha horizontal ao longo deste mapa obtemos o perfil de espessura da seção reta da hemácia (b). Além disso, o perfil radial de espessura pode ser obtido pela rotação de $\vec{\rho}$ em 360 graus (c).

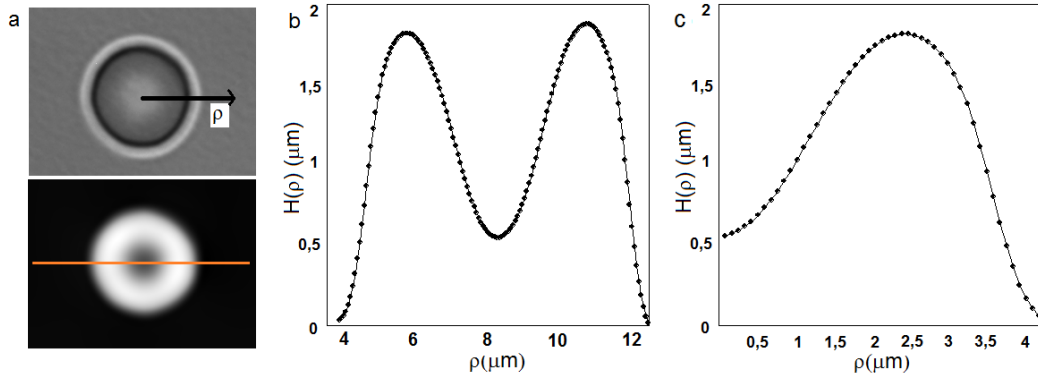


Figura 5.1: (a) Acima, a imagem do nível de cinza de uma hemácia e abaixo o seu mapa de espessura. (b) Perfil de espessura da célula ao longo da linha horizontal representada no mapa de espessura. (c) Perfil radial de espessura da célula, obtido a partir de uma média angular da espessura ao longo de ρ (representado no nível de cinza).

Utilizando o mapa de espessura o volume da célula pode ser facilmente obtido por $V = A_{pixel} \times (H)$, onde A_{pixel} é a área do pixel da câmera utilizada para a captura dos contraste C_1 e C_2 . Além disso, ao aplicar o plug-in de desenho de superfícies 3D do Image J sobre o mapa é possível obter a reconstrução tridimensional da espessura da célula.

Perfil radial de altura de cada membrana

Para determinar separadamente o perfil radial de altura das membranas superior e inferior das células é necessário utilizar o perfil radial do mapa de espessura da célula e o perfil radial do contraste para uma posição específica de desfocalização, $\langle C_1 \rangle$ em z_{f_1} , por exemplo. Utilizando a relação $H = h_1 - h_2$, obtém-se que $h_2 = h_1 - H$, de forma que o contraste $\langle C \rangle$ para uma desfocalização qualquer da célula (Eq.D.59) pode ser reescrito somente em função de h_1 ,

$$\langle C_1(\vec{\rho}) \rangle = \frac{\Delta n}{n_0} \left[(z_{f_1} + H - h_1) \nabla^2 H(\vec{\rho}) - H \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) \right]. \quad (5.7)$$

Como $\langle C_1 \rangle$, Δn , n_o , z_{f_1} e $H(\vec{\rho})$ são valores conhecidos, $h_1(\vec{\rho})$ pode ser facilmente obtido por métodos computacionais. Nesta tese um algoritmo ge-

nético é utilizado para determinar o perfil das membranas superior e inferior de hemácias.

Algoritmo Genético

O algoritmo genético (AG) é um método de busca que utiliza conceitos provenientes do princípio de seleção natural para abordar uma série ampla de problemas, em especial de otimização. Robustos, genéricos e facilmente adaptáveis, este tipo de algoritmo consiste em uma técnica amplamente estudada e utilizada em diversas áreas da pesquisa [73]. Inspirado na maneira como o darwinismo explica o processo de evolução das espécies, o algoritmo genético foi inicialmente proposto por John Holland em 1975. Basicamente, o que um algoritmo genético faz é criar uma população aleatória de possíveis soluções para o problema a ser tratado, para depois submetê-la ao processo de evolução, constituído pelas seguintes etapas:

1. avaliação: avalia-se a aptidão das soluções da população aleatória, também chamadas de indivíduos da população, na qual é feita uma análise para que se estabeleça o quão bem cada uma delas responde ao problema proposto;
 2. seleção: os indivíduos/soluções são classificados de acordo com sua aptidão e os melhores indivíduos são escolhidos;
 3. mutação: elementos destes indivíduos selecionados são alterados gerando novas soluções;
 4. cruzamento: elementos dos indivíduos selecionados são recombinados, também gerando novas soluções;
 5. atualização: os indivíduos criados neste ciclo (geração) são inseridos em uma nova população;
 6. finalização: avalia-se a aptidão das soluções da nova população e verifica-se se o critério de parada foi atingido, retornando para a etapa de avaliação em caso negativo e encerrando o algoritmo em caso positivo.
-

Para avaliar a aptidão das soluções de uma população utilizamos o valor retornado pela função de mérito Ψ [73]:

$$\Psi^2 = \sum_i^N (T_i - t_i)^2 \quad (5.8)$$

onde T é o conjunto de dados do problema, t é a solução avaliada e N é o número de variáveis da solução. De posse da função Ψ^2 as soluções são classificadas e selecionadas, tal que quanto menor Ψ^2 , melhor é a solução. As soluções escolhidas são recombinadas (cruzamento) e alteradas aleatoriamente (mutação), gerando assim uma nova população. Avalia-se as soluções desta nova população para classificação, caracterizando uma nova geração do algoritmo. As gerações só são encerradas quando um critério de parada é atingido. A avaliação deste critério de parada é realizada ao fim de cada geração, e quando satisfeito, o algoritmo retorna a melhor solução para o problema proposto, que é a solução com melhor classificação até o momento. Para simplificar o entendimento do procedimento seguido por um AG, temos na figura 5.2 um fluxograma representando os principais passos do algoritmo.

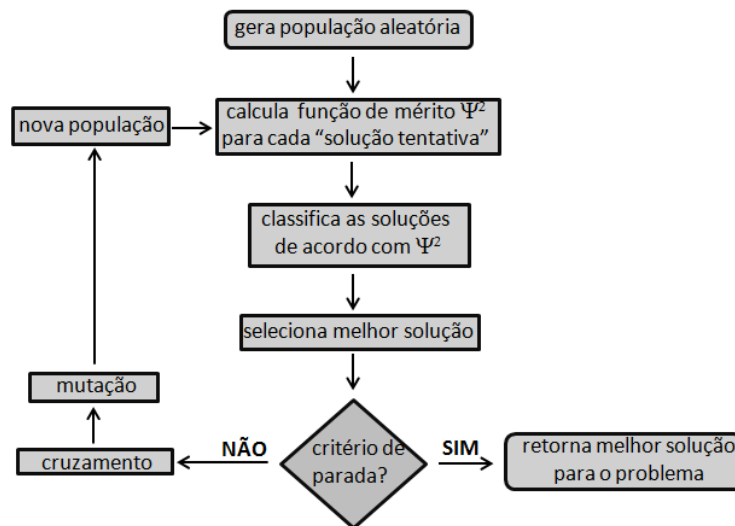


Figura 5.2: Fluxograma do funcionamento de um algoritmo genético.

Nesta tese utilizamos um AG para se obter dois resultados: o perfil de altura $h_1(\vec{\rho})$, utilizando a Eq. 5.11 como a equação de ajuste, e os espec-

tros de potências $|u_1^2|$ e $|u_2^2|$, utilizando a Eq. 5.10 e D.11 como equações de ajuste, como será mostrado mais a diante. Em ambos os casos, cada busca foi iniciada com uma população aleatória com um número x de indivíduos/soluções 20 vezes maior que o número de variáveis da equação ajustada.

AG: Perfil de membranas

No caso da determinação do perfil de altura, o número de variáveis da solução era a quantidade de pontos $\vec{\rho}$ (32 pontos) do perfil h_1 , de tal forma que cada elemento de uma solução descrevia um ponto $\vec{\rho}$ do perfil de altura $h_1(\vec{\rho})$. A população inicial era composta de 640 números aleatórios variando entre $[0, H(\vec{\rho})]$, já que $h_1(\vec{\rho}) < H(\vec{\rho})$, para todo ponto $\vec{\rho}$. Para avaliação das soluções utilizou-se o cálculo da função de mérito Ψ^2 onde T era o conjunto de dados $\langle C(\vec{\rho}) \rangle$. Como mencionado, a partir dos valores desta função o AG realiza uma série de operações de cruzamento e mutação para gerar uma nova população, até que o critério de parada seja satisfeito. Teoricamente, o critério de parada deveria ser tal que a função de mérito chegasse a zero. Entretanto, já que o conjunto de dados do problema ($T \equiv \langle C(\vec{\rho}) \rangle$) é obtido por medidas experimentais, existem incertezas inerentes que devem ser levadas em consideração. Após inúmeros testes, conclui-se que o algoritmo deve ser encerrado quando o valor retornado pela função de mérito não apresenta modificações maiores que 0,30% da variância dos dados experimentais, por 1000 gerações (NG) consecutivas, iniciando a contagem a partir de valores da função de mérito abaixo de 10% da variância dos dados experimentais. Isto corresponde a uma precisão de 10^{-3} nos dados de contraste $\langle C(\vec{\rho}) \rangle$. Além disto, para avaliar a robustez do algoritmo às condições iniciais, cinco execuções adicionais foram realizadas com populações aleatórias diferentes, sendo que em cada execução uma média de 1×10^8 avaliações da função de mérito foram necessárias para que o algoritmo convergisse. No gráfico 5.3 abaixo vemos a progressão do melhor indivíduo para uma dada execução, que retornou um melhor indivíduo com $\Psi^2 = 0,0095$, após 92662 gerações.

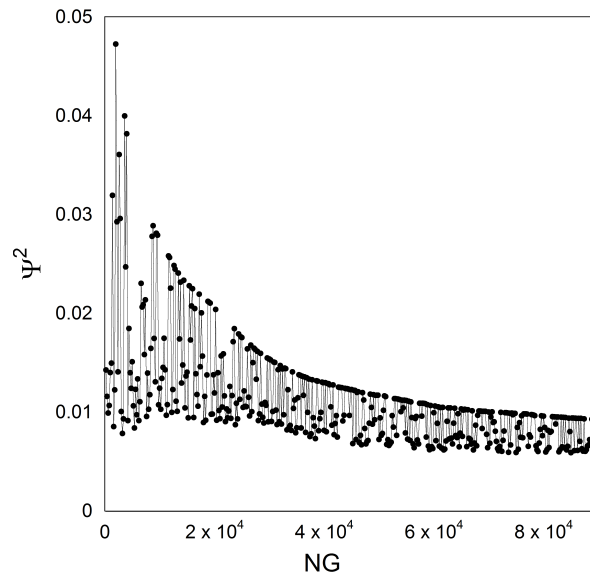


Figura 5.3: Progressão do melhor indivíduo para uma dada execução do AG. Para melhor visualização o gráfico mostra o valor da função mérito Ψ^2 a cada 200 gerações. Após 92662 gerações retornou o melhor indivíduo com $\Psi^2 = 0,0095$. Neste caso, o AG leva cerca de 10 horas para convergir quando rodado em computadores com processadores *i7* e 32 GB de RAM.

Índice de refração de hemácias

O método para determinar o índice de refração de uma hemácia utilizando a MD consiste em comparar o valor máximo da altura da célula h_{max} , obtido a partir de dois procedimentos distintos: mapa de espessura e medição direta. Antes de apresentar os dois procedimentos, é importante mencionar que para a medida do índice de refração é fundamental escolher uma célula com simetria em torno do eixo z , o que pode ser verificado a partir da reconstrução $3D$.

No primeiro procedimento, o mapa de espessura da célula escolhida é obtido da mesma forma descrita nas seções anteriores, porém definindo $\Delta n = n_h - n_{sol.} \equiv 1$ como parâmetro de entrada no programa. Seguindo as operações citadas na seção 5.1.1, o programa retornará o mapa de espessura da célula, reescalado pelo índice de refração $\Delta n \equiv 1$. Se a célula escolhida possui simetria em torno de z , um perfil radial deste mapa de espessura pode

ser utilizado para determinar h_{max} , que corresponderá à metade do valor máximo deste perfil $h_{max} = H_{max}/2$. Na figura 5.1c temos um exemplo de um perfil radial de um mapa de espessura.

No segundo procedimento h_{max} é determinado por uma medida direta da distância entre a lamínula (z_0) e o plano médio da célula ($z_{rbc} \equiv h_{max}$). Para determinar z_0 , uma simples variação da preparação de amostras é realizada. Para isso, uma solução diluída de bolinhas de poliestireno de raio $r_b = 0.189 \mu\text{m}$ é depositada sobre a lamínula que será usada como substrato da amostra. Espera-se um tempo para a solução secar, de forma que as bolinhas permanecem grudadas ao substrato. Em seguida, monta-se o porta-amostra sobre esta lamínula e despeja-se a solução com as hemácias. Seguindo este procedimento teremos vários sistemas hemácia + bolinha para então determinar h_{max} . Suponha um sistema hemácia + bolinha qualquer, como representado na figura 5.4. Primeiro analisamos o contraste da bolinha. Ao varrer o eixo z ao longo da bolinha, o contraste atingirá seu valor mínimo quando estivermos sobre o plano médio da bolinha, que chamamos de z_b . Como o raio da bolinha é conhecido (r_b), a posição da lamínula pode ser determinada a partir da subtração $z_0 = z_b - r_b$, como ilustrado na figura. Seguimos então para a análise do contraste da hemácia do sistema. É importante dizer que para determinar z_{rbc} com o menor erro possível, a hemácia escolhida deve estar o mais próximo da bolinha previamente analisada. Isto porque as lamínulas possuem pequenas irregularidades, gerando algumas variações de espessura ao longo de sua extensão. Assim como feito anteriormente, varremos o eixo z ao longo da hemácia e quando o contraste atinge seu valor mínimo o plano médio da célula (z_{rbc}) é identificado. Utilizando z_{rbc} e z_0 pode-se facilmente determinar o valor da altura máxima da célula $h_{max} = z_{rbc} - z_0$. Por fim, cada procedimento fornece um valor diferente para a altura máxima h_{max} , que deve ser a mesma. Para igualar os valores ajustamos o índice de refração da célula em $\Delta n = n_h - n_{sol.}$, previamente igualado a 1.

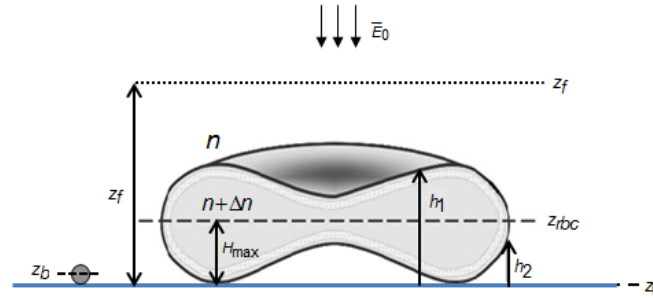


Figura 5.4: Representação de um sistema hemácia + bolinha para determinação do índice de refração: h_{max} é a altura máxima da célula, z_{rbc} é o plano médio da célula e z_b é o plano médio da bolinha de poliestireno. A célula tem um índice de refração de $n + \Delta n$, onde n é o índice de refração da solução na qual está imersa. Além disto, z_f é a distância entre a lamínula e o plano focal da objetiva e h_1 e h_2 são as distâncias entre a lamínula e as membranas superior e inferior, respectivamente.

5.1.2 Resultados

Nos experimentos de hemácias é conveniente definir a origem do eixo z no plano médio da célula (z_{rbc}), ao invés de defini-lo na lamínula como fizemos até agora. Isto porque o plano z_{rbc} é facilmente determinado durante as medidas de contraste, pois ele é o plano de mínimo contraste ao longo do eixo z , e a partir do qual o contraste da célula inverte seu sinal. Para exemplificar, temos na figura 5.5 a representação de uma hemácia neste novo referencial. Pela figura vê-se que a grandeza z_f continua sendo definida como a distância da lamínula ao plano focal. No entanto, a desfocalização passa a ser quantificada por Δf , que é a distância entre o plano médio da célula e o plano focal da objetiva, de forma que $z_f = \Delta f + z_{rbc}$. Além disso, os perfis de altura h_1 e h_2 também passam a ser medidos a partir do plano médio da hemácia, e portanto, representam a distância entre z_{rbc} e as membranas superior e inferior, respectivamente. Como consequência, a espessura da hemácia passa a ser definida como $H = h_1 + h_2$, para $|h_2| > 0$. Na figura 5.5 temos também três imagens do contraste de uma célula capturadas acima ($\Delta f > 0$), sobre ($\Delta f = 0$) e abaixo do plano z_{rbc} ($\Delta f < 0$), respectivamente. Pelas imagens é fácil perceber que o contraste é mínimo quando o plano focal da objetiva (z_f)

coincide com o plano médio da célula, e que o sinal do contraste é invertido quando z_f passa para um lado ou outro do plano z_{rbc} .

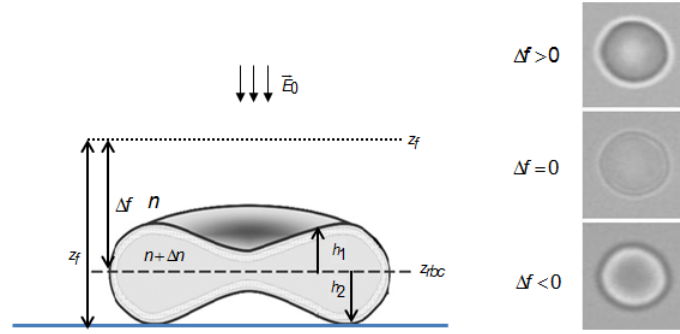


Figura 5.5: Representação de uma hemácia no referencial em que a origem do eixo z é definida como o plano médio da célula z_{rbc} , ou seja, o plano de contraste mínimo. Este novo referencial promove duas mudanças fundamentais: a quantidade de desfocalização é agora definida pela distância entre o plano z_{rbc} e o plano focal, e é chamada de Δf ; os perfis de altura h_1 e h_2 passam a ser medidos a partir do plano médio, e portanto, a espessura H da célula passa a ser definida como $H = h_1 + h_2$, para $|h_2| > 0$. Do lado direito da figura temos imagens do contraste de uma hemácia capturada acima ($\Delta f > 0$), sobre ($\Delta f = 0$) e abaixo do plano z_{rbc} ($\Delta f < 0$), respectivamente. Pelas imagens é fácil perceber que o contraste é mínimo quando o plano focal da objetiva coincide com o plano médio da célula, e que os contrastes acima e abaixo deste plano são invertidos.

A nova escolha para a origem do eixo z introduz modificações mínimas às equações derivadas anteriormente. Para o contraste gerado por uma hemácia (eq. D.59), por exemplo, a nova equação é dada por:

$$C(\vec{\rho}) = \frac{\Delta n}{n_0} \left((\Delta f - h_1) \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) - (\Delta f + h_2) \nabla^2 h_2(\vec{\rho}) \right). \quad (5.9)$$

Nesta equação, a desfocalização passa a ser quantificada por Δf e a única mudança de sinal ocorre para h_2 . Para a flutuação quadrática média do contraste, temos:

$$\begin{aligned} \langle (\Delta C(\vec{\rho}))^2 \rangle = & \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_q q dq \left[|u_1(q)|^2 \times \sin^2 \left(\frac{(\Delta f - h_1) q^2}{2k} \right) + \right. \\ & \left. + |u_2(q)|^2 \times \sin^2 \left(\frac{(\Delta f + h_2) q^2}{2k} \right) \right], \quad (5.10) \end{aligned}$$

na qual permanecem as mesma mudanças introduzidas no contraste. As outras equações apresentadas não sofrem nenhuma modificação. Isto posto, todos os resultados a serem apresentados daqui para frente foram obtidos neste novo referencial. Apresentamos primeiro os resultados para o índice de refração, pois os valores obtidos foram utilizados em todos os resultados restantes.

Índice de refração de hemácias

Para determinar o índice de refração de hemácias três sistemas diferentes de hemácia + bolinha de poliestireno foram utilizados, sendo que três medidas foram realizadas para cada sistema. Em cada medida, o valor máximo de altura da célula h_{max} foi determinado pelos dois procedimentos narrados anteriormente. Para o primeiro procedimento foram usadas duas imagens de contraste para cada hemácia, sendo uma em $\Delta f = 0$ e outra em $\Delta f = 2 \mu\text{m}$. Para o segundo procedimento capturamos um vídeo do contraste do sistema hemácia + bolinha, enquanto uma varredura contínua ao longo do eixo z era realizada. Como a taxa de captura utilizada foi de 15 frames por segundo e a varredura em z foi realizada a uma velocidade de $v = 0.1 \mu\text{m}/s$, a precisão na determinação das posições para z_0 , z_b e z_{rbc} é de $0.0067 \mu\text{m} \equiv 1$ frame. Fazendo uma média sobre todas as três medidas de cada sistema hemácia + bolinha, os valores encontrados para Δn foram: 0.057 , 0.054 e 0.062. A média sobre estes valores nos dá $\Delta n = 0.058$, e portanto, um índice de refração para a hemácia de $n_h = 1.391 \pm 0.003$, para um comprimento de onda incidente de $\lambda = 632\text{nm}$.

Perfil de espessura, volume e reconstrução tridimensional

Para a apresentação dos resultados de geometria de hemácias, 42 células foram filmadas por 20 segundos, a uma taxa de 15 imagens por segundo, nas posições focais $\Delta f = 2\mu\text{m}$ (C_1) e $\Delta f = 0\mu\text{m}$ (C_2). Usando plugins desenvolvidos, cada conjunto de imagens foi transformado em uma única imagem representando o contraste temporal médio $\langle C_1 \rangle$ e $\langle C_2 \rangle$ da célula observada. Para empregar a rotina Matlab desenvolvida, utilizamos as imagens $\langle C_1 \rangle$ e $\langle C_2 \rangle$ de cada célula e o valor de Δn medido pela

nossa técnica ($\Delta n = 0,058$). Como resultado, determinamos o mapa de espessura das 42 células. A partir deste mapa obtemos o perfil radial e perfil tridimensional para cada célula. Para ilustrar este processo, na figura 5.6 (a-d), quatro mapas de espessura são apresentados, junto à reconstrução 3D(e) para a célula de perfil de espessura (d). Como pode ser visto pela variação de cores (legenda ao lado de cada figura), cada célula possui uma distribuição de espessura particular, e nenhuma simetria total ao longo do eixo z é observada. Este fato ilustra a assimetria da forma natural das hemácias, e também pode ser indicação de como a célula está aderida ao substrato. O volume de cada célula foi determinado com base neste perfil

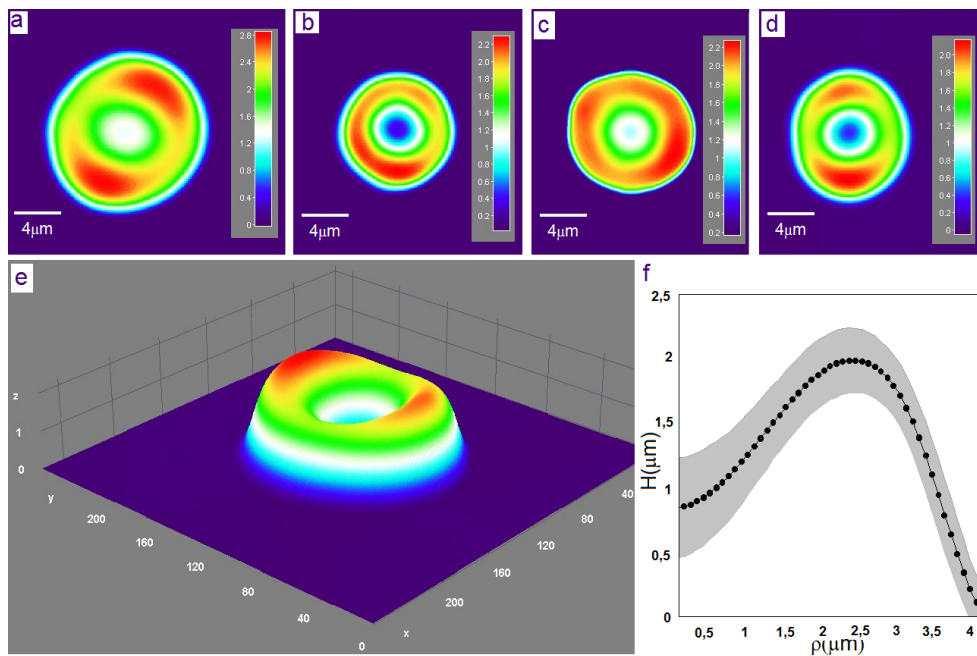


Figura 5.6: (a-d) Perfil de espessura para quatro hemácias. (e) Reconstrução tridimensional da espessura da hemácia representada em d. (f) Perfil de espessura médio para as 42 hemácias analisadas.

de espessura e o valor médio encontrado para as 42 células analisadas foi de $V_m = 93 \pm 19 \mu\text{m}^3$, o que está de acordo com os valores reportados por outras técnicas [11], bem como aqueles observados em qualquer exame de sangue humano. Além disso, realizando uma média angular sobre cada mapa, e novamente coletando a média sobre todas as hemácias analisadas, temos o

perfil radial da figura 5.6f. Como pode ser visto, a espessura média das células possui um valor máximo de $2 \mu\text{m}$, o que também está de acordo com os resultados reportados por outras técnicas [12,14]. A área cinza ao redor da curva representa o desvio padrão da medida, refletindo a típica variabilidade do fenótipo de células sanguíneas.

Perfil de altura de membranas

Para obter o perfil radial de altura h_1 e h_2 das 42 hemácias analisadas usamos a média do perfil radial do contraste de todas as imagens $\langle C_1 \rangle_m$ ($\Delta f = 2 \mu\text{m}$) e a média do perfil radial do mapa de espessura das células H_m (fig. 5.6f). Considerando que $n_o = 1,51$ e $\Delta n = 0,058$ na Eq.5.11:

$$\langle C_1(\vec{\rho}) \rangle_m = \frac{\Delta n}{n_o} \left[(z_{f_1} + H_m - h_1) \nabla^2 H_m(\vec{\rho}) - H_m \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) \right], \quad (5.11)$$

o perfil médio h_1 é determinado pelo uso de um algoritmo genético, com os detalhes dados anteriormente. Utilizando a relação de espessura $H = h_1 + h_2$, o perfil médio h_2 também é definido. É importante notar que o perfil radial de espessura da célula é determinado para todo raio da hemácia ($\rho \sim 4,00 \mu\text{m}$). No entanto, como mencionado anteriormente, o perfil de altura determinado pelo AG possui 32 pontos, cada um deles representando um pixel radial da câmera UNIQ, e portanto uma distância radial total de $\rho = 2,72 \mu\text{m}$. Esta limitação em raio é devido aos efeitos de difração que ocorrem na borda da hemácia, que provocam um aumento violento no perfil radial do contraste como indicado na figura 5.7a. Esta limitação não existe na determinação da espessura H , pois o procedimento de subtração de imagens diminui a difração das bordas. Além deste efeito, pela equação 5.11 vê-se que o cálculo de h_1 envolve uma derivada segunda do perfil h_1 em função do raio ρ . Se consideramos h_1 como um vetor com $n = 32$ elementos, para calcular a derivada de uma certa posição i deste vetor os valores de h_{i-1} e h_{i-2} devem ser conhecidos. Sendo assim, certos pontos do vetor h_i devem ser desprezados, restando somente 25 pontos radiais, relativos a intervalo radial $[0, 25 - 2, 50] \mu\text{m}$.

Os resultados retornados pelo algoritmo estão representados nas figuras 5.7 e 5.8. Na letra (a) da figura 5.7 mostramos o gráfico completo da média do

perfil radial do contraste ($\Delta f = 2 \mu\text{m}$) para todas as hemácias analisadas. A região circulada indica a região de difração que deve ser evitada. Na letra (b) mostramos a média do perfil radial do contraste $\langle C \rangle_m$ (pontos) utilizados para a geração dos perfis de altura, e uma média dos ajustes resultantes do AG (linha contínua). Neste dado a área cinza indica a dispersão em relação à media dos ajustes.

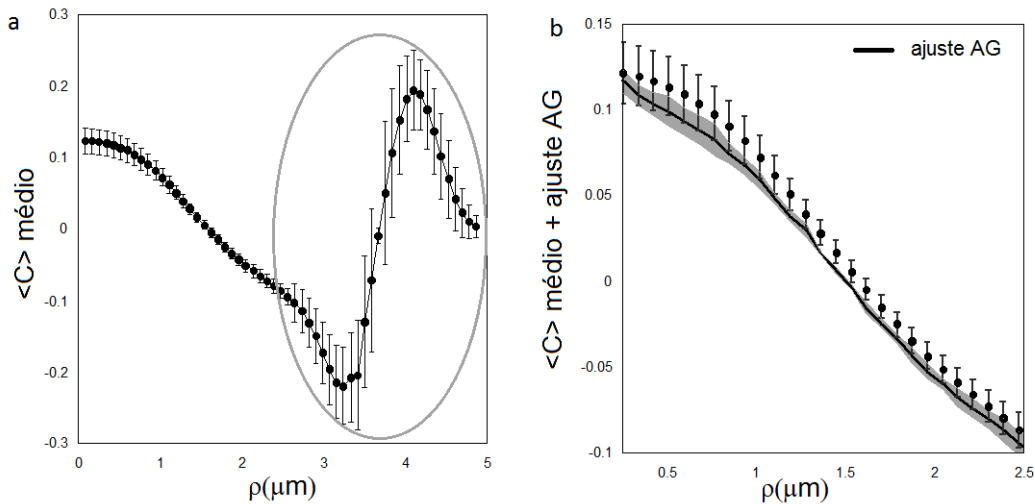


Figura 5.7: (a) Perfil radial completo do contraste médio sobre as 42 células analisadas e a indicação do efeito de difração (círculo em cinza). (b) Região do contraste médio $\langle C \rangle_m$ (pontos) usada para determinação dos perfis de altura e o ajuste retornado pelo AG (linha contínua). A área cinza indica a dispersão em relação à media dos ajustes.

Na figura 5.8(a), os pontos representam o perfil médio h_1 e os quadrados representam o perfil médio h_2 das hemácias retornados pelo AG. Como esperado, devido à adesão das células ao substrato, a membrana inferior possui um perfil de altura mais achatado, exibindo uma variação absoluta em altura de $\sim 0,25 \mu\text{m}$, enquanto h_1 exibe uma variação de quase $\sim 1,00 \mu\text{m}$. Além disso, pelo perfil de h_2 somos capazes de localizar a região onde a célula toca o substrato, o que ocorre em $\rho \sim 2,00 \mu\text{m}$. Uma análise da curvatura do perfil de cada membrana pode ser vista na letra (b) da figura 5.8 e mostra que ambos perfis invertem sua curvatura próximo ao raio $\rho \sim 1,60 \mu\text{m}$. No entanto, h_1 começa com uma curvatura positiva de $1,50 \mu\text{m}^{-1}$ e atinge

uma curvatura final constante de $-0,15 \mu\text{m}^{-1}$. Ao contrário, h_2 começa com uma curvatura negativa de $\sim -0,50 \mu\text{m}^{-1}$ e atinge uma curvatura final de $\sim 1,00 \mu\text{m}^{-1}$.

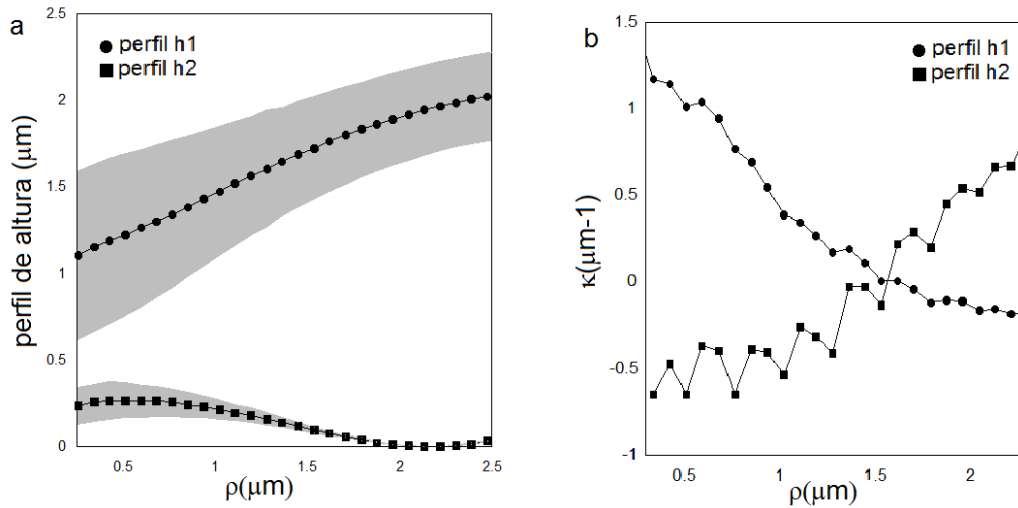


Figura 5.8: (a) Perfil de altura h_1 (pontos) e h_2 (quadrados) retornados pelo AG e a dispersão (área cinza) relativa à média sobre as 42 hemácias. (b) Curvaturas κ_1 (pontos) e κ_2 (quadrados) para cada membrana.

5.2 Análise de flutuação do contraste

Nesta última seção do capítulo iremos apresentar os métodos e resultados obtidos a partir da análise da flutuação quadrática média do contraste MD $((\Delta C)^2)$ em hemácias. Como visto no capítulo 4, as flutuações de altura de membranas (Δu) da célula podem ser acessadas via medidas de $(\Delta C)^2$, supondo um espectro de potência $u(\vec{q})$ para a flutuação. Nesta tese utilizamos o espectro de potência mais geral da literatura, proposto por Nir Gov *et al.*, e com o uso de um algoritmo genético determinamos o perfil radial das flutuações em altura de cada membrana da célula sanguínea. Este resultado é inédito na literatura e exclusivo da nossa técnica. Ao determinar estas flutuações definimos também os parâmetros elásticos do espectro de potência proposto por Gov. Por fim, discutimos os resultados obtidos e propomos novos termos para caracterizar a interação entre a bicamada lipídica e o

citoesqueleto. É importante ressaltar que a particularidade da MD em obter as flutuações de cada membrana da célula sanguínea independe do espectro de potência escolhido.

5.2.1 Métodos

Para acessar a flutuação de membranas utilizando a MD é necessário medir a flutuação quadrática média do contraste $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ para uma única distância focal Δf . Neste trabalho utilizamos uma desfocalização de $2 \mu\text{m}$, acima do plano médio da célula. Esta posição proporciona um contraste com boa razão sinal/ruído e define um plano z que está acima da espessura total da hemácia, garantindo que todos os pontos (em z) da célula contribuem para o contraste.

Para a medida de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ cada hemácia foi filmada por 30 segundos a uma taxa de 333 imagens por segundo. Para obter a flutuação quadrática média de cada pixel i das imagens, definimos primeiro o valor do contraste C_i , e depois subtraímos este valor do contraste médio $\langle C \rangle_i$. Com este procedimento obtemos um novo vídeo em que os *pixels* das imagens representam o desvio $(\Delta C)_i$ para um dado tempo. Ao elevar ao quadrado o valor para cada *pixel*, as imagens do vídeo passam a representar $(\Delta C)_i^2$. Por fim, fazendo uma média sobre todas as imagens coletadas obtemos uma única imagem representando a flutuação quadrática média $\langle (\Delta C)^2 \rangle$. Para eliminar possíveis flutuações de contraste inerentes ao processo de captura das imagens fazemos uma média espacial sobre nove *pixels* vizinhos na imagem final $\langle (\Delta C)^2 \rangle$, e subtraímos de todos os *pixels* desta imagem o valor da flutuação quadrática média para uma região fora da hemácia (*background*).

Como visto neste capítulo, a equação para flutuação quadrática média MD quando definida com a origem do eixo z no plano médio da hemácia é:

$$\langle (\Delta C(\vec{\rho}))^2 \rangle = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_q q dq \left[|u_1(q)|^2 \times \sin^2 \left(\frac{(\Delta f - h_1)q^2}{2k} \right) + |u_2(q)|^2 \times \sin^2 \left(\frac{(\Delta f + h_2)q^2}{2k} \right) \right]. \quad (5.12)$$

Como k_0 , Δf , Δn , $\langle (\Delta C(\vec{\rho}))^2 \rangle$, h_1 , h_2 e os vetores de onda (q) são conhecidos, se a forma dos espectros de potência $|u_{1/2}^2|$ é inserida, a flutuação

de altura de cada membrana,

$$|u_{1/2}(\vec{\rho})^2| = \frac{1}{2\pi} \int_q |u_{1/2}(q)^2| q dq \quad (5.13)$$

pode ser determinada por métodos computacionais. Neste trabalho iremos supor que os espectros são dados por [6]:

$$|u_1(q)^2| = \frac{k_B T}{\kappa_{c_1} q^4 + \sigma_1 q^2 + \gamma_1} \quad e \quad |u_2(q)^2| = \frac{k_B T}{\kappa_{c_2} q^4 + \sigma_2 q^2 + \gamma_2},$$

com os parâmetros κ_c , σ e γ como apresentados no capítulo 4. No entanto, como temos acesso à flutuação de contraste para vários pontos ao longo do raio ρ da hemácia, iremos supor que os parâmetros elásticos variam lentamente ao longo deste raio, podendo ser considerados como dependentes da posição ρ . Isto posto, utilizando um AG é possível ajustar os dados de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ com a equação 5.12 e obter a flutuação em altura de cada membrana (eq.5.13). O intervalo de integração usado no ajuste é $q = [0, 6; 12, 0] \mu\text{m}^{-1}$, onde o limite inferior é dado pela resolução óptica do microscópio e o limite superior é dado pela abertura numérica da objetiva utilizada na captura das imagens ($NA = 1, 3$).

AG: Flutuação de membranas

Assim como no caso do ajuste dos dados de contraste, ao aplicar o AG para ajustar os dados de flutuação do contraste, cada busca foi iniciada com uma população aleatória composta por um número x de indivíduos 20 vezes maior do que o número de variáveis da equação de ajuste. Neste caso, cada indivíduo da população descrevia um conjunto de parâmetros elásticos κ_{c_1} , κ_{c_2} , γ_1 , γ_2 , σ_1 e σ_2 . No entanto, como os parâmetros elásticos foram considerados como dependentes do raio da célula, o número de variáveis da equação foi seis vezes o número de pontos ρ (25 pontos), onde o número seis representa os três parâmetros elásticos para cada membrana. Isto corresponde a um total de 150 variáveis, de forma que a população inicial utilizada possuía 3000 indivíduos. Como cada parâmetro elástico possui uma faixa de valores particular, foi definida uma região de busca inicial para cada parâmetro, sendo elas: $k_c = [0 - 100] k_B T$, $\gamma = [0 - 500000] k_B T / \mu\text{m}^4$ e $\sigma = [0 - 50000] k_B T / \mu\text{m}^2$ onde k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura em Kelvin ($T = 298K$ para os experimentos). É importante dizer que estes limites foram continuamente reduzidos

à medida que a zona de convergência do algoritmo foi delimitada. Os resultados finais foram obtidos com os seguintes limites: $k_{c1} = [0 - 50]k_B T$, $k_{c2} = [0 - 30]k_B T$, $\gamma_1 = [0 - 80000]k_B T/\mu\text{m}^4$, $\gamma_2 = [0 - 220000]k_B T/\mu\text{m}^4$, $\sigma_1 = [0 - 22000]k_B T/\mu\text{m}^2$ e $\sigma_2 = [0 - 50000]k_B T/\mu\text{m}^2$.

Para avaliação dos indivíduos ao longo das gerações utilizou-se novamente o cálculo da função de mérito Ψ^2 (eq. 5.8), na qual T é o conjunto de dados $\langle (\Delta C^2(\vec{\rho})) \rangle$. Além disso, o algoritmo foi encerrado quando o valor retornado pela função de mérito não apresentou modificações maiores que 1% da variância dos dados experimentais, por no mínimo 1000 gerações consecutivas, iniciando a contagem a partir de valores da função de mérito abaixo de 10% da variância dos dados experimentais. Isto corresponde a uma precisão de 10^{-7} nos dados de flutuação de contraste $\langle (\Delta C^2 \vec{\rho}) \rangle$. Por fim, para avaliar a robustez do algoritmo às condições iniciais, dez execuções adicionais foram realizadas com populações aleatórias diferentes, sendo que em cada execução uma média de 5×10^6 avaliações da função de mérito foram necessárias para que o algoritmo convergisse. No gráfico 5.9 abaixo vemos a progressão do melhor indivíduo para uma dada execução, que retornou um melhor indivíduo com $\Psi^2 = 1,45 \times 10^{-10}$, após 1247 gerações.

5.2.2 Resultados

Para os resultados de flutuação de membranas trabalhamos com os dados de flutuação quadrática do contraste para as mesmas 42 células utilizadas na determinação dos perfis de altura das membranas. Ao determinar o perfil radial de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ para cada célula notamos a existência de três perfis distintos. Na figura 5.10(a) apresentamos estes três comportamentos: as curvas 1 e 3 possuem o ponto inicial em comum, mas enquanto a curva 3 mantém este mesmo valor até $\rho \sim 1,20 \mu\text{m}$, para só depois começar a decair, a curva 1 aumenta e apresenta um pico próximo a $\rho \sim 1,20 \mu\text{m}$, a partir do qual decresce monotonicamente. Diferentemente, a curva 2 começa de um ponto inicial com um valor menor do que aquele das curvas 1 e 3, e possui um pico mais definido do que a curva 1, porém próximo ao raio $\rho \sim 2,00 \mu\text{m}$. Depois deste raio, a curva decai monotonicamente atingindo um valor mínimo maior do que aquele para as curvas 1 e 3. É importante ressaltar que todos

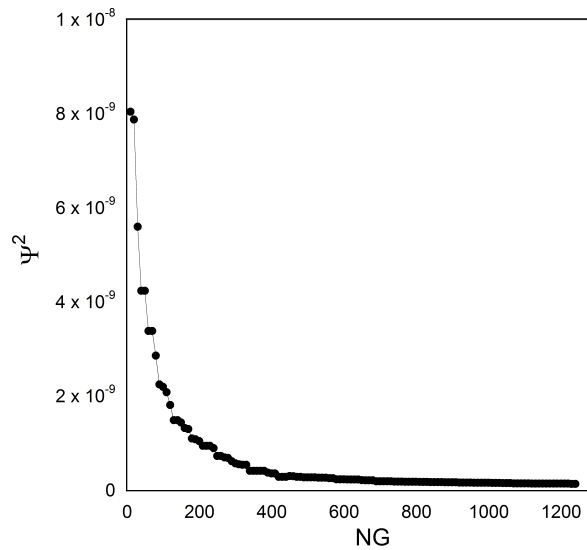


Figura 5.9: Progressão do melhor indivíduo para uma dada execução do AG. O gráfico mostra o valor da função mérito Ψ^2 para cada geração. Após 1247 gerações retornou o melhor indivíduo com $\Psi^2 = 1,45 \times 10^{-10}$. Neste caso, o AG leva cerca de 20 horas para convergir quando rodado em computadores com processadores *i7* e 32 GB de RAM.

os três tipo de curvas foram observadas para hemácias presentes em uma mesma amostra, indicando que esta variabilidade é natural das hemácias. Esta observação difere de resultados relatados por outros autores, que relatam observar um único perfil de flutuação para hemácias [13].

Um fato interessante sobre os diferentes perfis de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ é que cada um deles está associado a um perfil de espessura H particular das células. Na figura 5.10(b) mostramos quais são estes perfis de altura. Ao relacionar o perfil de flutuação com o perfil de espessura, notamos que hemácias que exibem um perfil monotônico (curva 3), possuem espessura menor do que aquelas que possuem flutuação de contraste com comportamento não monotônico. Além disso, as hemácias com perfil de espessura mais acentuado são aquelas que apresentam o perfil de flutuação não monotônico e com o pico próximo à região de máxima derivada de H . Por fim, as maiores hemácias (tanto em espessura quanto em raio) são aquelas que apresentam um perfil de flutuação com pico próximo à região em que a hemácia está aderida ao

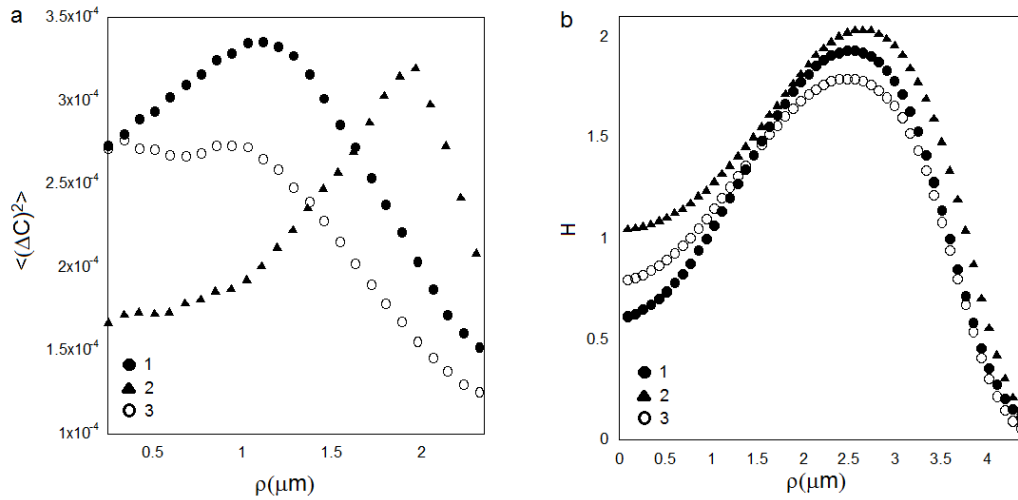


Figura 5.10: (a) Perfil radial dos três comportamentos observados para o dado de flutuação quadrática média do contraste $\langle (\Delta C)^2 \rangle$. As curvas 1, 2 e 3 foram obtidas para hemácias de uma mesma amostra, indicando que esta variabilidade é natural das células. (b) Perfil de espessura associado a cada tipo de curva em (a). Como pode ser visto, existe uma relação entre forma e flutuação de contraste.

substrato. A relação entre forma e propriedades de células é um tópico atual na literatura [15,74], e os gráficos discutidos indicam uma possível correlação entre forma e flutuação de membranas de hemácias.

Uma média sobre todos os 42 perfis de flutuação quadrática média do contraste foi gerada para ser ajustada pelo AG. O perfil resultante é ilustrado na figura 5.11(a), e como pode ser visto, a curva se assemelha com a curva 1 discutida acima, porém com um perfil mais suave. A flutuação de contraste possui um valor máximo de $\sim 2 \times 10^{-4}$ em $\rho = 1,10 \mu\text{m}$ e um valor mínimo de $\sim 4 \times 10^{-5}$ em $\rho = 2,30 \mu\text{m}$. Para pontos além deste raio, $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ aumenta rapidamente devido aos efeitos de difração na borda, como mostrado anteriormente para o dado de contraste. Sendo assim, a análise da flutuação foi feita para raios menores que $2,30 \mu\text{m}$. A área cinza ao redor da curva representa a dispersão em relação à média de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$, e reflete a variabilidade natural das células. Na letra b da figura, a média dos ajustes retornados pelo algoritmo é apresentada. Os pontos representam

o dado de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ e a linha contínua representa a média sobre os 10 ajustes finais. A dispersão em relação à média dos ajustes é ilustrada pela área cinza do gráfico. Como pode ser visto, o uso do AG com a equação 5.12 e espectro de potência proposto por Nir Gov *et al.* retorna um bom ajuste do dado experimental.

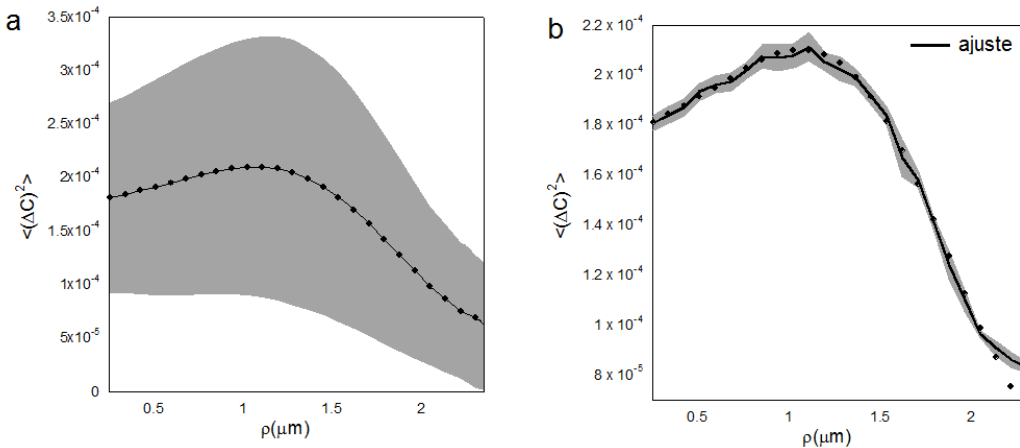


Figura 5.11: (a) Média sobre todos os perfis de flutuação quadrática média das 42 hemácias analisadas. Este são os dados a serem ajustados pelo AG. A área cinza ao redor da curva indica a dispersão em relação à média e reflete a variabilidade natural das células. (b) Média dos ajustes retornados pelo AG: os pontos representam o dado de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ e a linha contínua representa a média sobre os 10 ajustes finais. A dispersão em relação à média dos ajustes é ilustrada pela área cinza do gráfico. Como pode ser visto, o uso do AG com a equação 5.12 e espectro de potência proposto por Nir Gov *et al.* retorna um bom ajuste do dado experimental.

Na figura 5.12 apresentamos os perfis radiais das flutuações em altura obtidos para cada membrana pelo AG. Como geralmente utilizado na literatura, apresentamos o valor referente à raiz quadrada de $\langle (u)^2 \rangle$, ou seja $u_{1(rms)}$ e $u_{2(rms)}$, onde *rms* vem do termo *root mean square* em inglês. No gráfico são apresentadas 4 curvas diferentes, sendo duas para cada membrana: os pontos em azul são relativos à membrana superior das células, e os quadrados vermelhos são relativos à membrana inferior. Vemos que os valores para flutuação u_{rms} variam de 3 a 9 nm, o que está um pouco abaixo dos usualmente medidos por outras técnicas [14]. Os pontos e quadrados cheios representam

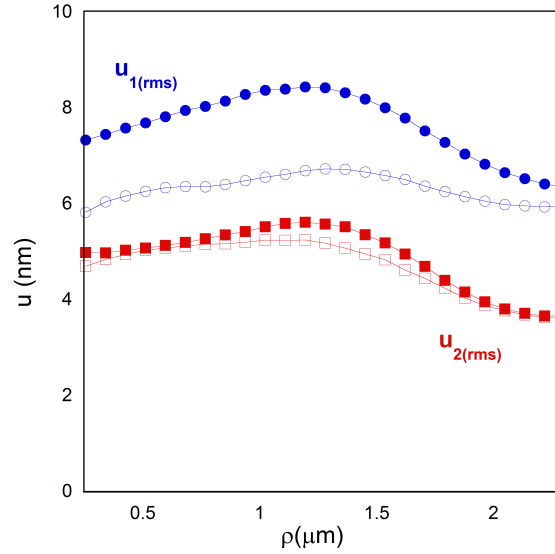


Figura 5.12: Perfis radiais das flutuações em altura obtidos para cada membrana pelo AG. Como geralmente utilizado na literatura, apresentamos o valor referente à raiz quadrada de $\langle (\Delta u)^2 \rangle$, $u_{1(rms)}$ e $u_{2(rms)}$. Os pontos em azul são relativos à membrana superior das células e os quadrados vermelhos são relativos à membrana inferior. Os símbolos vazios representam as flutuações $u_{1(rms)}$ e $u_{2(rms)}$ corrigidas por um fator $\sqrt{4 - 3 \cos^2(\theta)}$ devido à inclinação e movimento lateral da célula.

as flutuações de membrana obtidos diretamente pelo programa. Por estes dados vemos que $u_{1(rms)}$ e $u_{2(rms)}$ possuem amplitudes diferentes, porém com um perfil radial similar. Ambos perfis crescem até atingir um valor máximo em torno do raio $\rho = 1,20 \mu\text{m}$. Depois deste ponto, ambas flutuações decrescem até atingir um valor mínimo em $\rho = 2,30 \mu\text{m}$. Apesar de exibirem um comportamento similar, para todo ponto ρ , $u_{1(rms)} > u_{2(rms)}$. Esta diferença na amplitude das flutuações é esperada, já que a membrana h_2 está aderida ao substrato e h_1 está livre para flutuar. Uma observação interessante é que mesmo para raios próximos à zero (centro da hemácia), onde a membrana de baixo não está aderida, h_2 flutua consideravelmente menos do que h_1 . Isto indica que os efeitos relativos à adesão ao substrato não são localizados na região de adesão e podem se estender por toda a membrana. Além desta diferença, nota-se que o perfil $u_{1(rms)}$ possui um pico mais pronunciado do

que o perfil $u_{2(rms)}$. As outras duas curvas da figura (pontos e quadrados vazios) representam as mesmas flutuações $u_{1(rms)}$ e $u_{2(rms)}$, porém corrigidas por um fator $\sqrt{4 - 3 \cos^2(\theta)}$ devido à inclinação e ao movimento lateral da célula. Para entender esta correção usamos a figura 5.13. Na letra (a) da

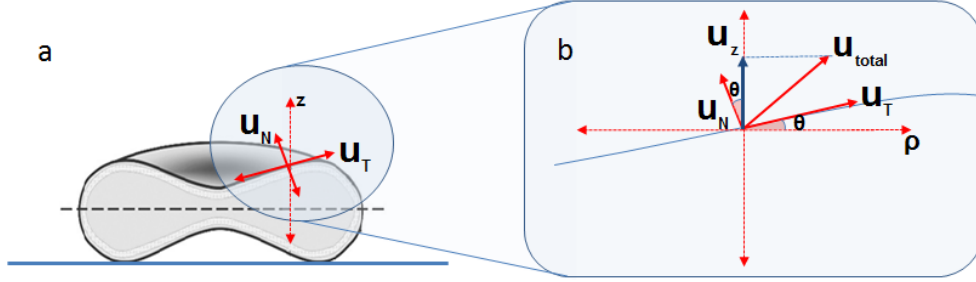


Figura 5.13: Representação das duas componentes da flutuação total u_{total} da membrana superior de uma hemácia: u_T na direção da superfície da membrana e u_N normal à superfície, que é a flutuação em altura. Na figura temos também representado o eixo z da nossa montagem experimental, que é o eixo ao longo do qual coletamos as flutuações. As flutuações obtidas pelo AG e representadas na figura 5.12 são as flutuações u_z , que é a projeção em z da flutuação total u_{total} . Pela figura b tiramos a correção para as flutuações u_z .

figura temos representadas as componentes da flutuação total $\langle u_{total} \rangle$ da membrana superior de uma hemácia. Como pode ser visto, esta flutuação possui duas componentes: uma na direção da superfície da membrana, que chamaremos de tangencial u_T , e outra normal à superfície u_N , que é a flutuação em altura. Na figura temos também representado o eixo z da nossa montagem experimental, que é o eixo ao longo do qual coletamos as flutuações. Sendo assim, as flutuações obtidas pelo AG e representadas na figura 5.12 são as flutuações u_z , ou seja, a projeção em z da flutuação total u_{total} (figura (b)). Logo, a flutuação u_z possui componentes u_T e u_N . Como o espectro proposto por Nir Gov é um espectro para flutuações de altura, a flutuação u_z deve ser corrigida para se obter somente u_N . Pela figura (b) tiramos a relação:

$$\langle (u_z)^2 \rangle = \langle (u_N)^2 \rangle \cos^2 \theta + \langle (u_T)^2 \rangle \sin^2 \theta, \quad (5.14)$$

e portanto,

$$\langle (u_N)^2 \rangle = \frac{\langle (u_z)^2 \rangle - \langle (u_T)^2 \rangle \sin^2 \theta}{\cos^2 \theta}, \quad (5.15)$$

onde θ é o ângulo formado entre a flutuação medida u_z e a flutuação normal u_N . Utilizando argumentos geométricos é fácil ver que θ também é o ângulo que a superfície da hemácia faz com a direção radial ρ . Sendo assim, $\theta = \frac{dh}{d\rho}$, onde h é o perfil de altura da hemácia. Isto posto, para obter a flutuação normal só nos resta saber as ordens de grandeza de u_N e u_T . Iremos trabalhar com o valor *rms* das flutuações. O valor de $u_{N(rms)}$ é o valor de flutuação $u_{z(rms)}$ na região próxima ao centro da hemácia, pois nesta região $\theta = 0$, logo $u_{T(rms)} = 0$. Pela figura 5.12 vemos que este valor é da ordem de 8 nm para a membrana de cima, e portanto, $u_{N(rms)} \sim 8$ nm. Para determinar a ordem de grandeza da flutuação tangencial fazemos a suposição de que esta componente é causada somente devido ao movimento de cisalhamento (movimento lateral) da hemácia. Se isto é verdade, o espectro de flutuação desta componente pode ser aproximado por:

$$\langle (u_T)^2 \rangle \simeq \frac{k_B T}{\mu} \simeq 5 \times 10^{-16} m^2, \quad (5.16)$$

para um módulo de cisalhamento de 8×10^{-6} , medido por Popescu *et al.* [15,17]. O valor *rms* para esta flutuação é então da ordem de 22 nm. Para confirmar este valor utilizamos os vídeos de contraste MD e fizemos uma estimativa das flutuações nas bordas da hemácia. A flutuação nesta região é principalmente devido ao movimento lateral da hemácia, de forma que seu valor é uma boa aproximação para $u_{T(rms)}$. Para fazer esta estimativa aplicamos um *threshold* nas imagens do vídeo e medimos o deslocamento do centro de massa de pixels situados nas bordas da célula. Os valores obtidos por esta estimativa estão na faixa de 20 nm, indicando que 5.16 descreve bem a flutuação $u_{T(rms)}$. Supondo que o u_T e u_N não variam muito ao longo da superfície da célula, chegamos à conclusão que $u_{T(rms)} \simeq 2u_{N(rms)}$. Esta relação permite reescrever a equação 5.14 como:

$$\langle (u_z)^2 \rangle = \langle (u_N)^2 \rangle (\cos^2 \theta + 4 \sin^2 \theta) = 4 - 3 \cos^2 \theta, \quad (5.17)$$

e portanto,

$$\langle (u_N)^2 \rangle = \frac{\langle (u_z)^2 \rangle}{4 - 3 \cos^2 \theta}. \quad (5.18)$$

Sendo assim, para obter $u_{N(rms)}$ os dados de flutuação gerados pelo AG devem ser divididos pelo termo $\sqrt{4 - 3\cos^2\theta}$, onde θ é o ângulo entre o perfil de cada membrana e o eixo ρ . Nos trabalhos de Rappaz *et al.* [12,13] é proposta uma correção que leva em conta somente o termo em cosseno da figura 5.13. No entanto, como a técnica utilizada por Rappaz para as medidas não é capaz de determinar os perfil de altura h_1 e h_2 , o ângulo θ é calculado a partir do perfil de espessura H da célula. Na nossa correção calculamos o valor de θ para cada membrana.

Aplicando a correção (eq. 5.18) nos dados de $u_{1(rms)}$ e $u_{2(rms)}$, obtemos os pontos e quadrados vazios para a membrana superior (azul) e inferior (vermelho), respectivamente. Como pode ser visto, esta correção provoca uma pequena diminuição nas amplitudes das flutuações, suaviza os picos previamente observados e indica que a amplitude de flutuação em altura para a membrana de cima é quase constante ao longo do raio da hemácia. Diferentemente, a amplitude de flutuação em altura para membrana de baixo continua a ser mínima nas regiões onde a membrana está aderida.

A distribuição das flutuações em altura ao longo da célula ainda é um problema em aberto na literatura, e técnicas diferentes retornam distribuições diferentes. Como mencionamos anteriormente, a teoria de Nir Gov prevê uma diminuição das flutuações em regiões da célula com maiores curvaturas, o que concorda com os resultados obtidos pela MD. No entanto, em 2010 Popescu e outros autores, incluindo Nir Gov, publicaram um trabalho em que afirmam que as flutuações de altura são na verdade "realçadas e altamente localizadas na região convexa externa das células". Os gráficos da espessura total $h(r)$ e das flutuações em altura $(\Delta h)^2(r)$ de 40 células publicados neste trabalho são ilustrado na figura 5.14. Uma análise cuidadosa das flutuações até o raio de $\sim 2 \mu\text{m}$ assinala que o aumento das flutuações até a região convexa externa da célula é muito suave e pequena, quando comparado à dispersão em relação à média (área cinza). Sendo assim, a afirmação de que as flutuações são localizadas nas regiões convexas externas das hemácias é questionável.

Além do perfil radial das flutuações de altura, o algoritmo genético retorna o perfil radial das constantes elásticas k_c , γ e σ para cada membrana. Nos gráficos a seguir vamos expor estes resultados, e analisar os comportamentos observados. A obtenção destes parâmetros para cada membrana

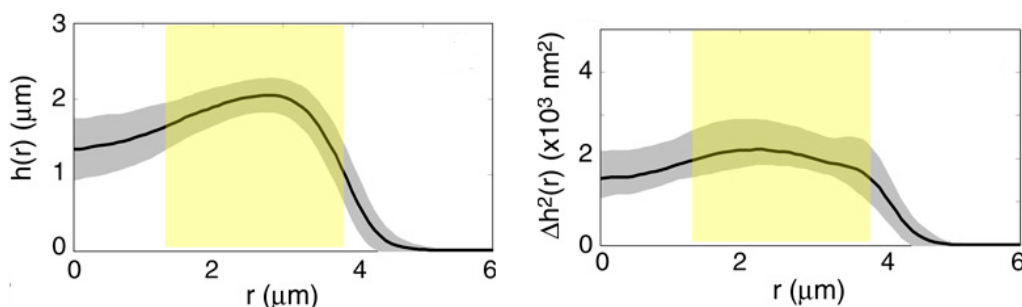


Figura 5.14: Gráficos da espessura total $h(r)$ e das flutuações em altura $(\Delta h)^2(r)$ de 40 células publicados em [16]. Um análise criteriosa assinala que o aumento das flutuações até o raio de $\sim 2 \mu\text{m}$ é muito suave, e pequeno quando comparado à dispersão em relação à média (área cinza), questionando a afirmação de que as flutuações são "realçadas e altamente localizadas na região convexa externa das células".

é também inédita na literatura. Iremos apresentar as constantes elásticas usando os mesmos símbolos utilizados no gráfico 5.12: círculos e quadrados cheios para representar as constantes das membranas de cima e de baixo, respectivamente, e círculos e quadrados vazios para representar as constantes corrigidas pelo fator de correção devido à inclinação e movimento lateral da superfície da hemácia. No caso dos parâmetros elásticos, para serem corrigidos eles são multiplicados pelo termo $4 - 3\cos^2\theta$, já que eles são inversamente proporcionais à flutuação $\langle u^2 \rangle$ (eqs. 5.13 e D.11).

Começamos com os resultados para o módulo de curvatura k_c . No gráfico 5.15 temos os perfis radiais para k_{c1} e k_{c2} .

Como pode ser visto pela figura, os valores para k_{c1} e k_{c2} variam entre 10 e $50 k_B T$, o que está de acordo com valores obtidos por outras técnicas [14]. No entanto, k_{c1} e k_{c2} possuem comportamentos diferentes ao longo do raio da hemácia: k_{c1} é aproximadamente constante ($k_{c1} \sim 10 k_B T$) para raios $\rho < 1,50 \mu\text{m}$, e depois deste ponto aumenta rapidamente até atingir o valor máximo de $\sim 50 k_B T$ para o raio final; k_{c2} começa do valor máximo de $\sim 40 k_B T$ e decresce lentamente até ficar aproximadamente constante assumindo valores de $\sim 10 k_B T$. Uma análise que explica este comportamento é pensar na membrana de hemácias como uma membrana plana e quadrada, de lado l_0 e espessura e , como representada na figura 5.16(a). Se a mem-

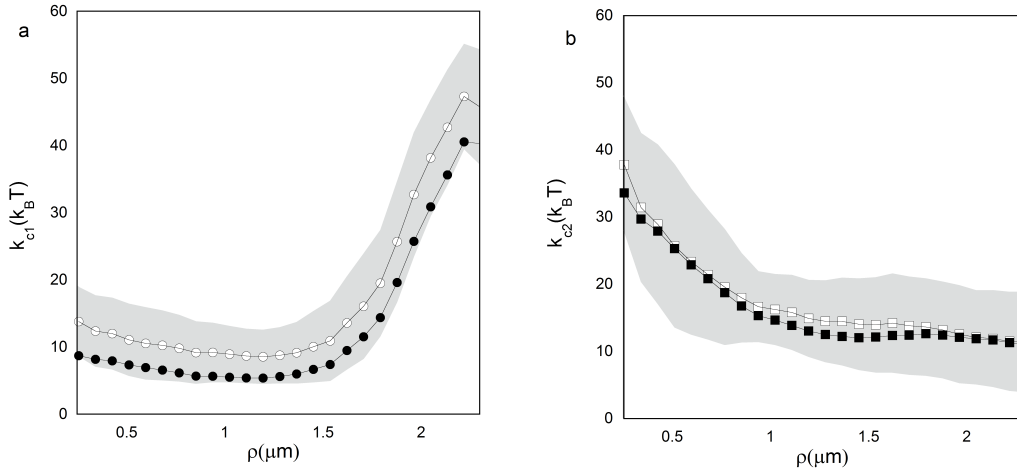


Figura 5.15: Perfis radiais para os módulos de curvatura k_{c1} (a) da membrana de cima e k_{c2} (b) da membrana de baixo. Os símbolos cheios representam o módulo sem correção e os símbolos vazios o módulo corrigido.

brana é curvada em uma calha de raio de curvatura R e ângulo θ , a área superior da membrana sofre uma expansão de $\Delta A = l_0 \times \Delta l$ e a área inferior sofre uma compressão de mesmo valor, como representado na figura 5.16(b). Para calcular a energia envolvida nesta expansão/compressão, utilizamos a equação 4.1 para o módulo compressão:

$$T_t = K_A \left(\frac{\Delta A}{A} \right), \quad (5.19)$$

que equivale a uma densidade de energia f_t [78]:

$$f_t = \frac{K_A}{2} \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2. \quad (5.20)$$

Como a área inicial da membrana é $A = l_0^2$, temos que a deformação sofrida por cada área (superior e inferior) é dada por:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\Delta l \times l_0}{l_0^2} = \frac{\Delta l}{l_0}, \quad (5.21)$$

que pode ser obtida a partir da definição do ângulo θ . Da figura 5.16(b) vemos que:

$$\theta = \frac{l_0}{R}. \quad (5.22)$$

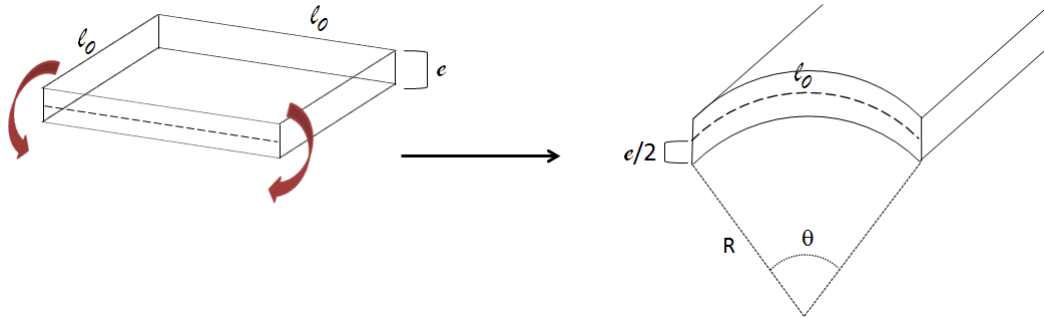


Figura 5.16: (a) Representação de uma membrana plana e quadrada, de lado l_0 e espessura e . (b) A membrana é curvada pelas extremidades e assume a forma de uma calha de raio de curvatura R e ângulo θ .

No entanto, o ângulo também pode ser obtido a partir das dimensões das áreas de cima ou baixo, retornando:

$$\theta = \frac{l_0 + \Delta l}{R + e/2} = \frac{l_0 - \Delta l}{R - e/2}. \quad (5.23)$$

Igualando as definições de θ , obtemos que:

$$\frac{\Delta l}{l_0} = \frac{e}{2R}, \quad (5.24)$$

de forma que a densidade de energia associada à compressão e à expansão da áreas é:

$$f_t = 2 \times \frac{K_A}{2} \left(\frac{e}{2R} \right)^2 = \frac{K_A}{4} \frac{e^2}{R^2}. \quad (5.25)$$

Nesta equação podemos identificar a densidade de energia envolvida em uma flexão da membrana:

$$f_c = \frac{1}{2} k_c C^2 = \frac{1}{2} k_c \frac{1}{R^2} \quad (5.26)$$

onde k_c é o módulo de curvatura. Combinando as equações 5.25 e 5.26, obtemos a relação para o módulo de curvatura:

$$k_c = \frac{K_A e^2}{2}. \quad (5.27)$$

onde K_A é o módulo de compressão. Sendo assim, sabendo-se o valor de K_A e usando os valores de k_c retornados pelo AG somos capazes de determinar a espessura da membrana (bicamada+citoesqueleto) para a hemácia. Os valores

para K_A para a membrana livre e aderida da hemácia serão determinados a seguir, a partir dos dados de potencial de confinamento γ retornados pelo AG. No entanto, para concluir a análise do módulo de curvatura iremos apresentá-los em avanço. Os valores para o módulo de compressão das membranas livre e aderida da célula sanguínea são $K_A = (7,8 \pm 0,1) \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$ e $K_A = 17 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$, respectivamente. Aplicando estes valores na equação 5.27 obtemos os gráficos da figura 5.17.

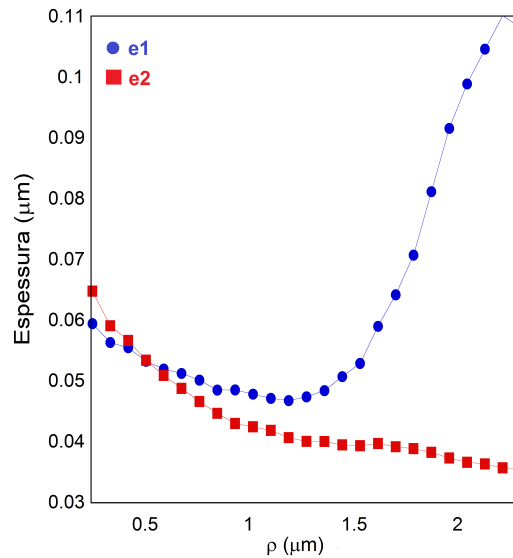


Figura 5.17: Perfis radiais para a espessura e_1 da membrana de cima (azul) e e_2 da membrana de baixo (vermelho), obtidos com os respectivos módulos k_c corrigidos.

Pelos gráficos notamos que os valores para a espessura da membrana estão entre $(0,030 - 0,100) \text{ nm}$, o que concorda com valores reportados na literatura [6]. Analisando o perfil e_1 da espessura da membrana livre vemos que a espessura aumenta consideravelmente para posições radiais maiores que $1,50 \mu\text{m}$. Este mesmo comportamento foi relato por Y. Fung e P. Tong [75], e portanto, reforça a interpretação apresentada. Além disso, observando o perfil de e_2 da espessura da membrana aderida, vemos que as membranas possuem aproximadamente o mesmo valor no centro da hemácia, e que a membrana de baixo torna-se cada vez menos espessa conforme vai se aproximando do substrato. Acreditamos que este decréscimo na espessura pode ser

devido à interação da membrana com o substrato de vidro, que provavelmente induz uma compactação da membrana.

Na figura 5.18 temos os resultados para o perfil radial dos potenciais de confinamento γ_1 (a) e γ_2 (b). Os valores de γ variam entre $[10 - 120] \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^4$. Como pode ser visto, γ_1 possui um leve decaimento e depois permanece aproximadamente constante em $18 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^4$. Já γ_2 começa aproximadamente constante e depois aumenta para raios maiores que $1,50 \mu\text{m}$. Além disso, o valor para γ_2 é sempre maior do que γ_1 , provavelmente devido à interação da membrana de baixo com o substrato.

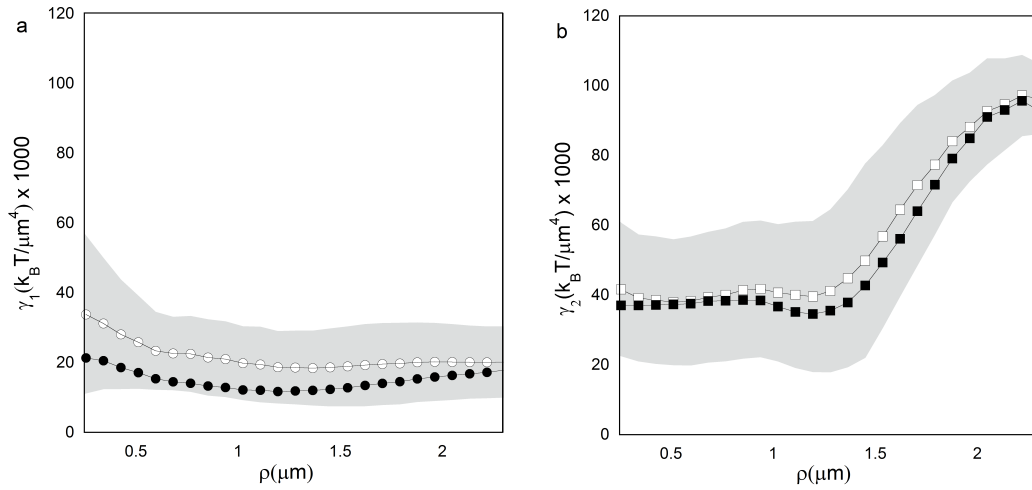


Figura 5.18: Perfis radiais para os potenciais de confinamento γ_1 (a) da membrana de cima e γ_2 (b) da membrana de baixo. Os símbolos cheios representam o potencial sem correção e os símbolos vazios o potencial corrigido.

Começamos analisando o perfil para γ_1 . Segundo Gov, o potencial harmônico modela a força restauradora induzida ao longo de toda a bicamada lipídica devido à presença do citoesqueleto, e é dado por:

$$\gamma = 4\mu(2H^2 - K), \quad (5.28)$$

onde μ é o módulo de cisalhamento do citoesqueleto, H é a curvatura média e K é a curvatura gaussiana da superfície. Uma boa estimativa para μ em hemácias é $\mu = K_A/2$ [15], onde K_A é o módulo de compressão de área, como definido no capítulo 4. Na figura 5.19(a) mostramos o termo $(2H^2 - K)$

para a membrana de cima. Os dois primeiros pontos do perfil ($2H^2 - K$) são excluídos, pois o termo depende de derivadas segundas que só podem ser calculadas a partir do terceiro ponto. Como pode ser visto, o termo é máximo para $\rho = 0$ e decai para zero quando $\rho \rightarrow 2 \mu\text{m}$. Na figura 5.19(b) mostramos os dados experimentais para γ_1 e o ajuste com a equação proposta por Gov (linha contínua), utilizando um K_A típico para hemácias ($K_A \sim 4 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$) [6,15]. Como pode ser visto, a teoria de Gov não ajusta os dados experimentais por dois motivos fundamentais: primeiro devido à diferença nas amplitudes e segundo, porque o termo ($2H^2 - K$) decai a zero, enquanto γ_1 decai para um valor de $\sim 18 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$.

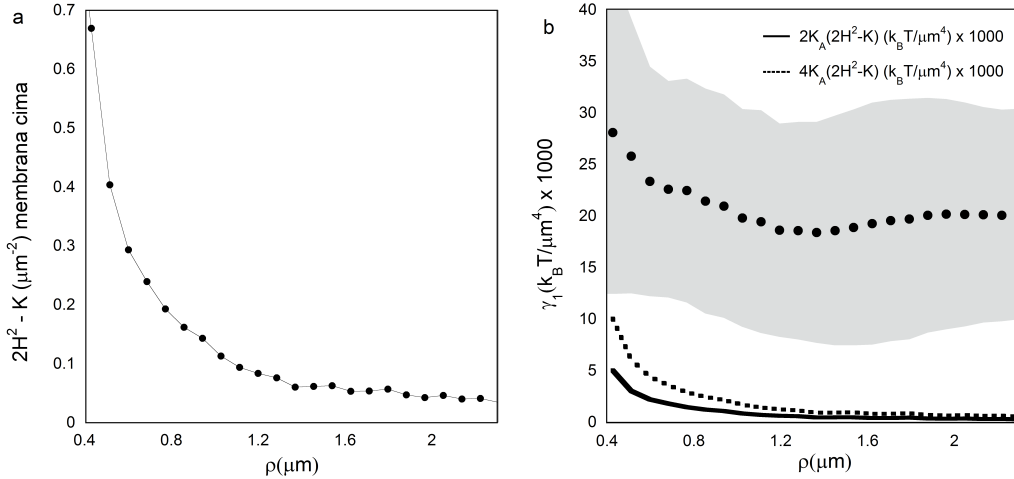


Figura 5.19: (a) Termo de curvatura ($2H^2 - K$) para a membrana de cima. (b) Dados de γ_1 (pontos) e tentativas de ajustes com $\gamma_g = 2K_A(2H^2 - K)$ (linha contínua) e $\gamma_e = 4K_A(2H^2 - K)$ (linha pontilhada).

Uma outra proposta para o potencial de confinamento foi formulada por Popescu *et al.* [15]. O modelo de hemácias proposto por Popescu simplifica a forma complexa das células e trata a hemácia como uma membrana composta (bicamada lipídica/citoesqueleto) esférica de raio R_0 . Neste modelo o acoplamento linear entre os módulos de curvatura k_c e compressão K_A de uma membrana curva são levados em conta, e segundo os autores, esta característica fornece uma descrição mais apurada da dinâmica das hemácias que os modelos baseados em membranas planas. Sendo assim, na presença de curvatura os módulos k_c e K_A se tornam acoplados. Para dedu-

zir o espectro de flutuações desta membrana esférica (feito via teorema da flutuação-dissipação) é necessário saber como a membrana se comporta sob a ação de forças (radiais). Segundo Popescu, deslocamentos radiais espacialmente uniformes de uma membrana esférica geram uma força restauradora associada com as mudanças de curvatura e área da membrana. A resposta a este deslocamento, que é basicamente o modo de respiração de uma esfera, gera uma força restauradora que associamos previamente com o potencial de confinamento. Para calcular o potencial de confinamento resultante desta modelagem utilizamos novamente a equação 4.1 para o módulo compressão:

$$T_t = K_A \left(\frac{\Delta A}{A} \right), \quad (5.29)$$

que equivale a uma densidade de energia f_t [78]:

$$f_t = \frac{K_A}{2} \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2, \quad (5.30)$$

Para uma esfera de raio R_0 , o raio resultante de um deslocamento radial u é dado por $R = R_0 + u$. Como sabemos, a área de uma esfera é dada por $A = \pi R^2$, o que aplicado em 5.29 nos dá uma densidade de energia (desprezando o termo em u^4):

$$f_t = 2K_A \frac{u^2}{R_0^2} = 2K_A \frac{2}{R_0^2} \frac{u^2}{2} = \gamma \frac{u^2}{2}, \quad (5.31)$$

onde $\frac{1}{R_0}$ é a curvatura da esfera. Se ao invés da curvatura da esfera proposta por Popescu, utilizarmos as curvaturas principais da hemácia C_1 e C_2 , teremos a seguinte densidade de energia:

$$f_t = 2K_A \left(C_1^2 + C_2^2 \right) \frac{u^2}{2} = 4K_A (2H^2 - K) \frac{u^2}{2} \quad (5.32)$$

o que corresponde ao seguinte potencial de confinamento:

$$\gamma_e = 4K_A (2H^2 - K). \quad (5.33)$$

Se usarmos $K_A \sim 4 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$ na equação γ_e para ajuste dos dados experimentais de γ_1 obtemos a linha pontilhada do gráfico (b) da figura 5.19.

A comparação entre os valores retornados pela equação 5.33 e os valores de γ_1 melhora levemente em relação ao ajuste utilizando a equação de

Gov. Apesar disso, enquanto o dado experimental converge para um valor de $\sim 18 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$, ambos ajustes indicam que o potencial é nulo para $(2H^2 - K) = 0$. Ou seja, as teorias de Gov e Popescu nos dizem que regiões da membrana que possuem curvatura nula não estão sujeitas nenhum tipo de confinamento. Se este é o caso, o que mantém o citoesqueleto e a bicamada lipídica unidos nestas regiões? É razoável pensar que além de um aumento do confinamento entre bicamada e citoesqueleto devido à curvatura da membrana (figura 4.7), existe também um potencial "base" responsável por manter a bicamada e o citoesqueleto unidos. Seguindo esta linha de raciocínio propomos um termo extra no potencial de confinamento da equação 5.33. Para a dedução deste termo imaginamos que a membrana (bicamada + citoesqueleto) superior é plana, e o que garante sua unidade é um envelope esférico com curvaturas $\frac{1}{H_{max}/2}$ e $\frac{1}{R_h}$, onde H_{max} e R_h são a espessura máxima e o raio da hemácia, respectivamente. Para visualizar a forma deste envelope, que lembra a forma de um pneu, usamos a figura 5.20. Sendo assim, o novo

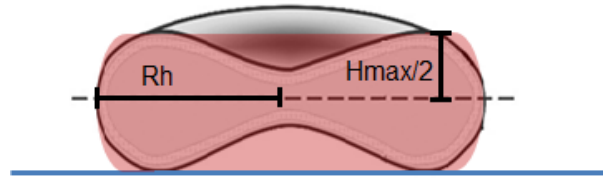


Figura 5.20: Ilustração do envelope esférico que garante a unidade da membrana composta. A forma do envelope lembra um pneu e possui como curvaturas principais $\frac{1}{H_{max}/2}$ e $\frac{1}{R_h}$, onde H_{max} e R_h são a espessura máxima e o raio da hemácia, respectivamente.

termo para o potencial de confinamento (γ_p) é:

$$\gamma_p = 2K_A \left(\frac{4}{H_{max}^2} + \frac{1}{R_h^2} \right). \quad (5.34)$$

Utilizando os valores experimentais $H_{max} = 1,98 \mu\text{m}$ e $R_h = 4,18 \mu\text{m}$, obtemos $\gamma_p = 2,16K_A$. Obviamente, este termo nunca é nulo. Adicionando este novo termo à equação 5.33 podemos ajustar os dados de γ_1 deixando K_A como um parâmetro livre. O ajuste resultante é mostrado no gráfico 5.21 e retorna um módulo de compressão $K_A = (7,8 \pm 0,1) \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$. Este

valor é aproximadamente o dobro daquele medido por Popescu [15], porém é um valor muito razoável para a hemácia.

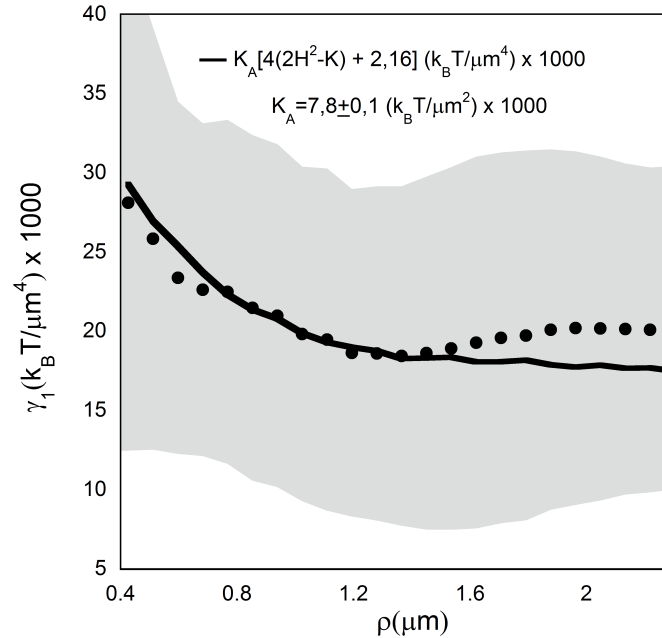


Figura 5.21: Ajuste dos dados experimentais de γ_1 utilizando a função $\gamma = 4K_A(2H^2 - K) + 2K_A\left(\frac{4}{H_{max}^2} + \frac{1}{R_h^2}\right)$. O ajuste retorna um potencial de confinamento $K_A = (7,8 \pm 0,1) \times 10^3 k_B T / \mu m^2$.

Para a análise do perfil do potencial de confinamento da membrana de baixo usamos a mesma equação deduzida para γ_1 , onde o termo $(2H^2 - K)$ é calculado para o perfil de membrana h_2 . O termo $(2H^2 - K)$ para h_2 está ilustrado na figura 5.22. Os dois primeiros pontos do perfil $(2H^2 - K)$ são excluídos, pois o termo depende de derivadas segundas que só podem ser calculadas a partir do terceiro ponto. Quando comparado ao mesmo termo obtido para a membrana de cima (gráfico (a) da figura 5.19), notamos que a principal diferença é que o termo para a membrana h_2 decai e depois volta a subir. Tentamos ajustar então o dado experimental de γ_2 com a equação $\gamma = 4K_A(2H^2 - K) + 2K_A\left(\frac{4}{H_{max}^2} + \frac{1}{R_h^2}\right)$, deixando K_A como parâmetro livre (gráfico (b) da figura 5.22). Claramente o ajuste não é bom, indicando que um outro potencial deve existir. Como a membrana de baixo está aderida ao substrato, é razoável imaginar que este novo termo do potencial seja relacionado à

adesão ao substrato. De fato, a presença do substrato limita fisicamente as flutuações da bicamada lipídica, e esta ação também pode ser modelada via um potencial de confinamento. Partindo deste princípio, utilizamos um módulo de compressão $K_A \sim 17 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$ de modo obter uma linha base, a partir da qual somaremos o outro termo de potencial. Isto posto,

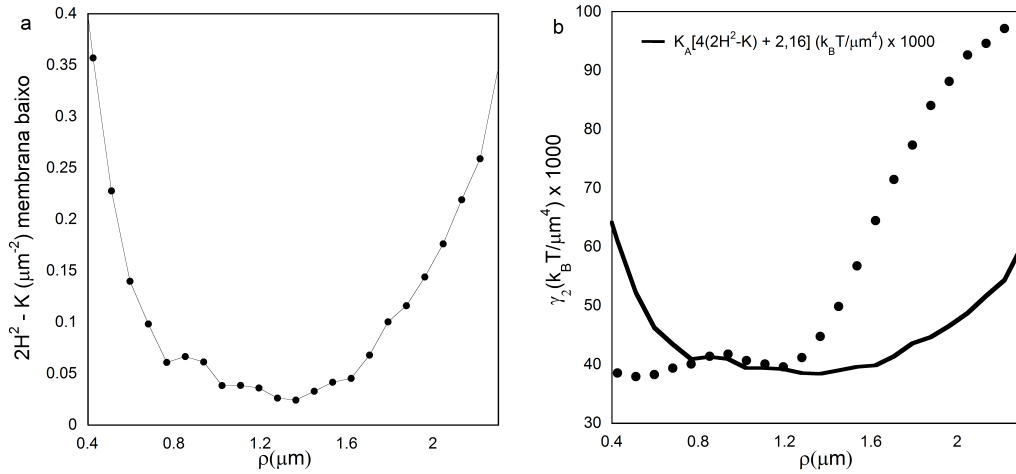


Figura 5.22: (a) Termo de curvatura ($2H^2 - K$) para a membrana de baixo. (b) Dados de γ_2 (pontos) e tentativa de ajuste com a equação indicada na figura (linha contínua). Claramente o ajuste não é bom, indicando que um outro potencial deve existir.

subtraímos de γ_2 os dados retornados por $\gamma = 17 \times 10^3 [4(2H^2 - K) + 2(\frac{4}{H_{max}^2} + \frac{1}{R_h^2})]$ e obtemos o gráfico da figura 5.23 (pontos). Uma escolha natural de ajuste para este novo γ_2 é uma função exponencial ou gaussiana. Mostramos na figura o ajuste por uma gaussiana (linha contínua), pois este retornou um menor desvio em relação aos dados. Sendo assim, do ajuste por $\gamma = m_1 \exp -\frac{h_2^2}{2m_2^2}$, onde os parâmetros m_1 e m_2 representam respectivamente a altura e o desvio padrão da gaussiana, obtemos os parâmetros $m_1 = 44,1 \mp 0,7 k_B T / \mu\text{m}^4$ e $m_2 = (0,076 \mp 0,002) \mu\text{m}$. O ajuste é muito bom, e indica que o potencial de confinamento devido à adesão ao substrato possui um decaimento rápido conforme a distância entre a membrana h_2 e o substrato aumenta.

É importante mencionar dois aspectos que reforçam a nossa hipótese de existência de um potencial de confinamento devido à interação com o subs-

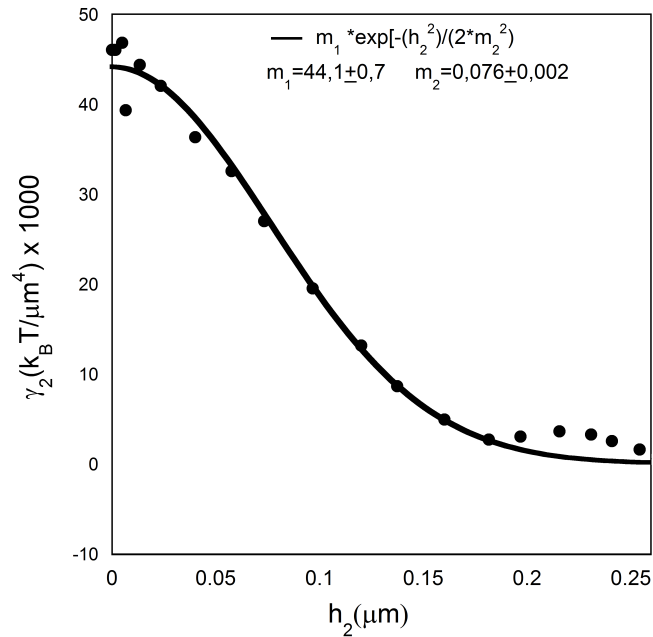


Figura 5.23: (a) Dados $\gamma_2 - 17 \times 10^3 [4(2H^2 - K) + 2(\frac{4}{H_{max}^2} + \frac{1}{R_h^2})]$ (pontos) e ajuste por uma gaussiana (linha pontilhada).

trato. Primeiro, ao observar os três primeiros pontos do gráfico 5.23 notamos que eles são menores do que o valor máximo atingido por γ_2 . Isto indica que após este ponto máximo, o potencial começa a decair. O interessante é que estes pontos de decaimento correspondem justamente os pontos de h_2 em que a membrana começa a se "desprender" do substrato. Ou seja, o potencial está relacionado ao fato da membrana estar aderida ao substrato. O outro aspecto importante é que já existe na literatura uma formulação de potencial de confinamento do tipo gaussiano para descrever as flutuações em altura de uma membrana próxima a uma superfície rígida e plana [76]. No trabalho de Oded Farago, o autor utiliza cálculos analíticos e simulações de Monte Carlo para determinar as flutuações térmicas de uma membrana localizada a uma distância fixa d acima de uma superfície plana e rígida. Segundo Farago, a influência da superfície nas flutuações de uma bicamada lipídica pode ser descrita em termos de um potencial de confinamento efetivo uniforme do tipo:

$$\gamma_{eff} \propto d \exp d'^2 \quad (5.35)$$

onde d é a distância entre a membrana e a superfície, e d' é um termo que depende de d e de outros fatores que não são importantes para a discussão atual. Apesar do nosso problema se tratar de uma membrana composta (bicamada + citoesqueleto), aderida à superfície rígida em um círculo de raio de $\sim 2 \mu\text{m}$, e da nossa distância d variar ao longo da extensão da membrana, o fato do potencial encontrado por Farago ser descrito por uma gaussiana já é um indicativo que nossa hipótese está correta.

Finalmente, no gráfico 5.24 apresentamos os dados obtidos para o comportamento radial das tensões superficiais σ_1 e σ_2 . Observando os gráficos, vemos que σ_1 possui um comportamento praticamente constante, exibindo um valor médio de $(14 \pm 1) \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$. Já σ_2 começa de um valor de $25 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$ e apresenta um perfil crescente em direção ao raio final. Como esperado, os valores de σ_2 são maiores do que σ_1 em todos os pontos do perfil. Duas observações importantes devem ser feitas em relação aos va-

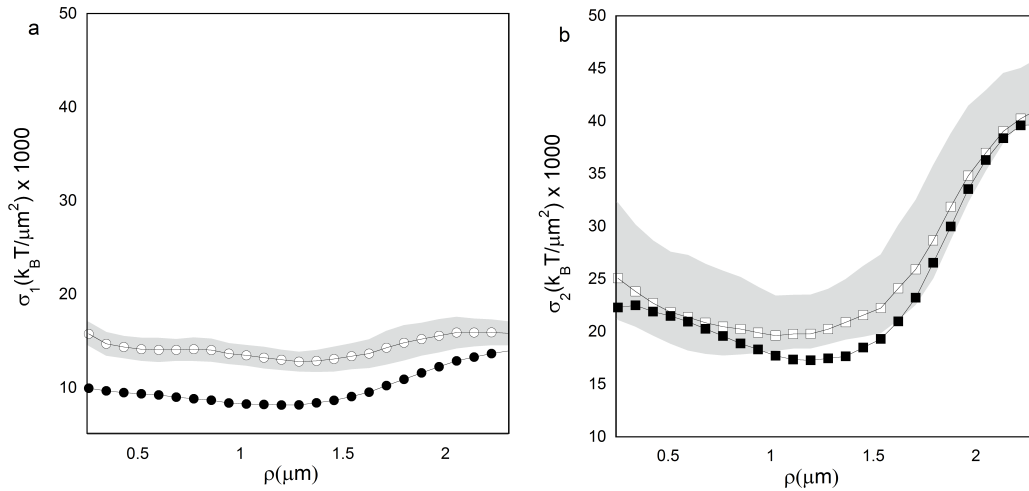


Figura 5.24: Perfis radiais para as tensões superficiais σ_1 (a) para a membrana de cima e σ_2 (b) para a membrana de baixo. Os símbolos cheios representam a tensão sem correção e os símbolos vazios a tensão corrigida.

lores para a tensão superficial. Primeiro, o valor de σ_2 no centro da hemácia é o dobro de σ_1 , o que explica o fato da flutuação em altura $\langle u_2 \rangle$ no centro da hemácia ser menor do que o valor para $\langle u_1 \rangle$. Segundo, é que todos os valores obtidos para σ são uma ordem de grandeza maior do que

aqueles reportados na literatura [14]. A nossa hipótese para esta tensão alta é que ela é devido à adesividade ao substrato, que puxa as membranas no sentido da lamínula, e introduz uma tensão mecânica. Segundo Farago [63], o significado físico de σ é interpretado de forma errada na literatura. Ao ser inserido no espectro de potência de Gov (eq. 4.22), o termo σ é uma tensão superficial, e é definido como a derivada da energia elástica necessária para aumentar/dimnuir a área da membrana por uma unidade de área, em relação à área total da membrana. No entanto, como comentamos anteriormente, este conceito de tensão superficial é originalmente definido para uma interface entre meios diferentes, e quando introduzido na teoria de membranas a sua definição é distorcida. Segundo Farago [63], a tensão superficial σ é na verdade uma tensão mecânica e é definida como a força lateral por unidade de comprimento, exercida nos limites de uma membrana quando esta é presa por uma armação. As figuras 5.25(a e b) ilustram esta idéia para o caso de uma hemácia. Na letra (a) mostramos que a área da membrana aderida ao substrato é delimitada por uma circunferência de raio $r = 2,00 \mu\text{m}$, e a armação referida por Farago é justamente esta circunferência de raio r (figura (b)). Se este é o caso, a ordem de grandeza desta tensão mecânica pode ser

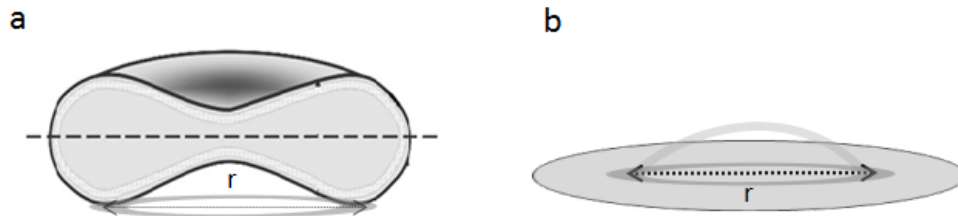


Figura 5.25: (a) Ilustração da área da circunferência de raio r definida pela região da hemácia aderida ao substrato. (b) Ilustração de uma membrana presa por uma armação, delimitando uma região de aderência de raio r .

estimada e será da ordem da força (F_a) pelo qual a membrana está sendo puxada, dividida pelo comprimento da circunferência que define a região da hemácia aderida ao substrato:

$$\sigma \sim \frac{F_a}{2\pi r}, \quad (5.36)$$

onde r é o raio da circunferência. Vamos fazer o cálculo desta força para

valores de σ_1 e de σ_2 . Para a membrana de cima vimos que σ permanece praticamente constante em $14 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$ ao longo de todo o raio analisado. Transformando para a unidade de N/m este valor corresponde a $\sigma = 56 \mu\text{N}/m$, que multiplicado por $(2\pi \times 2 \mu\text{m})$ retorna uma força de adesão de $\sim 700 pN$. Para σ_2 estimamos uma força duas vezes maior do que esta última, ou seja $F_a \sim 1400 pN$. Para checar a veracidade desta análise, procuramos na literatura referências sobre medidas da força de adesividade de hemácias em vidro. De acordo com medidas realizadas com micropipetas [77], os valores da força de adesão de hemácias ao vidro comum (hidrofílico) é de 500 a 1600 pN e de 1000 a 3000 pN para o caso de vidro hidrofóbico. Ou seja, nossos valores para F_a são valores coerentes com os valores relatados. Isto posto, a definição física do σ medido por nossa técnica é uma tensão mecânica.

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas Futuras

A tese “Desenvolvimento de métodos em microscopia óptica para obtenção de parâmetros biomecânicos de células e moléculas únicas” baseou-se no desenvolvimento de metodologias experimentais relacionadas ao estudo da interação de moléculas únicas de DNA com fármacos (Método 1), e relacionadas ao estudo das propriedades mecânicas de hemácias (Método 2).

O Método 1 foi inspirado em medidas de estiramento de moléculas únicas de DNA, via pinçamento óptico. Apresentamos um modelo de desordem estatística para a interação DNA/CD, que combinado com uma equação do tipo Hill é capaz de reproduzir o comportamento não monotônico dos dados experimentais para o comprimento de persistência. O método se traduz em uma equação que ajusta os dados para DNA-CD e DNA-HU muito bem, confirmando a hipótese formulada de que o processo de interação DNA/ligantes é mediado por aglomerados de moléculas (grupos-ligados) de tamanho fixo. A partir dos ajustes, obtemos os valores para comprimentos de persistência local, a constante de dissociação e o grau de cooperatividade para os dados experimentais de DNA/CD e DNA/HU, possibilitando a discussão de aspectos físicos da interação entre elasticidade-DNA e cooperatividade entre a ligação dos ligantes.

O desenvolvimento do Método 1 abre novas perspectivas para o estudo da interação do DNA com outros ligantes. Utilizando a metodologia desenvolvida é possível comparar parâmetros da interação DNA/ligante para diferentes ligantes, somente via medidas de elasticidade. Como exemplo desta

aplicação, somente neste ano Márcio Rocha *et al.*, também autor do artigo referente ao método, publicou um trabalho sobre interação DNA/Actinomicina D [80], uma droga anti-câncer, e outro sobre a interação DNA/Hoechst 33258 [81], um corante fluorescente para DNA. Em ambos os casos foi observado um comportamento não-monotônico para o comprimento de persistência do complexo DNA/ligante, e o modelo apresentado nesta tese foi aplicado com sucesso. Além deste exemplo de aplicação, o método também possibilita monitorar a influência de diversos parâmetros da solução (força iônica, pH, entre outros) na interação do DNA com um dado ligante. Por exemplo, como mencionado no capítulo 2, a blindagem dos grupos fosfatos do DNA depende da concentração de sódio da solução no qual o DNA está imerso. No caso da ciclodextrina utilizada nesta tese, acreditamos que a CD catiônica possui maior probabilidade de formar complexos de inclusão com o DNA do que a CD neutra, devido à sua carga positiva. A nossa hipótese é que graças a esta carga, a CD catiônica permanece mais tempo próxima ao DNA, aumentando as suas chances de capturar as bases purinas do DNA que naturalmente fli-pam para fora da estrutura da molécula. Uma maneira de testar esta nossa hipótese é refazendo as medidas de comprimento de persistência do DNA, porém imerso em um meio que promova uma blindagem maior (ou menor) dos grupos fosfatos. Se nossa hipótese for válida, deveremos observar uma diminuição na constante de ligação DNA/CD. Atualmente, a aluna de doutorado do Laboratório de Física Biológica Patrícia Santos está desenvolvendo este projeto.

Já as metodologias apresentadas no Método 2 abrem portas para inúmeras aplicações na área de pesquisa em saúde. Como foi mostrado, utilizando o contraste MD somos capazes de definir forma, volume, reconstrução tridimensional, índice de refração e perfil de altura de cada membrana das hemácias. Com a medida de flutuação do contraste MD mostramos que é possível acessar também as flutuações em altura de cada membrana, além da obtenção do comportamento radial das constantes elásticas de membranas ao longo de cada superfície da hemácia. A partir destes resultados propomos novas interpretações para as constantes elásticas, possibilitando a discussão de aspectos físicos das membranas. Com estas novas possibilidades podemos caracterizar e monitorar possíveis mudanças de forma e das propriedades me-

cânicas de hemácias doentes, ou submetidas a tratamentos, ou mesmo quando interagindo com agentes patológicos.

Um exemplo concreto de aplicação do Método 2 é o projeto de pós-doc submetido pela doutoranda. Como mencionado na introdução, neste trabalho é investigada a presença e a função de canais mecano-sensíveis (CMS) em células sanguíneas. Publicações recentes [82] reportaram a descoberta dos canais MS PIEZO 1 e 2 em células humanas, que são uma classe de proteínas que possuem a propriedade de sentir e responder a estímulos mecânicos, e adotar estados conformacionais com propriedades distintas em resposta às tensões aplicadas. Logo após esta descoberta, foi observado que pacientes com mutações nas proteínas PIEZO 1 e 2 são associados com a doença Xerocitose, uma doença caracterizada pela desidratação das hemácias, ou seja, pela inabilidade das células sanguíneas em regular seu volume [83]. Esta associação levantou várias perguntas acerca da participação dos canais mecano-sensíveis no processo de regulação do volume (homeostase) das células sanguíneas, entre elas: os canais MS participam da homeostase? Sob quais condições? Sabendo-se que o cálcio é regulador de diversos processos envolvidos na homeostase, é possível que os CMS sejam então reguladores de fluxo de cálcio, particularmente ativados via tensão mecânica? Já foi observado que a permeabilidade a cálcio nas membranas das hemácias aumenta quando elas são submetidas a estresse mecânico [84]. Sabendo-se que estas células naturalmente sofrem deformações ao circularem pelos estreitos vasos sanguíneos, uma possível hipótese para explicar a associação entre as mutações na PIEZO1 e a Xerocitose hereditária seria que as hemácias mutantes gradualmente se desidratam durante a circulação das células pelos vasos sanguíneos do corpo humano?

A identificação dos canais ativados via deformação da membrana celular parece fundamental para o entendimento dos processos reguladores de volume das hemácias e possivelmente de várias outras células eucariotas. Usualmente, o estudo de CMS é realizado utilizando-se a técnica de Patch Clamp, que permite quantificar a condutância dos canais quando submetidos a tensões pré-determinadas [85]. No entanto, os experimentos são usualmente realizados em células mais complexas do que a hemácia, uma célula simples, anucleada e de fácil manipulação. Além disto, conforme ressaltado em recen-

tes revisões da área é fundamental que sejam desenvolvidos novos métodos experimentais capazes de prover mais informações sobre o funcionamento destes canais, assim como sobre os diversos processos biológicos nos quais estão envolvidos [85].

Para estudar a possível relação entre os CMS e o processo de regulação de volume nas hemácias, pretendemos ativar mecanicamente os canais de células sadias controle e células sadias submetidas a tratamento com bloqueadores de CMS e monitorar, em tempo real, as mudanças de forma e volume de células únicas. Além disto, pretende-se acompanhar esta mesma configuração de células durante o processo de RVD (do inglês, *regulatory volume decrease*), que ocorre quando células submetidas a choque hipo-osmótico incham, e em seguida, retomam seu volume natural, por meio de ativação dos processos reguladores de volume. Para excitar mecanicamente as hemácias será usado pinçamento óptico, uma poderosa técnica capaz de exercer forças mecânicas da ordem de picoNewtons na membrana celular de células únicas, sem danificar sua estrutura. Para observar a atividade dos canais MS pretendemos quantificar imagens de fluorescência de células recém-tratadas com marcadores de cálcio, capturadas com câmeras de taxas rápidas, durante a excitação mecânica das células. Por fim, para monitorar as mudanças na forma e volume das hemácias, bem como determinar suas propriedades mecânicas, serão utilizados os métodos da técnica de Microscopia de Desfocalização (MD) desenvolvidos nesta tese. Sendo assim, os conhecimentos adquiridos durante o doutorado serão aplicados em um problema biológico atual e relevante cientificamente.

Apêndice A

O DNA como uma corda "biológica"

Polímeros e filamentos celulares podem ser tratados como cordas "biológicas" para a dedução de parâmetros físicos. Para a dedução do comprimento de persistência do DNA trataremos a molécula como uma corda "biológica" composta por monômeros que se ligam formando cadeias não ramificadas. As cordas podem sofrer uma variedade de deformações dependendo das forças aplicadas e de suas propriedades mecânicas. No entanto, independentemente do tipo de deformação é necessário energia para distorcer o filamento da sua forma natural. Esta energia é denominada energia de curvatura, e para calculá-la começamos descrevendo a corda "biológica" como o arco de uma curva contínua, ignorando o material e a forma de sua área transversal.

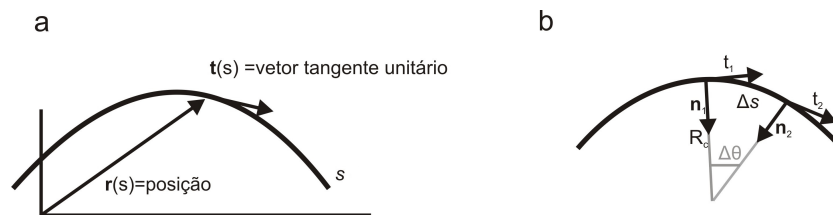


Figura A.1: a) Arco de curva representando uma corda "biológica". b) Entre as posições \hat{t}_1 e \hat{t}_2 o arco é aproximado por um segmento de círculo de raio R_c , definindo um ângulo $\Delta\theta = \Delta s / R_c$, onde Δs é o tamanho do segmento.

Como mostrado na figura A.1(a), cada ponto da curva é localizado pelo vetor posição $\vec{r}(s)$, onde s é um parâmetro que segue o contorno do arco e vai de zero até o comprimento total L_c (comprimento de contorno). O vetor tangente unitário \hat{t} caracteriza a direção da curva e é dado por:

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}. \quad (\text{A.1})$$

Pela figura A.1(b), notamos que o vetor $\Delta \hat{t} = \hat{t}_2 - \hat{t}_1$ é perpendicular ao vetor \vec{r} no limite em que as posições 1 e 2 são incondicionalmente próximas. Sendo assim, a taxa de variação de \hat{t} com s é proporcional ao vetor unitário normal à curva (\hat{n}), a menos de uma constante de proporcionalidade definida como a curvatura C do segmento:

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|. \quad (\text{A.2})$$

O recíproco da curvatura C é o raio local de curvatura do arco, que está representado na figura A.1(b) extrapolando os vetores unitários normais \hat{n}_1 e \hat{n}_2 até o ponto de intersecção. Se as posições 1 e 2 se aproximam (seguindo o contorno da curva), o arco pode ser aproximado por um segmento de círculo de raio R_c , definindo um ângulo $\Delta\theta = \Delta s / R_c$, onde Δs é o tamanho do segmento. No entanto, $\Delta\theta$ também é o ângulo entre $\hat{t}(1)$ e $\hat{t}(2)$, de forma que igualando as duas expressões para $\Delta\theta$ e utilizando a equação A.2, chegamos a conclusão que:

$$C = 1/R_c. \quad (\text{A.3})$$

Reescrevendo o vetor unitário \hat{n} para $\Delta\theta = \Delta(|\hat{t}|)$, temos que:

$$\hat{n} = \frac{\partial \hat{t}}{\partial \theta}. \quad (\text{A.4})$$

Suponhamos agora que a corda "biológica" está em uma configuração esticada. Se a corda é curvada em um arco de raio R_c , como na figura A.2, qual será o valor da energia elástica associada a esta deformação? Este cálculo pode ser encontrado na referência [35] e é dado por

$$E_{\text{curvatura}} = \frac{\kappa_f L_c}{2R_c^2}, \quad (\text{A.5})$$



Figura A.2: A corda de comprimento L_c e momento de inércia da seção transversal I encontra-se inicialmente esticada. A corda sofre uma deformação e adquire a forma de um círculo de raio R_c . A energia de curvatura é dada por $E_f = \kappa_f L_c / 2R_c^2$.

onde κ_f é a rigidez flexural da corda. Podemos reescrever esta equação utilizando a definição para o raio de curvatura (eq. A.2), porém considerando que a curvatura não é necessariamente constante ao longo de todo o arco:

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds, \quad (\text{A.6})$$

Esta é a expressão geral para a energia total de deformação para uma corda "biológica", denominada energia de Kathy-Porod. Considerando esta energia, se a corda é colocada em um sistema com temperatura próxima a zero, a corda adotará uma configuração que minimiza a sua energia de curvatura, o que corresponde a uma configuração esticada. A partir do momento em que a temperatura do sistema começa a aumentar, o filamento/corda passa a trocar energia com o ambiente e adquire novas configurações, assim como ilustrado na figura A.3(a). Como é sabido, a probabilidade $\wp(E)$ que a corda seja encontrado em uma configuração específica com energia E é proporcional ao fator de Boltzmann $\exp(-\beta E)$, onde $\beta = 1/k_B T$ e T é a temperatura em Kelvin e k_B é a constante de Boltzmann.

Vamos assumir que a corda "biológica" possa sofrer somente deformações leves e que ela tenha curvatura constante. A forma da corda pode então ser parametrizada unicamente pelo ângulo θ formado entre os dois vetores unitários das extremidades do filamento, conforme ilustrado na figura A.3(b). Para um arco de círculo de tamanho s e raio R_c temos que $\theta = s/R_c$, e portanto, a energia de curvatura é dada por:

$$E_{arco} = \frac{\kappa_f s}{2R_c^2} = \frac{\kappa_f \theta^2}{2s}. \quad (\text{A.7})$$



Figura A.3: a) Conjunto de configurações para um filamento flexível. Para um dado k_f a energia de curvatura do filamento aumenta a medida que sua forma se torna mais contorcida. b) Se o filamento é aproximado pela seção de um círculo, o ângulo subtendido pelo arco de tamanho s é o mesmo que o ângulo de mudança de direção do vetor tangente t ao longo do arco.

O ângulo θ oscila conforme a corda adquire novas configurações e para caracterizar a magnitude desta oscilação podemos calcular o valor médio de θ^2 , dado por $\langle \theta^2 \rangle$:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 \varphi(E_{arc}) d\Omega}{\int \varphi(E_{arc}) d\Omega} = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E_{arc}) d\Omega}{\int \exp(-\beta E_{arc}) d\Omega}, \quad (\text{A.8})$$

onde $d\Omega = \sin \theta d\theta d\phi$ é o elemento de ângulo sólido da integração. O cálculo desta integral é simples e pode ser visto em [3]. O resultados nos dá que:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta \kappa_f}. \quad (\text{A.9})$$

O termo $\beta \kappa_f$ possui unidade de comprimento e é denominado comprimento de persistência A da corda, e portanto:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{A} \quad (\text{A.10})$$

Notamos que o parâmetro A é diretamente proporcional à rigidez flexural κ_f e inversamente proporcional à temperatura T .

Uma outra interpretação do comprimento de persistência A de um filamento é feita analisando o produto escalar $\hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s)$. Como já dito, em temperaturas diferentes de zero a corda assume uma variedade de conformações, e a média de produto escalar dos vetores unitários é dada por:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos \theta \rangle, \quad (\text{A.11})$$

para qual o valor máximo é 1. A quantidade $\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle$ é a função correlação do vetor tangente e é ela que descreve a correlação entre a direção dos vetores tangentes em diferentes posições ao longo da curva. A baixas temperaturas, onde θ é pequeno (pois as flutuações são pequenas), podemos fazer a aproximação $\cos \theta \sim 1 - \theta^2/2$. Desta forma, podemos escrever a função correlação como dos vetores tangentes como:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} \cong 1 - \frac{s}{A}. \quad (\text{A.12})$$

Analisando a relação entre A e o tamanho do filamento s , o comprimento de persistência pode ser interpretado como uma medida da distancia ao longo da qual a informação sobre a orientação da curva da corda é mantida. Ou seja, para valores maiores que A a orientação da curva torna-se desproporcionada. É importante lembrar que a equação A.12 é válida para o limite de pequenas oscilações. Para obter uma equação geral, notamos que a equação A.12 é a expansão em primeira ordem da função exponencial, e considerando os outros termos da expansão temos a forma geral para a função correlação dos vetores tangentes como:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{A}\right). \quad (\text{A.13})$$

Esta é a função de autocorrelação especial para os vetores tangentes $\hat{t}(s)$.

Apêndice B

Cálculo do comprimento de persistência para um modelo de desordem do tipo *quenched*

Para a dedução do nosso modelo tratamos novamente a molécula de DNA como uma corda "biológica" de comprimento total L , descrita pelo modelo WLC [60]. Como deduzido no Apêndice 1, a energia de curvatura para uma corda deste tipo é dada por (eq.A.6):

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right|^2 ds. \quad (\text{B.1})$$

onde \vec{t} é o vetor unitário tangente à curva, s é o comprimento do arco considerado e κ_f é a rigidez flexural da corda. Para esta dedução vamos supor que a corda é colocada para interagir com ligantes que podem se conectar à corda, modificando localmente sua rigidez flexural. Sendo assim, vamos considerar que a corda "biológica" é composta por N segmentos/filamentos, cada um com sua própria rigidez flexural K_i e comprimento $s_{0,i}$, de forma que a energia de curvatura total da corda será reescrita como:

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \int_0^{s_{0,i}} K_i \left(\frac{\partial \vec{t}_i}{\partial s_i} \right)^2 ds_i. \quad (\text{B.2})$$

Vamos assumir que K_i é descrita por uma distribuição de probabilidade $P(\{\frac{K_i}{s_i}\})$ e considerar que cada segmento pode sofrer somente deformações

leves, mantendo sua curvatura constante. Isto posto, podemos seguir os mesmos passos mostrados no Apêndice 1 e chegar à equação A.7 para o caso atual:

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{K_i \theta_i^2}{s_{0,i}^2} \int_0^{s_{0,i}} ds_i = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{K_i \theta_i^2}{s_{0,i}}. \quad (\text{B.3})$$

Nesta equação θ é o ângulo formado entre os dois vetores unitários das extremidades de cada segmento e portanto, θ_i é uma medida da curvatura do segmento i . Por conseqüência, a curvatura total da corda será dada por $\theta = \sum_{i=1}^N \theta_i$.

Média térmica

As flutuações de forma de cada segmento i podem ser caracterizadas por θ_i^2 e calculadas por $\langle \theta_i^2 \rangle - \langle \theta_i \rangle^2$. Sabendo que:

$$\theta^2 = \sum_{i,j} \theta_i \theta_j = \sum_i \theta_i^2 + \sum_{j \neq i} \theta_i \theta_j, \quad (\text{B.4})$$

obtemos que a flutuação total da corda será:

$$\langle (\delta\theta)^2 \rangle = \langle \theta^2 \rangle - \langle \theta \rangle^2 = \sum_{i=1}^N (\langle \theta_i^2 \rangle - \langle \theta_i \rangle^2) + \sum_{i \neq j} (\langle \theta_i \theta_j \rangle - \langle \theta_i \rangle \langle \theta_j \rangle). \quad (\text{B.5})$$

onde a média térmica $\langle \theta_i \theta_j \rangle$ é definida por:

$$\langle \theta_i \theta_j \rangle = \frac{1}{Q} \left[\prod_{m=1}^N \int_m d\Omega_m \right] \theta_i \theta_j \exp(-\beta E_{KP}) \quad . \quad (\text{B.6})$$

A integral acima deve ser realizada sobre todos os ângulos sólidos $d\Omega_m = \sin \theta_m d\theta_m d\phi_m$ e E_{KP} é dada pela eq.B.3. Além disso, Q é a função partição:

$$Q = \left[\prod_{m=1}^N \int_m d\Omega_m \right] \exp(-\beta E_{KP}), \quad (\text{B.7})$$

e portanto, na equação B.6 os termos que não envolvem i e j no numerador são cancelados pelo termo correspondente no denominador. Como $i \neq j$, o

termo em θ_i pode ser separado do termo em θ_j , de forma que $\langle \theta_i \theta_j \rangle = \langle \theta_i \rangle \langle \theta_j \rangle$. Isto posto, obtemos que a flutuação total de forma da corda é:

$$\langle (\delta\theta)^2 \rangle = \sum_{i=1}^N (\langle \theta_i^2 \rangle - \langle \theta_i \rangle^2) \quad (\text{B.8})$$

e nos resta agora somente calcular os termos $\langle \theta_i \rangle$ e $\langle \theta_i^2 \rangle$.

Observando a Eq. (B.6) vemos que ela define $\langle \theta_i \rangle$ se consideramos $\theta_j = 1$. Supondo que os segmentos são suficientemente rígidos de forma que $K_m \theta_m^2$ aumenta rapidamente com θ_m , temos então que $\exp(-\beta K_m \theta_m^2 / 2s_{0,m})$ também decai rapidamente com θ_m , o que implica que a aproximação $\sin \theta_m \approx \theta_m$ pode ser usada para $d\Omega_m$. Além disso, estendendo o limite superior da integral em θ_m para o infinito e utilizando que $A_i = \beta K_i$ (eq.A.10), a Eq. (B.6) pode ser então reescrita como:

$$\langle \theta_i \rangle = \frac{\int_0^\infty \theta_i^2 \exp\left(-\frac{A_i \theta_i^2}{2s_{0,i}}\right) d\theta_i}{\int_0^\infty \theta_i \exp\left(-\frac{A_i \theta_i^2}{2s_{0,i}}\right) d\theta_i} = \left(\frac{\pi s_{0,i}}{8A_i}\right)^{1/2}. \quad (\text{B.9})$$

Similarmente, obtemos para $\langle \theta_i^2 \rangle$:

$$\langle \theta_i^2 \rangle = \frac{\int_0^\infty \theta_i^3 \exp\left(-\frac{A_i \theta_i^2}{2s_{0,i}}\right) d\theta_i}{\int_0^\infty \theta_i^2 \exp\left(-\frac{A_i \theta_i^2}{2s_{0,i}}\right) d\theta_i} = \frac{2s_{0,i}}{A_i}, \quad (\text{B.10})$$

e subtraindo as duas equações encontramos que:

$$\langle (\delta\theta)^2 \rangle = \left(2 - \frac{\pi}{8}\right) \sum_{i=1}^N \frac{s_{0,i}}{A_i}. \quad (\text{B.11})$$

Ou seja, a flutuação de forma da corda é inversamente proporcional ao comprimento de persistência de cada segmento da corda.

Média de desordem do tipo *quenched*

Consideramos um modelo de desordem do tipo *quenched* assumindo que um ligante se liga a corda e permanece fixo em um sítio. Definimos então a distribuição de probabilidade $P(\{\frac{K_i}{s_i}\})$ da forma mais simples possível, supondo que cada segmento possui somente dois sítios e que um ligante pode aleatoriamente se conectar a ambos sítios. Sendo assim, cada sítio do segmento é

ocupado com probabilidade $x = \frac{r}{r_{max}}$, onde r é a fração de ligantes ligados e um segmento sem sítios ocupados é caracterizado por um comprimento de persistência $A_0 = \beta K_0$ e possui probabilidade $(1 - x)^2$ de ocorrer. Além disso, um segmento i é muito flexível quando ocupado somente por um único ligante, o que ocorre com probabilidade $2x(1 - x)^2$ e é caracterizado por um comprimento de persistência $A_1 = \beta K_1$. Finalmente, quando os dois sítios de um segmento são ocupados, o que ocorre com probabilidade x^2 , o segmento se torna rígido e adquire o comprimento de persistência $A_2 = \beta K_2$. Utilizando este *approach* encontramos que a distribuição de probabilidade para a variável aleatória $\frac{K_i}{s_0}$ ($i = 1, 2, \dots, N$) é dada por:

$$P\left(\frac{K_i}{s_0}\right) = (1 - x)^2 \delta_{\frac{K_i}{s_0}, \frac{K_0}{s_0}} + 2x(1 - x)^2 \delta_{\frac{K_i}{s_0}, \frac{K_1}{s_0}} + x^2 \delta_{\frac{K_i}{s_0}, \frac{K_2}{s_0}}, \quad (\text{B.12})$$

onde $s_0 = L/N$ é o comprimento de cada segmento da corda. Supondo que cada unidade i possui a mesma distribuição e o mesmo tamanho s_0 , podemos reescrever a equação acima como:

$$P(A_j) = (1 - x)^2 \delta_{A_j, A_0} + 2x(1 - x) \delta_{A_j, A_1} + x^2 \delta_{A_j, A_2}. \quad (\text{B.13})$$

Finalmente, a média de desordem é definida por:

$$\overline{\langle (\delta\theta)^2 \rangle} = \left(2 - \frac{\pi}{8}\right) N s_0 \left[\frac{(1 - x)^2}{A_0} + \frac{2x(1 - x)}{A_1} + \frac{x^2}{A_2} \right]. \quad (\text{B.14})$$

Definindo um comprimento de persistência efetivo $\overline{\langle (\delta\theta)^2 \rangle} = \frac{(2 - \frac{\pi}{8}) N s_0}{A}$, obtemos então a equação 3.8 do nosso método:

$$\frac{1}{A(x)} = \frac{(1 - x)^2}{A_0} + \frac{2x(1 - x)}{A_1} + \frac{x^2}{A_2}. \quad (\text{B.15})$$

Na equação, quando $x = 0$ e $x = 1$ temos que $A = A_0$ e $A = A_2$, respectivamente. Além disso, com o aumento de x , A inicialmente diminui, atinge um mínimo e finalmente aumenta até atingir $A = A_2$ para $x = 1$.

Apêndice C

Condições de convergência para o método iterativo

Para ajustar os dados de comprimento de persistência propomos o uso de modelo de desordem de tipo *quenched*, combinado com uso iterativo de uma equação do tipo Hill. O método de iteração é consistente, pois ele converge para uma única solução de ponto fixo, conforme prova a seguir.

Solução única de ponto fixo

Como mencionado no capítulo 3, a equação de Hill é dada por:

$$\left(\frac{r}{r_{max}}\right) = \frac{\left(\frac{C_f}{K_H}\right)^n}{1 + \left(\frac{C_f}{K_H}\right)^n} = \frac{\left(\frac{C_T}{K_H} - \frac{r}{r_{max}} \frac{r_{max} C_{bp}}{K_H}\right)^n}{1 + \left(\frac{C_T}{K_H} - \frac{r}{r_{max}} \frac{r_{max} C_{bp}}{K_H}\right)^n}. \quad (C.1)$$

Definindo as variáveis:

$$x \equiv \frac{r}{r_{max}}, a \equiv \frac{C_T}{K_H}, b \equiv \frac{r_{max} C_{bp}}{K_H}, \quad (C.2)$$

a equação de Hill pode ser reescrita como:

$$x = \frac{(a - bx)^n}{1 + (a - bx)^n} \equiv f(x), \quad (C.3)$$

com a variável x restrita a $0 \leq x \leq 1$ e $(a - bx) \geq 0$. Neste caso, a equação $f(x)$ assume valores dentro do intervalo $[0, 1]$, e possui como derivada primeira:

$$\frac{df(x)}{dx} \equiv f'(x) = \frac{-nb(a - bx)^{n-1}}{[1 + (a - bx)^n]^2} \leq 0. \quad (C.4)$$

Sendo assim, a função $y = f(x)$ é monotonicamente decrescente em $[0, 1]$, e portanto possui um único ponto de intersecção com a função $y = x \bar{x}$, com $0 < \bar{x} < 1$. Concluindo, a equação C.3 possui exatamente uma única solução em $0 \leq x \leq 1$.

Método Iterativo

O valor para \bar{x} é encontrado de forma iterativa. Seja x_0 qualquer número do intervalo $[0, 1]$, definindo recursivamente a seqüência $\{x_0, x_1, x_2, \dots\}$ por $x_{p+1} = f(x_p)$, com $p \geq 0$. Claramente, cada $x_p \in [0, 1]$. Se a seqüência converge de forma que $\lim_{p \rightarrow \infty} x_p \equiv x^*$, então $x^* = \bar{x}$, pois por continuidade x^* é solução da equação $x^* = f(x^*)$, e como mostrado na seção anterior, esta equação possui solução única.

Uma única condição para a existência de $\lim_{p \rightarrow \infty} x_p$ é que $|f'(x)| < 1$ para $x \in [0, 1]$. Se este é o caso, supomos que $C = \max_{(0 \leq x \leq 1)} |f'(x)| < 1$. Isto posto, temos:

$$|x_{p+1} - x_p| = |f(x_p) - f(x_{p-1})| = \left| \int_{x_{p-1}}^{x_p} f'(x) dx \right| \leq C|x_p - x_{p-1}|. \quad (\text{C.5})$$

Iterando esta desigualdade obtemos:

$$|x_{p+1} - x_p| \leq C|x_p - x_{p-1}| \leq C^2|x_{p-1} - x_{p-2}| \leq \dots \leq C^p|x_1 - x_0| \leq C^p. \quad (\text{C.6})$$

Se $n > m$:

$$\begin{aligned} |(x_n - x_m)| &= |(x_n - x_{n-1}) + (x_{n-1} - x_{n-2}) + \dots + (x_{m+1} - x_m)| \\ &\leq |(x_n - x_{n-1})| + |(x_{n-1} - x_{n-2})| + \dots + |(x_{m+1} - x_m)| \\ &\leq C^{n-1} + C^{n-2} + \dots + C^m = C^m(1 + C + \dots + C^{n-m-1}) \\ &= C^m \left(\frac{1 - C^{n-m}}{1 - C} \right) = \frac{C^m - C^n}{1 - C}, \end{aligned} \quad (\text{C.7})$$

e como $0 < C < 1$, temos que $\lim_{m, n \rightarrow \infty} |x_n - x_m| = 0$. Pelo critério de Cauchy, a seqüência converge. Sendo assim, dada qualquer condição inicial, para que a seqüência convirja para uma única solução é suficiente que $|f'(x)| < 1$ para $x \in [0, 1]$.

Região de convergência dos parâmetros

Para ajustar os dados do inverso do comprimento de persistência em função da concentração de ligantes total em solução C_T , temos que garantir que o método iterativo converge para a solução correta, para todas as concentrações utilizadas. Para isso precisamos derivar um critério de convergência válido para todas as concentrações.

Cooperatividade positiva, $n > 1$

Para determinar os parâmetro que asseguram que $|f'(x)| < 1$ para $x \in [0, 1]$, podemos considerar a função:

$$g(y) = \frac{y^{n-1}}{[1 + y^n]^2} \quad (\text{C.8})$$

notando que $|f'(x)| = nb g(a - bx)$. Calculando a derivada primeira:

$$g'(y) = \frac{y^{n-2}[(n-1) - (n+1)y^n]}{(1 + y^n)^3}. \quad (\text{C.9})$$

Sendo assim, $g'(y) = 0$ se $y^n = \frac{(n-1)}{(n+1)}$ e

$$g \left[\left(\frac{n-1}{n+1} \right)^{\frac{1}{n}} \right] = \frac{\frac{n-1}{n+1}}{\left(\frac{n-1}{n+1} \right)^{\frac{1}{n}} \left(1 + \frac{n-1}{n+1} \right)^2} = \frac{(n-1)(n+1)}{4n^2 \left(\frac{n-1}{n+1} \right)^{\frac{1}{n}}} \quad (\text{C.10})$$

é a maior derivada. Conseqüentemente,

$$\max |f'(x)| = \frac{nb(n^2 - 1)}{4n^2 \left(\frac{n-1}{n+1} \right)^{\frac{1}{n}}} < 1 \quad (\text{C.11})$$

de forma que:

$$b < \frac{4n \left(\frac{n-1}{n+1} \right)^{\frac{1}{n}}}{n^2 - 1}, \quad (\text{C.12})$$

para convergência do método iterativo para qualquer concentração de ligantes a . Particularmente, para $n = 3.5$, temos $b < 1.05$. Os conjuntos de dados para DNA-CD e DNA-HU satisfazem o requerimento $b < 1.05$ e portanto, o método iterativo converge para uma única solução.

Não cooperatividade, $n = 1$

Para o caso de $n = 1$, temos que:

$$f(x) = \frac{a - bx}{1 + (a - bx)}, \quad (\text{C.13})$$

com $a - bx \geq 0$, e

$$f'(x) = \frac{-b}{[1 + (a - bx)]^2}. \quad (\text{C.14})$$

Neste caso, $\max |f'(x)| = b$, de forma que $b < 1$ para convergência para todos a .

Cooperatividade negativa, $n < 1$

Para o caso de $n < 1$, temos que:

$$|f'(x)| = \frac{nb}{y^{1-n}(1 + y^n)^2} < 1, \quad (\text{C.15})$$

para convergência. No entanto, notamos que a derivada diverge para $y \rightarrow 0$, de forma que não haverá valores para b com soluções estável para todos os valores de a . Sendo assim, para cada valor de b haverá um valor mínimo para a (a_{min}), acima do qual qualquer $a > a_{min}$ resultará em soluções estáveis.

Para pequenos valores de y , podemos considerar a seguinte aproximação:

$$|f'(x)| \sim \frac{nb}{y^{1-n}}, \quad (\text{C.16})$$

para qual $nb < (a - b\bar{x})^{1-n}$ assegura que $|f'(x)| < 1$.

Apêndice D

Microscopia de Desfocalização

Modelo de um microscópio invertido

Na figura D.1 está ilustrado o nosso modelo para um microscópio óptico invertido com óptica corrigida no infinito, operando com iluminação do tipo campo claro. Nela estão representados os elementos ópticos envolvidos na MD: fonte de luz (lâmpada halógena), lente coletora, filtro do tipo passa-banda, diafragma de campo, lente condensadora, amostra com controle do deslocamento em z , objetiva com óptica corrigida no infinito, lente de tubo e plano imagem. Na realidade, como será visto mais adiante, os elementos importantes para a dedução do contraste da MD serão aqueles a partir da amostra. Seguindo na figura, raios de luz emitidos pela lâmpada são reunidos pelas lentes coletoras, passam pelo diafragma de campo e depois de cruzar a lente condensadora formam um cone de iluminação de forma que a amostra é iluminada uniformemente. Ao passar pela amostra os raios são espalhados, e tanto os raios difratados quanto os raios transmitidos atravessam uma fina camada de óleo (figura ampliada), para então serem coletados pela objetiva. A objetiva e a lente de tubo criam uma imagem ampliada da amostra, que é conjugada no plano imagem. Uma câmera acoplada a este plano é usada para visualizar e coletar a imagem ampliada. Assumindo o sistema de referência como ilustrado na figura, onde o eixo óptico é o eixo z , podemos definir a origem em qualquer ponto ao longo do eixo. Por ora iremos colocar a origem do sistema de referência na lamínula sobre a qual está montada a amostra (figura ampliada). Esta escolha define a quantidade z_f como a

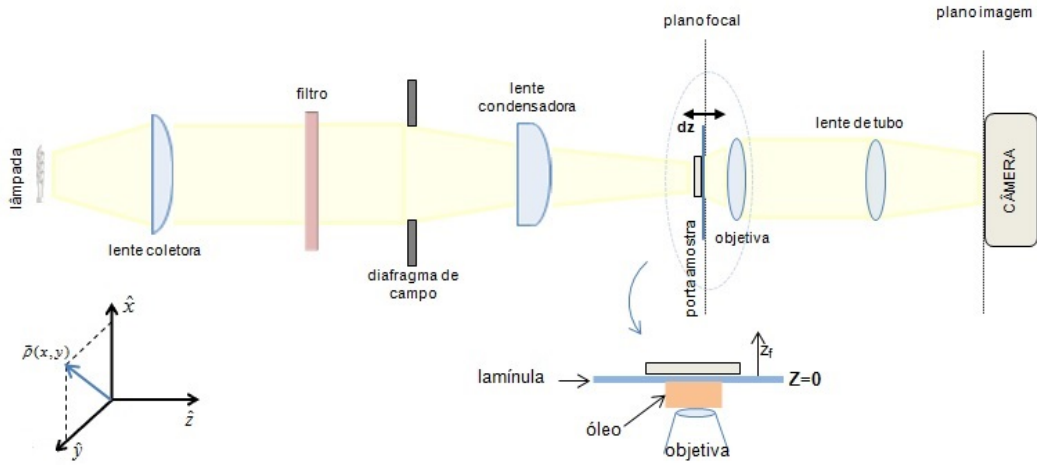


Figura D.1: Esquema de um objeto observado por um microscópio invertido com óptica corrigida no infinito e iluminação do tipo campo claro. O objeto é posicionado no plano focal da objetiva onde é iluminado por feixe de raios paralelos. Ao passar pelo objeto a luz é espalhada ou transmitida, e coletada pela objetiva que conjuga sua imagem no infinito. Para que a imagem seja conjugada no plano imagem, onde a câmera está acoplada, usa-se a lente de tubo.

distância entre a lamínula e o plano focal da objetiva, de forma que quando o plano focal coincide com o plano da lamínula, que é o caso representado, temos que $z_f = 0$. É importante ressaltar que chamaremos de $\vec{\rho}$ o vetor $\vec{\rho} = x\hat{i} + y\hat{j}$ de qualquer plano transversal ao eixo z .

Para que um objeto de fase contido na amostra seja visualizado no plano imagem, o contraste de intensidade (I) neste plano deve ser diferente de zero. Definimos o contraste de intensidade em um ponto $\vec{\rho} = x\hat{i} + y\hat{j}$ do plano imagem como:

$$C(\vec{\rho}) = \frac{I - I_0}{I_0} = \frac{|E(\vec{\rho})|^2 - |E_0|^2}{|E_0|^2} \quad (\text{D.1})$$

onde $E(\vec{\rho})$ é o campo elétrico no plano imagem e E_0 é o campo incidente. Nas seções a seguir será mostrado que um objeto de fase puro (absorção nula) observado por um microscópio óptico possui contraste nulo, a não ser que ele seja deslocado do plano focal da objetiva, ou seja, desfocalizado.

Para isso iremos propagar um campo elétrico incidente \vec{E}_0 pelos elementos ópticos de microscópio desfocalizado, de forma a encontrar o campo final no plano imagem. Em toda dedução os campos elétricos serão tratados como campos escalares que se propagam na direção z , ou seja, com vetor de onda inicial $k_{inicial} = k_z$. Além disso, para simplificar as contas iremos propagar o espectro angular do campo, ao invés do campo em si. O espectro angular de um campo elétrico nada mais é do que sua expansão em série em termos de ondas planas com direções e amplitude de propagação variadas. Para relacionar o campo \vec{E} e seu espectro angular \vec{A} usaremos a Óptica de Fourier [70].

A Óptica de Fourier [70] permite relacionar, via transformadas de Fourier, o espectro angular \vec{A} ao campo elétrico \vec{E} . Para ilustrar esta representação do campo, vamos assumir que conhecemos o valor de um campo $\vec{E}(\vec{r})$ em todos os pontos $\vec{r} = (x, y, z)$ do espaço, como ilustrado na figura D.2(a). No

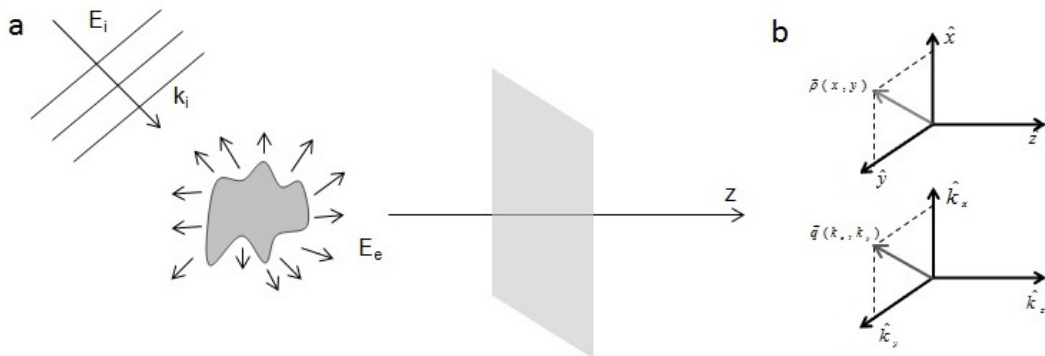


Figura D.2: (a) Ilustração de um problema de espalhamento óptico para representação do espectro angular de um campo. Um campo incidente E_0 é espalhado por um objeto, resultando em um campo espalhado E_e . Para determinarmos o espectro angular deste campo definimos um eixo z arbitrário e avaliamos a transformada de Fourier bidimensional em um plano transversal a este eixo. (b) Representação das coordenadas cartesianas e dos vetores de onda.

caso representado $\vec{E}(\vec{r})$ é a solução de um problema de espalhamento óptico e equivale a $\vec{E} = \vec{E}_0 + \vec{E}_e$, no qual \vec{E}_0 é o campo incidente e \vec{E}_e é o campo espalhado. Para a representação do espectro angular definimos um eixo z arbitrário e consideramos o campo \vec{E} em um plano transversal a este eixo ($z = constante$). Neste plano podemos avaliar a transformada de Fourier

bidimensional do campo como [71]:

$$\vec{A}(k_x, k_y, z) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} \vec{E}(x, y, z) e^{-i(k_x \hat{i} + k_y \hat{j}) \cdot (x \hat{i} + y \hat{j})} dx dy, \quad (\text{D.2})$$

onde x e y são as coordenadas cartesianas transversais e k_x e k_y são as frequências espaciais que compõem o perfil transversal do campo elétrico espalhado de vetor de onda $\vec{k}_{final} = \vec{k} = k_x \hat{x} + k_y \hat{y} + k_z \hat{z}$. Definindo o sistema de coordenadas como representado na figura D.2(b), temos que:

$$2\pi f_x = k_x \quad 2\pi f_y = k_y \quad k_x \hat{x} + k_y \hat{y} = \vec{q} \quad x \hat{x} + y \hat{y} = \vec{\rho}, \quad (\text{D.3})$$

e portanto,

$$\vec{E}(\vec{\rho}, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int \int_{-\infty}^{+\infty} \vec{A}(\vec{q}, z) e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (\text{D.4})$$

e

$$\vec{A}(\vec{q}, z) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} \vec{E}(\vec{\rho}, z) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} dx dy. \quad (\text{D.5})$$

As equações D.4 e D.5 serão fundamentais para as seções a seguir.

Propagação do espectro angular pelos elementos de um microscópio desfocalizado

Assim como representado na figura D.3, os elementos ópticos pelos quais o campo incidente E_0 ($k_i = k_z$) será propagado serão: objeto de fase deslocado do plano focal por uma distância z_f , regiões livres de cargas, porém caracterizadas por diferentes índice de refração, e lentes (objetiva e lente de tubo). Antes de iniciar a propagação iremos expor uma derivação rápida do efeito destes elementos quando luz de um campo E_0 os atravessa. Como mencionado, faremos inicialmente a dedução para um objeto de fase fino (espessura objeto \ll espessura da lamínula) e plano, lembrando uma rede de difração, como ilustrado na figura D.3.

Propagação do espectro angular por uma região livre de cargas

A equação de onda para um meio homogêneo, linear e livre de cargas é obtida por manipulações das equações de Maxwell [72] e dada por:

$$\nabla^2 \vec{E} = \epsilon\mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2}, \quad (\text{D.6})$$

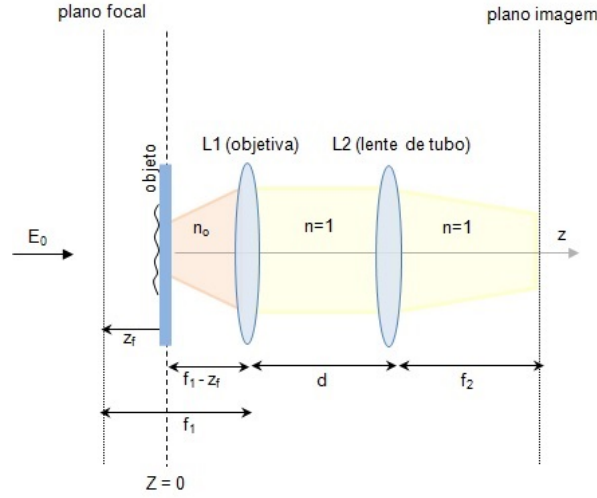


Figura D.3: Esquema do microscópio desfocalizado: objeto está desfocalizado por uma distância z_f em relação ao plano focal; as lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano imagem.

onde ϵ e μ são a permissividade elétrica e permeabilidade magnética do meio, respectivamente. Para o caso geral de um campo elétrico monocromático de frequência angular ω , dependência temporal $e^{i\omega t}$ e vetor propagação \vec{k} ,

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(\vec{r}) e^{i\omega t} \quad (\text{D.7})$$

a equação de onda é:

$$\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + \omega^2 \epsilon \mu \vec{E}(\vec{r}) = 0. \quad (\text{D.8})$$

Utilizando a relação entre vetor de onda, frequência angular e frequência ν :

$$k = \frac{\omega}{\nu} = \omega \sqrt{\epsilon \mu}, \quad (\text{D.9})$$

a equação de onda fica da seguinte forma:

$$\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + k^2 \vec{E}(\vec{r}) = 0 \quad (\text{D.10})$$

que é a equação de Helmholtz. Utilizando a representação do campo elétrico em termos no espectro angular (eq. D.4), e separando o operador nabla em coordenadas ρ e z , tem-se:

$$\int \left\{ \nabla_{\rho}^2 [A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}}] + \frac{\partial^2}{\partial z^2} [A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}}] + k^2 [A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}}] \right\} d\vec{q} = 0$$

$$\int \left\{ \left[-q^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k^2 \right] A(\vec{q}, z) \right\} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q} = 0. \quad (\text{D.11})$$

Para que esta equação seja válida o integrando deverá ser nulo. Considerando que:

$$\vec{k} = k_x \hat{i} + k_y \hat{j} + k_z \hat{k}, \quad \vec{q} = k_x \hat{i} + k_y \hat{j} \iff k_z^2 = k^2 - q^2, \quad (\text{D.12})$$

o integrando torna-se:

$$\frac{\partial^2 A(\vec{q}, z)}{\partial z^2} + k_z^2 A(\vec{q}, z) = 0. \quad (\text{D.13})$$

Esta é uma equação de onda, e tem como solução:

$$\begin{aligned} A(\vec{q}, z) &= A(\vec{q}, 0) e^{\pm i k_z z} \\ &= A(\vec{q}, 0) e^{\pm i k_z z \sqrt{1 - \frac{q^2}{k^2}}}. \end{aligned} \quad (\text{D.14})$$

Obtém-se então a propagação do espectro angular por uma região livre, onde z é a distância propagada. Vê-se que a propagação é caracterizada pela adição de uma fase $e^{\pm i k_z z}$. A partir de agora será considerado apenas o sinal positivo do expoente, que indica propagação da onda no sentido crescente do eixo. A raiz quadrada $\sqrt{1 - \frac{q^2}{k^2}}$ assume valores imaginários quando $q > k$, e valores reais quando $q < k$. Para $q > k$ as ondas são evanescentes, e para $q < k$ as ondas são propagantes ao longo do eixo z .

Como já dito, o campo a ser propagado pelo microscópio desfocalizado é um campo escalar que se propaga na direção do eixo z ($k_i = k_z$). Ao atravessar o objeto de fase supomos que o campo espalha-se muito pouco ao longo das direções x e y , e portanto, pode-se utilizar a aproximação de Fresnel [70] (aproximação paraxial) na qual $k_x + k_y \ll k$, ou seja, $q \ll k$. Dessa forma:

$$k_z = \sqrt{k^2 - q^2} = \sqrt{1 - \frac{q^2}{k^2}} \simeq k - \frac{q^2}{2k}, \quad (\text{D.15})$$

e a equação para a propagação livre do espectro D.14 torna-se:

$$A(\vec{q}, z) = A(\vec{q}, 0) e^{i k z} e^{-i \frac{q^2}{2k} z} \quad (\text{D.16})$$

onde $A(\vec{q}, 0)$ é o espectro angular inicial.

Propagação do espectro angular através de uma lente

Ao atravessar uma lente o campo elétrico sofre uma mudança de fase do tipo:

$$E_\ell(\vec{\rho}) = t_\ell(\vec{\rho})E_0(\vec{\rho}), \quad (\text{D.17})$$

onde $E_0(\vec{\rho})$ é o campo elétrico incidente e $t_\ell(\vec{\rho})$ é a transmissividade da lente, dada por $t_\ell(\vec{\rho}) = e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2}$ com f a distância focal da lente e k o módulo do vetor de onda da luz no meio [70]. Sendo assim:

$$E_\ell(\vec{\rho}) = e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2} E_0(\vec{\rho}), \quad (\text{D.18})$$

e calculando o espectro angular correspondente a este campo, tem-se:

$$A_\ell(\vec{q}, z) = \int E_0(\vec{\rho}, z) e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2} e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho}. \quad (\text{D.19})$$

Esta equação é a transformada de Fourier do produto de duas funções ($E_0(\vec{\rho}, z)$ e $e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2}$). Aplicando o teorema da convolução [70] para a transformada de Fourier, tem-se:

$$A_\ell(\vec{q}, z) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^2 A(\vec{q}, z) \otimes T_\ell(\vec{q}) = \left(\frac{1}{2\pi}\right)^2 \int A_0(\vec{q}', z) T_\ell(\vec{q} - \vec{q}') d\vec{q}' \quad (\text{D.20})$$

onde $T_\ell(\vec{q})$ é a transformada de Fourier bidimensional de $t_\ell(\vec{\rho})$ e $A_0(\vec{q}, z)$ é a transformada de Fourier de $E_0(\vec{\rho}, z)$. O cálculo de $T_\ell(\vec{q})$ não será apresentado aqui e pode ser visto em [70]. Sendo assim, o espectro angular após atravessar uma lente é dado por:

$$\begin{aligned} A_\ell(\vec{q}, z) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}', z) T_\ell(\vec{q} - \vec{q}') d\vec{q}' \\ &= \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f}{ik}} \int A_0(\vec{q}', z) e^{i\frac{f}{2k}(\vec{q}-\vec{q}')^2} d\vec{q}'. \end{aligned} \quad (\text{D.21})$$

Propagação do espectro angular através de um objeto de fase

Como pode ser deduzido pela propagação do espectro angular por uma região livre, a variação de fase do campo elétrico ao propagar-se livremente por uma distância d em um meio com índice de refração n , é dada por:

$$\varphi_1 = nk_0 d. \quad (\text{D.22})$$

Caso seja acrescentado a este meio um objeto de fase fino e plano com perfil de amplitude $h(\vec{\rho})$ limitando um outro meio com índice de refração $\Delta n + n$, tem-se a configuração da figura D.4. Neste caso, o campo elétrico inicial

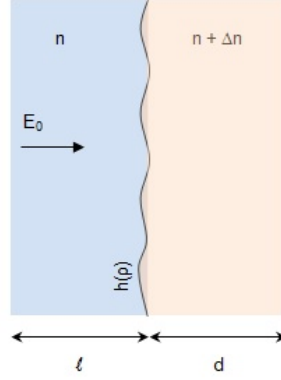


Figura D.4: Esboço de um objeto de fase de única interface fina e plana: \vec{E}_0 é o campo elétrico incidente; $h(\vec{\rho})$ é a amplitude de altura do objeto; n e $n + \Delta n$ são os índices de refração do meio por onde o campo elétrico se propaga antes e depois da interface; $\vec{\rho}$ é o vetor posição no plano (x, y) perpendicular à direção z de propagação do campo elétrico.

E_0 propaga-se por uma distância $l + h(\vec{\rho})$ no meio com índice de refração n e ganha uma fase φ_1 . Em seguida, o campo atravessa o objeto de fase e propaga-se por uma distância $[d - (l + h(\vec{\rho}))]$ no meio com índice de refração $n + \Delta n$, ganhando uma fase φ_2 . A variação total de fase neste caso é:

$$\begin{aligned} \Delta\varphi(\vec{\rho}) &= \varphi_1 + \varphi_2 = nk_0(l + h(\vec{\rho})) + (n + \Delta n)k_0(d - (l + h(\vec{\rho}))) = \\ &= -\Delta nk_0 h(\vec{\rho}). \end{aligned} \quad (\text{D.23})$$

Sendo assim, o campo elétrico ao passar pelo objeto de fase é dado por:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 e^{i\Delta\varphi(\vec{\rho})} = E_0 e^{-i\Delta nk_0 h(\vec{\rho})}. \quad (\text{D.24})$$

Considerando o limite em que a variação de fase é muito pequena ($\Delta\varphi(\vec{\rho}) \ll 1$), o campo elétrico pode ser expandido até primeira ordem:

$$E(\vec{\rho}) \simeq E_0 [1 + i\varphi(\vec{\rho})] = E_0 [1 - i\Delta nk_0 h(\vec{\rho})]. \quad (\text{D.25})$$

Decompondo-se o perfil do objeto de fase em uma série de Fourier,

$$h(\vec{\rho}) = \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \exp^{i(\vec{q}' \cdot \vec{\rho})}, \quad (\text{D.26})$$

onde $h(\vec{q}')$ representa a amplitude do modo \vec{q}' da ondulação da interface e S é a área do objeto de fase, temos:

$$E(\vec{\rho}) = E_0 \left[1 - i\Delta nk_0 \sqrt{S} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right]. \quad (\text{D.27})$$

A partir disto, pode-se calcular o espectro angular correspondente:

$$\begin{aligned} A_0(\vec{q}) &= \int E(\vec{\rho}) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= \int E_0 \left[1 - i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \right] e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= \int E_0 \left[1 - i\Delta nk_0 \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left(\frac{e^{i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}}}{2i} \right) \right] e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} \\ &= E_0 \left[\int e^{-i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{\rho} + \frac{\Delta nk_0}{2} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \int \left(-e^{i(\vec{q}' - \vec{q}) \cdot \vec{\rho}} + e^{-i(\vec{q}' + \vec{q}) \cdot \vec{\rho}} \right) d\vec{\rho} \right]. \end{aligned} \quad (\text{D.28})$$

Utilizando a função $\delta(\vec{\rho})$:

$$\delta(\vec{\rho}) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int e^{i(\vec{q} \cdot \vec{\rho})} d\vec{q}. \quad (\text{D.29})$$

o espectro angular após atravessar um objeto de fase torna-se:

$$\begin{aligned} A_0(\vec{q}) &= (2\pi)^2 E_0 \left[\delta(\vec{q}) + \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \delta(\vec{q} + \vec{q}') - \right. \\ &\left. \frac{\Delta nk_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \delta(\vec{q} - \vec{q}') \right]. \end{aligned} \quad (\text{D.30})$$

Propagação do espectro angular

Utilizando as equações D.30, D.21 e D.16 é possível realizar a propagação do espectro angular por um microscópio desfocalizado, conforme ilustrado na figura D.3. Considerando o campo E_0 como o campo que incide no objeto de fase e $A_0(\vec{q}, 0)$ como o espectro angular logo após atravessar o objeto, o caminho óptico a ser seguido será composto pelos seguintes passos:

1. distância $f_1 - z_f$ percorrida no óleo, com $n_o = 1.51$, e portanto, $k = n_o k_0$;
2. lente $L1$ com distância focal f_1 ;
3. distância d entre lentes, com $n = 1$ e portanto, k_0 ;
4. lente $L2$ com distância focal f_2 e
5. distância f_2 entre a lente L_2 e o plano imagem, com $n = 1$ e portanto, k_0 .

Passo 1: Como visto, a propagação livre do espectro promove o acréscimo de uma fase proporcional à distância propagada, de forma que A_1 será dado por:

$$A_1(\vec{q}, z) = A_0(\vec{q}, 0) e^{ik(f_1 - z_f)} e^{-i\frac{q^2}{2k}(f_1 - z_f)}, \quad (\text{D.31})$$

onde $k = k_0 n_o$.

Passo 2: Em seguida, a propagação do espectro por uma lente de foco f_1 acrescenta uma fase proporcional a f_1 :

$$A_2(\vec{q}, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} \int A_1(\vec{q}', z) e^{i\frac{f_1}{2k}(\vec{q} - \vec{q}')^2} d\vec{q}'. \quad (\text{D.32})$$

Passo 3: Neste passo temos novamente a propagação do espectro por uma região livre, porém com índice de refração $n = 1$, e portanto $k = k_0$:

$$A_3(\vec{q}, z) = A_2(\vec{q}, z) e^{ik_0 d} e^{-i\frac{q^2}{2k_0} d}. \quad (\text{D.33})$$

Passo 4: Agora o espectro é propagado pela lente de tubo, ganhando uma fase proporcional a f_2 , e portanto:

$$A_4(\vec{q}, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_2}{ik_0}} \int A_3(\vec{q}', z) e^{i\frac{f_2}{2k_0}(\vec{q} - \vec{q}')^2} d\vec{q}' \quad (\text{D.34})$$

Passo 5: O último passo consiste em propagar o espectro por uma distância f_2 até o plano imagem, com $k = k_0$, o que acarreta o acréscimo final de uma fase:

$$A_5(\vec{q}, z) = A_4(\vec{q}, z) e^{ik_0 f_2} e^{-i\frac{q^2}{2k_0} f_2}. \quad (\text{D.35})$$

Fazendo as substituições para A_1 , A_2 , A_3 e A_4 e definindo:

$$D(\vec{q}) = \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k}(\Delta f)} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q}'\cdot\vec{q})} d\vec{q}', \quad (\text{D.36})$$

$$\alpha = \frac{k_0^2}{2f_2^2} \left(\frac{f_1}{k} - \frac{d}{k_0} + \frac{f_2}{k_0} \right) \quad (\text{D.37})$$

e

$$\beta = k(f_1 - z_f) + k_0 d + k_0 f_2, \quad (\text{D.38})$$

obtém-se o espectro angular final para um microscópio desfocalizado:

$$A_5(\vec{q}, z) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 k_0}{f_2 k}} e^{i\beta} \int e^{i\alpha q''^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}''\right) e^{-i(\vec{q}''\cdot\vec{q})} d\vec{q}'' \quad (\text{D.39})$$

Campo elétrico e contraste para um microscópio desfocalizado

Nesta seção será calculado o campo elétrico final para um microscópio desfocalizado:

$$E(\vec{\rho}, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_5(\vec{q}, f_2) e^{i(\vec{q}\cdot\vec{\rho})} d\vec{q}, \quad (\text{D.40})$$

e portanto,

$$E(\vec{\rho}, z) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{i\beta} e^{i\alpha \frac{f_2^2 k^2}{f_1^2 k_0^2} \rho^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{q^2}{2k} z_f} e^{i(\vec{\rho}\cdot\vec{q})} d\vec{q}. \quad (\text{D.41})$$

Nesta equação o termo $\frac{k_0 f_1}{k f_2}$ é fator de magnificação do microscópio e o sinal negativo que surge devido à divisão por i , e implica que a imagem formada é invertida. Agrupando as fases fora da integral em $\beta(\rho')$ e definindo a constante $C = \frac{1}{i2\pi} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}}$ pode-se reescrever o campo elétrico como:

$$E(\vec{\rho}, z) = C \frac{e^{i\beta(\rho')}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{z_f}{2k} q^2} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (\text{D.42})$$

que corresponde ao campo elétrico para o microscópio desfocalizado.

É importante ressaltar dois pontos nesta equação. Primeiro, o fato de que o objeto de fase estar desfocalizado provoca o aparecimento do termo de fase extra $e^{i\frac{z_f}{2k}q^2}$, que é proporcional à quantidade de desfocalização z_f , e como veremos adiante é o que possibilita um contraste não nulo no plano imagem. Segundo, é que o vetor de onda k é $k = n_o k_0$ onde n_o é o índice de refração do óleo de imersão da objetiva e k_0 é o vetor de onda da luz no ar. Para desfocalizar o sistema move-se o objeto de fase, e portanto, é o caminho óptico entre o objeto de fase e a objetiva que é variado. Por isso o índice de refração importante neste caso é o do óleo de imersão da objetiva. Se a objetiva é mantida fixa e o sistema é desfocalizado de outra forma, a fase será diferente. A determinação deste vetor de onda é um dos pontos da técnica revisto neste artigo a ser publicado. Para assegurar que este é o índice de refração correto a ser inserido na teoria, foram realizados experimentos com redes de difração.

O campo da equação D.42 foi obtido para o caso de um objeto de fase fino (espessura \ll espessura da lamínula) e plano. Suponhamos que o objeto de fase possua uma espessura considerável e seja curvado, como na situação ilustrada na figura D.5. Neste caso, cada ponto $\vec{\rho}$ do perfil $h(\vec{\rho})$ terá uma dis-

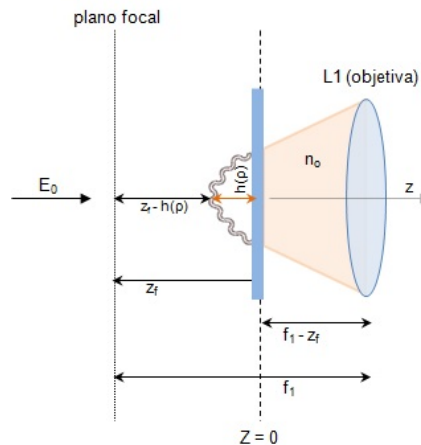


Figura D.5: (a) Esquema do microscópio desfocalizado para observação de um objeto de fase espesso: objeto está desfocalizado de uma pequena distância z_f . No entanto, cada ponto do perfil de espessura do objeto está a uma distância particular $z_f - h(\vec{\rho})$ do plano focal.

tância específica em relação ao plano focal. Como todo o resto da propagação permanece inalterado, o campo elétrico final será da seguinte forma:

$$E(\vec{\rho}, z) = C \frac{e^{i\beta(\vec{\rho}')}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{z_f - h(\vec{\rho})}{2k} q^2} e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (\text{D.43})$$

onde o termo de fase extra leva em consideração a forma do objeto.

Contraste para objetos finos e planos

De posse das equações D.42 e D.30 podemos determinar o contraste no plano imagem para um objeto de fase composto por uma interface fina e plana. Substituindo então a expressão de $A_0(\vec{q}, 0)$, tem-se que o campo no plano imagem será:

$$\begin{aligned} E(\vec{\rho}) &= C \frac{e^{i\beta(\vec{\rho}')}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{z_f}{2k} q^2} e^{i(\vec{\rho} \cdot \vec{q})} d\vec{q} \\ &= C' E_0 \left\{ \int \left[\delta(\vec{q}) + \frac{\Delta n k_0}{2} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left(\delta(\vec{q} + \vec{q}') - \delta(\vec{q} - \vec{q}') \right) \right] e^{i\frac{z_f}{2k} q^2} e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} \right\} d\vec{q} \\ &= C' E_0 \left\{ 1 + \frac{\Delta n k_0}{2} \left[\sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') e^{i\frac{z_f}{2k} q'^2} e^{i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} - \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') e^{i\frac{z_f}{2k} q'^2} e^{-i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} \right] \right\} \\ &= C' E_0 \left\{ 1 + \frac{\Delta n k_0}{2} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left[e^{i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} \right] e^{i\frac{z_f}{2k} q'^2} \right\} \\ &= C' E_0 \left\{ 1 - i \Delta n k_0 \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{i\frac{z_f}{2k} q'^2} \right\}. \end{aligned} \quad (\text{D.44})$$

Utilizando a equação D.1 e definindo-se $I_0 = |C|^2 |E_0|^2$, a intensidade será dada por:

$$I(\vec{\rho}) = I_0 \left\{ 1 - 2 \Delta n k_0 \sum_{\vec{q}'} \left[h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \text{sen} \left(\frac{z_f}{2k} q'^2 \right) \right] \right\} \quad (\text{D.45})$$

e o contraste [25] será dado por:

$$C(\vec{\rho}) = -2 \Delta n k_0 \sum_{\vec{q}'} \left[h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) \text{sen} \left(\frac{z_f}{2k} q'^2 \right) \right]. \quad (\text{D.46})$$

Este é um resultado central da MD e deve ser analisado com cuidado. Nota-se que o contraste é uma função oscilatória com frequência $\frac{q^2}{2k}$, com $k = k_0 n_o$. Além disto, no caso do objeto não estar desfocalizado, $z_f = 0$ e o argumento do seno se torna nulo. Como conseqüência, o contraste também é nulo! Este resultado confirma que objetos de fase não são visíveis quando estão no plano focal da objetiva, e que a desfocalização torna possível a observação de objetos de fase por um microscópio operando em campo claro.

No limite de pequenos vetores de onda e pequenas desfocalizações podemos aproximar $\sin x \sim x$, e o contraste se torna:

$$C(\vec{\rho}) = -\Delta n k_0 \frac{z_f}{k} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) q^2 \right]. \quad (\text{D.47})$$

Além disso, levando em conta equação a representação do perfil de altura $h(\vec{\rho})$ em série de Fourier (eq. D.26) e utilizando que $|\nabla h| \ll 1$, tem-se que:

$$\frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) q^2 \right] = -\nabla_{\rho}^2 h(\vec{\rho}) \quad (\text{D.48})$$

e portanto,

$$C(\vec{\rho}) = z_f \frac{\Delta n}{n_o} \nabla^2 h(\vec{\rho}) = z_f \frac{\Delta n}{n_o} \kappa(\vec{\rho}) \quad (\text{D.49})$$

com n_o o índice de refração do óleo de imersão da objetiva, $n_o = 1,51$, e κ a curvatura local da hemácia. Concluindo, o contraste gerado por um objeto de fase em um microscópio desfocalizado é proporcional à desfocalização e ao laplaciano do perfil de altura $h(\vec{\rho})$ do objeto, que é a curvatura local do objeto. Ou seja, o contraste MD contém informação direta sobre a geometria do objeto de fase.

Contraste para objetos espessos e curvos

Para o caso da observação de um objeto de fase composto por uma única interface curvada e espessa, o campo elétrico final é dado pela equação D.43 deduzida anteriormente. Fazendo uma analogia com o contraste obtido para uma interface plana, tem-se que:

$$C(\vec{\rho}) = -2\Delta n k_0 \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen} \left(\frac{z_f - h(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) \right] \quad (\text{D.50})$$

onde $h(\vec{\rho})$ é o perfil de altura do objeto. Novamente, no limite de pequenos vetores de onda e pequenas desfocalizações utiliza-se que $\sin x \sim x$ e o contraste se torna:

$$C(\vec{\rho}) = -\Delta n k_0 \frac{(z_f - h(\vec{\rho}))}{k} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) q^2 \right], \quad (\text{D.51})$$

e utilizando a representação do perfil de altura em série de Fourier com $|\nabla h| \ll 1$, tem-se que:

$$C(\vec{\rho}) = (z_f - h(\vec{\rho})) \frac{\Delta n}{n_o} \nabla^2 h(\vec{\rho}) = (z_f - h(\vec{\rho})) \frac{\Delta n}{n_o} \kappa \vec{\rho} \quad (\text{D.52})$$

Sendo assim, o contraste gerado por um objeto de fase curvo e espesso em um microscópio desfocalizado é também proporcional à desfocalização e ao laplaciano do perfil de altura $h(\vec{\rho})$ do objeto, e portanto, à sua curvatura local κ .

A possibilidade de se obter contraste para objetos de fase observados por uma técnica não invasiva como a MD é de muito interesse para aplicação em células. Isto porque as células são, em sua grande maioria, objetos de fase para os comprimentos de onda de luz visível. A hemácia por exemplo só absorve luz no verde, e portanto, é transparente para os outros comprimentos de onda de luz visível. Além disso, a célula possui um índice de refração consideravelmente homogêneo, pois é basicamente composta por hemoglobina, e na fase madura não possui organelas no seu interior. Este fato possibilita a observação de hemácias por um microscópio desfocalizado, e para determinar o contraste gerado por uma célula sanguínea apresentamos na próxima seção o nosso modelo para uma hemácia.

Campo elétrico e contraste para uma hemácia observada por um microscópio desfocalizado

Na figura D.6 temos ilustrado o nosso modelo para uma hemácia observada por um microscópio desfocalizado. A célula é modelada por duas interfaces finas com perfis de altura h_1 e h_2 distintos, sendo que h_1 representa a membrana livre e h_2 a membrana aderida ao substrato (lamínula), como nos experimentos. As membranas são conectadas entre si e seguem o perfil da

seção reta de uma hemácia, englobando um meio com índice de refração $\Delta n + n$, que representa a hemoglobina. Por fim, o índice de refração fora da célula é dado por n , e representa o meio no qual as hemácias são diluídas no experimento.

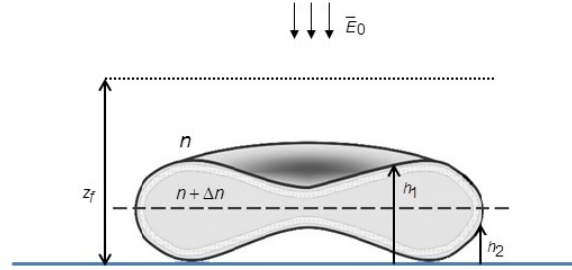


Figura D.6: Representação de uma hemácia observada por um microscópio desfocalizado. A célula é representada por duas interfaces h_1 e h_2 que englobam um meio com índice de refração $n + \Delta n$. Reproduzindo a amostra, a célula está imersa em um meio com índice de refração n , e h_1 representa a membrana livre e h_2 representa a membrana aderida ao substrato (lamínula). Na figura o plano focal está situado acima da célula, a uma distância z_f da lamínula.

Para obter o contraste MD para hemácias a mesma equação de campo elétrico derivada anteriormente é utilizada:

$$E(\vec{\rho}) = C \frac{e^{i\beta(\vec{\rho})}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{z_f}{2k}q^2} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (\text{D.53})$$

porém, para um espectro angular $A(q, 0)$ calculado especificamente para uma célula. Para determinar este espectro, o campo elétrico incidente E_0 é propagado através da célula representada na figura D.6, e segue os seguintes passos:

1. atravessa a interface h_1 , passando de um meio de índice de refração n para um de $n + \Delta n$;
2. se propaga por uma distância $h_1 - h_2$ em um meio com índice de refração $n + \Delta n$;
3. atravessa a interface h_2 , passando para um meio com índice de refração n .

Passo 1: Assim como mostrado anteriormente, ao atravessar uma interface de perfil de altura h_1 , o espectro sofre uma variação de fase de forma que o espectro A_1 logo após a interface é dado por:

$$A_1(\vec{q}) = (2\pi)^2 E_0 \left[\delta(\vec{q}) + \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \delta(\vec{q} + \vec{q}') - \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \delta(\vec{q} - \vec{q}') \right].$$

Passo 2: No segundo passo, o espectro é propagado por uma distância $h_1 - h_2$ em um meio com índice de refração $n + \Delta n$, e se torna:

$$A_2(\vec{q}) = A_1(\vec{q}) e^{ik(h_1-h_2)} e^{-i\frac{q^2(h_1-h_2)}{2k}}, \quad (\text{D.54})$$

onde $k = k_0(n + \Delta n)$. Substituindo este espectro na equação D.4, temos o campo elétrico logo após a primeira interface:

$$\begin{aligned} E_2(\vec{q}) &= \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_2(\vec{q}') e^{i\vec{q}' \cdot \vec{\rho}} d\vec{q}' \\ &= E_0 \int \left[\delta(\vec{q}') + \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \left(\delta(\vec{q}' + \vec{q}) - \delta(\vec{q}' - \vec{q}) \right) \right] \\ &\quad \times e^{ik(h_1-h_2)} e^{-i\frac{q'^2(h_1-h_2)}{2k}} d\vec{q}' \\ &= E_0' \left[1 - \frac{i\Delta n k_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') \sin(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{-i\frac{q'^2(h_1-h_2)}{2k}} \right], \end{aligned} \quad (\text{D.55})$$

onde $E_0' = E_0 e^{ik(h_1-h_2)}$.

Passo 3: No último passo, a propagação do campo é similar ao passo 1, porém com uma variação de fase com sinal oposto, devido à inversão dos índices de refração dos meios envolvidos $\Delta\varphi(\vec{\rho}) = \Delta n k_0 h_2(\vec{\rho})$. Isto retorna o espectro angular A_3 ,

$$\begin{aligned} A_3 &= (2\pi)^2 E_0' \left\{ \delta(\vec{q}) + \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h_2(\vec{q}') [\delta(\vec{q} - \vec{q}') - \delta(\vec{q} + \vec{q}')] \right. \\ &\quad \left. - \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h_1(\vec{q}') e^{-i\frac{q'^2(h_1-h_2)}{2k}} [\delta(\vec{q} - \vec{q}') - \delta(\vec{q} + \vec{q}')] \right\}, \end{aligned} \quad (\text{D.56})$$

onde os termos quadráticos em h foram descartados. Este é o novo espectro A_0 , e substituindo este espectro na equação D.4, temos o campo elétrico no plano imagem:

$$E(\vec{\rho}) = C \left\{ 1 + \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} h_2(\vec{q}) \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) e^{\frac{(z_f - h_2)q^2}{2k}} - \frac{i\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} h_1(\vec{q}) \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) e^{\frac{(z_f - h_1)q^2}{2k}} \right\}. \quad (\text{D.57})$$

Como visto anteriormente, a partir do campo podemos facilmente calcular o contraste de intensidade no plano imagem. Descartando os termos quadráticos em $h_{1/2}$ temos:

$$C(\vec{\rho}) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[h_2(\vec{q}) \sin\left(\frac{(z_f - h_2)q^2}{2k}\right) - h_1(\vec{q}) \sin\left(\frac{(z_f - h_1)q^2}{2k}\right) \right] \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}, \quad (\text{D.58})$$

que é o contraste MD para uma hemácia. Para a aproximação de pequenos vetores de onda e pequenas desfocalizações ($\sin x \sim x$) e utilizando a representação dos perfis de altura h_1 e h_2 em série de Fourier, temos:

$$C(\vec{\rho}) = \frac{\Delta n}{n_0} \left((z_f - h_1) \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) - (z_f - h_2) \nabla^2 h_2(\vec{\rho}) \right), \quad (\text{D.59})$$

onde $\nabla^2 h_1$ e $\nabla^2 h_2$ são as curvaturas locais da membrana livre e aderida, respectivamente. Uma observação fundamental deve ser feita aqui. Pela equação acima vemos que ambas membranas contribuem para a geração de contraste, e dependendo da distância $(z_f - h_{1/2})$ e da curvatura $\nabla^2 h_{1/2}$, uma membrana contribui mais do que a outra. No entanto, quando o plano focal é posicionado sobre uma das interfaces a quantidade $(z_f - h_{1/2})$ se torna nula, e a interface não contribui mais para o contraste. Ou seja, o contraste visualizado passa a ser exclusivamente devido à outra interface, tornando possível retirar informação sobre cada interface separadamente. Esta característica é exclusiva da MD e possibilita a caracterização de diferentes interfaces de um objeto de fase. Na seção a seguir iremos mostrar que a flutuação quadrática média do contraste MD conserva esta característica, de forma que informação sobre a flutuação de membrana também pode ser obtida para cada membrana separadamente.

Flutuação quadrática média do contraste de hemácias

Como visto nas seções anteriores, é possível acessar as propriedades elásticas de membranas via o estudo das flutuações de altura destas. Como o contraste MD nos dá informação direta sobre a curvatura da membrana, a flutuação quadrática média do contraste MD nos dará informação sobre a flutuação de curvatura da membrana. Pelo método desenvolvido poderemos extrair a flutuação em altura de membrana desta medida.

A flutuação quadrática média de uma variável x ao longo do tempo nada mais é do que uma medida de sua dispersão, ou seja, uma medida do quanto a variável desvia de seu valor médio $\langle x \rangle$ ao longo do tempo. Sendo assim, a flutuação quadrática média do contraste MD será $\langle (\Delta C)^2 \rangle = \langle (C - \langle C \rangle)^2 \rangle$, onde C é dada pela equação D.58 e os símbolos $\langle \rangle$ representam a média temporal. Para deduzir este momento do contraste, temos que reformular a expressão para o perfil de altura, levando em conta sua dependência temporal: $\mathcal{H}_{1/2}(\vec{\rho}, t) = h_{1/2}(\vec{\rho}) + u_{1/2}(\vec{\rho}, t)$, onde u representa a parte que flutua no tempo em torno da posição media h que não varia no tempo. Desta forma,

$$C(\vec{\rho}, t) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[\mathcal{H}_1(\vec{q}, t) \sin\left(\frac{(z_f - h_1)q^2}{2k}\right) - \mathcal{H}_2(\vec{q}, t) \sin\left(\frac{(z_f - h_2)q^2}{2k}\right) \right] \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}, \quad (\text{D.60})$$

com a média temporal dada por:

$$\langle C(\vec{\rho}, t) \rangle = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[h_1(\vec{q}) \sin\left(\frac{(z_f - h_1)q^2}{2k}\right) - h_2(\vec{q}) \sin\left(\frac{(z_f - h_2)q^2}{2k}\right) \right] \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}, \quad (\text{D.61})$$

onde $\langle \mathcal{H}_{1/2}(\vec{\rho}, t) \rangle = \langle h_{1/2}(\vec{\rho}) \rangle + \langle u_{1/2}(\vec{\rho}, t) \rangle = h_{1/2}(\vec{\rho})$, pois como $h_{1/2}$ é constante ao longo do tempo, $\langle h_{1/2}(\vec{\rho}) \rangle = h_{1/2}(\vec{\rho})$, e u é uma variável aleatória, $\langle u(\vec{\rho}, t) \rangle = 0$. Sendo assim, subtraindo a equação D.61 da equação D.60, temos:

$$\langle \Delta C(\vec{\rho}, t) \rangle = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[\left(\mathcal{H}_1(\vec{q}, t) - h_1(\vec{q}) \right) \sin\left(\frac{(z_f - h_1)q^2}{2k}\right) \right] \right\}$$

$$\begin{aligned}
& - \left(\mathcal{H}_2(\vec{q}, t) - h_2(\vec{q}) \right) \sin \left(\frac{(z_f - h_2)q^2}{2k} \right) \Big] \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \Big\} \\
& = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[u_1(\vec{q}, t) \sin \left(\frac{(z_f - h_1)q^2}{2k} \right) \right. \right. \\
& \quad \left. \left. - u_2(\vec{q}, t) \sin \left(\frac{(z_f - h_2)q^2}{2k} \right) \right] \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}
\end{aligned} \tag{D.62}$$

Para obter $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ devemos calcular o quadrado da função acima. Considerando as flutuações de altura das interfaces $u_{1/2}$ como variáveis estatisticamente independentes, os produtos cruzados entre u_1 e u_2 serão nulos, e portanto:

$$\begin{aligned}
\langle \Delta C^2(\vec{\rho}) \rangle = & \frac{(2\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} \left[|u_1^2(\vec{q})| \times \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - h_1(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) \langle \text{sen}^2(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \rangle \right. \\
& \left. + |u_2^2(\vec{q})| \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - h_2(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) \langle \text{sen}^2(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \rangle \right]
\end{aligned} \tag{D.63}$$

onde $|u^2(\vec{q})|$ representa o espectro das flutuações de altura. Novamente vê-se que quando o plano focal é posicionado sobre uma das interfaces a quantidade $(z_f - h_{1/2})$ se torna nula, e a interface não contribui mais para a flutuação quadrática média do contraste. Ou seja, a flutuação de contraste visualizada passa a ser exclusivamente devido à outra interface, tornando possível retirar informação sobre cada interface separadamente. Por fim, passando a equação para o limite contínuo, onde $\sum_{\vec{q}} \equiv \frac{A}{(2\pi)^2} \int d\vec{q} = \frac{A}{2\pi} \int q dq$, temos:

$$\begin{aligned}
\langle (\Delta C(\vec{\rho}))^2 \rangle = & \frac{(\Delta nk_0)^2}{\pi} \int_q q dq \left[|u_1(q)|^2 \times \sin^2 \left(\frac{(z_f - h_1(\vec{\rho}))q^2}{2k} \right) + \right. \\
& \left. + |u_2(q)|^2 \times \sin^2 \left(\frac{(z_f - h_2(\vec{\rho}))q^2}{2k} \right) \right].
\end{aligned} \tag{D.64}$$

A integração não será demonstrada aqui e pode ser vista em [18]. Como a hemácia é uma célula com simetria radial, são utilizadas funções de Bessel e condições de contorno no tipo Dirichlet, para qual $J_0(q_n R) = 0$, sendo R o raio da hemácia. Além disto, pelo tipo de simetria, $\vec{q} = q$.

Quantitative Assessment of the Interplay Between DNA Elasticity and Cooperative Binding of Ligands

L. Siman,¹ I. S. S. Carrasco,² J. K. L. da Silva,¹ M. C. de Oliveira,³ M. S. Rocha,² and O. N. Mesquita¹

¹*Departamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, CEP 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

²*Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000 Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

³*Escola de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

(Received 19 January 2012; published 10 December 2012)

Binding of ligands to DNA can be studied by measuring the change of the persistence length of the complex formed, in single-molecule assays. We propose a methodology for persistence length data analysis based on a quenched disorder statistical model and describing the binding isotherm by a Hill-type equation. We obtain an expression for the effective persistence length as a function of the total ligand concentration, which we apply to our data of the DNA-cationic β -cyclodextrin and to the DNA-HU protein data available in the literature, determining the values of the local persistence lengths, the dissociation constant, and the degree of cooperativity for each set of data. In both cases the persistence length behaves nonmonotonically as a function of ligand concentration and based on the results obtained we discuss some physical aspects of the interplay between DNA elasticity and cooperative binding of ligands.

DOI: 10.1103/PhysRevLett.109.248103

PACS numbers: 87.80.Cc, 87.14.gk, 87.15.La

The study of DNA interactions with ligands such as drugs or proteins is an essential topic to many areas of knowledge, from the comprehension of intracellular processes to the treatment of human diseases. For a recent review on the field, see Ref. [1].

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides composed of *D*-glucose units joined by glucosidic linkages. The β subtype, which was used in this work, consists of seven units and has a structure that resembles a truncated cone, with hydroxyl groups localized at the outer surface of the cone. That gives CDs the property to be water soluble and to have a relatively hydrophobic inner cavity able to partially or entirely accommodate polymers forming host-guest inclusion complexes. Monovalent cationic β -cyclodextrin (6-monodeoxy-6-monoamine- β -cyclodextrin), obtained by substituting one of the hydroxyl groups by an amino group, has been used for condensing double-strand DNA (dsDNA) and introducing it into small vesicles for gene therapy applications [2]. Therefore, there is a growing interest in experiments that can probe in more detail the DNA-CD interaction.

In this Letter we present measurements of the persistence length (A) of DNA-CD complexes as a function of CD concentration, performed at room temperature, both for neutral and monovalent CD. We introduce a new and practical method of analysis of the persistence length data such that we can obtain the local changes in DNA elasticity and the chemical parameters (cooperativity and the dissociation constant) of DNA-ligand binding process. To measure (A), we have performed single molecule stretching experiments by using optical tweezers, set up with an infrared laser mounted in an inverted microscope with a 100 \times , NA = 1.4 objective. A polystyrene bead of diameter 3 μ m is

attached to one end of a dsDNA molecule and the other end is attached to the cover slip [3]. We use optical tweezers to trap the bead and stretch the complex with maximum forces of the order of 3 pN, therefore within the entropic regime. The Marko-Siggia wormlike chain expression for the entropic force [4] is a very good approximation for this case, and returns the persistence and contour lengths for the complex formed. The samples are prepared with λ -DNA under nearly physiological conditions in a phosphate buffered saline solution with pH = 7.4 and [NaCl] = 150 mM. The DNA base-pair concentration used was $C_{bp} = 11 \mu$ M. Details can be found in our Ref. [5].

In Fig. 1 it is shown the data for persistence length as a function of total concentration (C_T) for both neutral (red circles) and monovalent CD (blue squares). Each point is an average over four different DNA molecules, each one stretched four times. For the region of concentrations used, there is no noticeable interaction between neutral CD and dsDNA, since the persistence length remains practically equal to the bare dsDNA value. Nevertheless, for the cationic CD, the persistence length behaves in an unusual manner. It does not follow a monotonic behavior. Instead, it decreases for small concentrations, and later increases for larger ones. In addition, when a critical concentration $C_T = 55 \mu$ M is reached, (A) decreases abruptly from 160 nm down to 7 nm, and then remains approximately constant for higher concentrations. The contour length of the complexes for both types of CDs (data not shown) remains practically constant for the range of concentrations studied.

A nonmonotonic behavior for the persistence length was also observed in the interaction between DNA and the bacterial protein HU [6,7]. The model proposed by

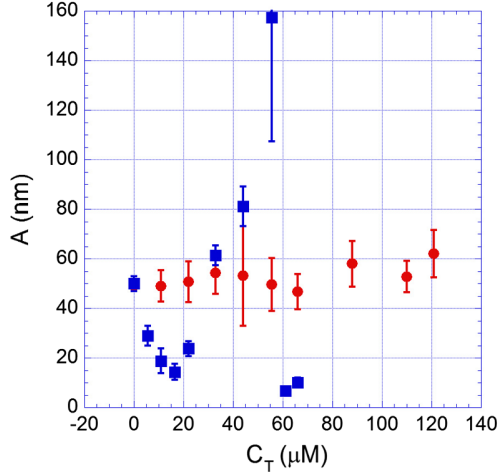


FIG. 1 (color online). Persistence length as a function of total CD concentration in solution: blue squares for cationic mono-valent CD; red circles for neutral CD.

Rappaport *et al.* [8] considers that the HU protein induces a spontaneous curvature in the DNA, resulting in a smaller local persistence length. For higher concentrations of HU, when two HU dimers become nearest neighbors, they stiffen and consequently increase the DNA persistence length. The model reproduces the nonmonotonic behavior of the persistence length and predicts a negative cooperativity between the dimers. However, Sagi *et al.* [7] argued that independent single HU protein attaching to DNA could not produce the large bending angles observed; thus, some positive cooperativity should come into play. They estimated that the binding of four or five adjacent HU molecules to DNA (bound clusters) are needed to cause the observed effect, and as the concentration of HU is increased, these bound clusters fuse together and give rise to stiff DNA-HU filaments [6].

In order to explain the nonmonotonic persistence length behavior observed for both HU and CD, we propose that a single bound cluster makes the DNA more flexible, with persistence length A_1 smaller than the bare value A_0 ; when two bound clusters are neighbors, they stiffen the DNA, and give rise to a persistence length A_2 larger than A_0 . To model this effect we will assume that the bound clusters are randomly distributed along the DNA, and their size distribution is very narrow, with an average size of n molecules. We will also assume that as one increases the ligand concentration in solution, the number of bound clusters increases, keeping the same average size n . Therefore, a cluster with doubled size occurs when, by chance, two bound clusters happen to be neighbors, and not because of cluster growth. There are some physical scenarios where clusters of proteins or colloids can be size stabilized, such that as the concentration of ligand is increased, the number of clusters increases proportionally, but not their size. That is the case when there is a balance between an attractive short-range interaction between the ligands and a repulsive

long-range interaction between the clusters [9]. This could occur in the DNA-CD binding, where the attractive interaction responsible for bound-clusters formation is mediated by the elastic interaction with the DNA. Combined to that, an electrostatic repulsion between clusters may occur because of the cationic CD residual charge. Even though the solution Debye screening length is ~ 1 nm for $[\text{NaCl}] = 150$ mM, the resulting repulsion could be enough to stabilize the bound-clusters size along the DNA. Another possibility is the occurrence of a fast binding process in such a mass-conserving system, where many bound clusters are simultaneously formed along the DNA and rapidly consumes all ligands available. This process results in a narrow size distribution of clusters, which are randomly distributed along the DNA. Our experimental procedure, where the solution with ligands is injected into the DNA solution in an agitated way, may lead to this scenario, similar to a nucleation process of nanoparticles [10]. In addition to those pictures, a myriad of attractive, repulsive, and even oscillatory interactions between binding ligands can occur mediated by the DNA elastic interaction [11]. Independently of the physical scenarios, with the assumption that there are size stabilized bound clusters randomly distributed along the DNA, we propose below a two-sites quenched disorder statistical model which fits very well the persistence length data for the cationic CD-DNA and for the HU-DNA, providing quantitative values for the binding constants. Our model can be very valuable for a more detailed investigation of these binding scenarios, since one can monitor the variation of binding constants when changing the experimental conditions.

We describe the binding and formation of clusters by using the Hill cooperative model, which considers that n -ligand molecules bind to the substrate simultaneously, similar to a nucleation process [12]. To model the effect of the bound clusters on the DNA persistence length, we propose a two-sites quenched disorder model, whose detailed calculations are shown in the Supplemental Material 1 [13]. We define C_f and C_b as the free ligand and the bound ligand concentrations, respectively, such that $C_T = C_f + C_b$. Considering one site as the place occupied by one bound cluster, the ligand bound fraction is defined as $r = C_b/C_{bp}$ and the maximum bound fraction by r_{\max} . The probability for one site to be occupied is r/r_{\max} and will be given by a Hill distribution [12]. It is important to notice that r/r_{\max} is the same for bound molecules or for bound clusters. From this model, the effective persistence length is given by [13],

$$\frac{1}{A} = \frac{\left(1 - \frac{r}{r_{\max}}\right)^2}{A_0} + \frac{\frac{2r}{r_{\max}}\left(1 - \frac{r}{r_{\max}}\right)}{A_1} + \frac{\left(\frac{r}{r_{\max}}\right)^2}{A_2} \\ = \frac{1}{A_0} + \left(\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0}\right)\left(\frac{r}{r_{\max}}\right) + \left(\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2}\right)\left(\frac{r}{r_{\max}}\right)^2. \quad (1)$$

For a Hill cooperative process, the relation between the bound-ligand fraction r and the free ligand concentration C_f in solution is given by the Hill equation [12],

$$r = \frac{r_{\max} \left(\frac{C_f}{K_d}\right)^n}{1 + \left(\frac{C_f}{K_d}\right)^n} \equiv r_{\max} H(C_f), \quad (2)$$

where K_d is the equilibrium dissociation constant, n is the Hill exponent, and H stands for the normalized Hill function. For n smaller, equal, or larger than unity, one has negative, noncooperative, or positive cooperativity, respectively. The Hill exponent is a lower bound for the number of cooperating sites involved in the reaction. In our model the Hill exponent n is a measure of the average size of a bound cluster. In general, one does not know the free ligand concentration in solution, but only the total ligand concentration. Experimental techniques such as equilibrium dialysis, microcalorimetry, and optical techniques may allow one to estimate C_f by knowing C_T . Nevertheless, these techniques cannot be easily applied depending on the ligand. The method presented here dispenses additional techniques, therefore allowing one to determine the binding data and the chemical parameters by knowing only the change of the persistence length of the DNA-ligand complex as a function of total ligand concentration in solution C_T . Essentially, one can use $C_f = C_T - rC_{bp}$ and solve the Hill equation $r = r_{\max} H(C_T - rC_{bp})$. This equation has a single fixed-point solution, which can be obtained iteratively following the conditions established in the Supplemental Material 2 [14]. For the zeroth-order approximation,

$$H_0(C_f) \simeq H(C_T), \quad (3)$$

and for the first-order approximation,

$$H_1(C_f) \simeq H[C_T - C_{bp} r_{\max} H(C_T)]. \quad (4)$$

By plugging Eqs. (2) and (4) into Eq. (1), we have the expression below for the effective persistence length as a function of the total ligand concentration C_T ,

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + \left(\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0}\right) (H[C_T - C_{bp} r_{\max} H(C_T)]) + \left(\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2}\right) (H[C_T - C_{bp} r_{\max} H(C_T)])^2, \quad (5)$$

which can be fit to the data, with four adjustable parameters A_1 , A_2 , K_d , and n for fixed known A_0 and r_{\max} . Equation (5) is the main result of this Letter, allowing one to extract information about the binding data from pure mechanical measurements. For increasing values of C_{bp} , the convergence of the Hill equation might require more iteration loops, such that one has to use $H_{m+1} = H[C_T - r_{\max} C_{bp} H_m(C_T)]$ in Eq. (5).

In Fig. 2 we show our data for the DNA-cationic-CD and the fit using Eq. (5), with fixed values for $A_0 = 50$ nm and $r_{\max} = 0.67$. The later value comes from the diameter of β -CD (~ 1.5 nm) which covers three phosphates (~ 0.5 nm apart), so that the maximum fraction of bound

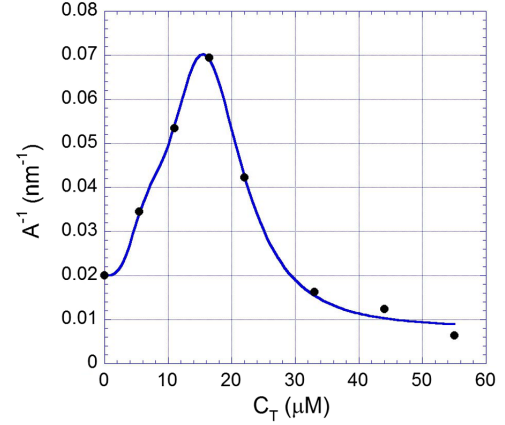


FIG. 2 (color online). Inverse persistence length as a function of cationic CD total concentration. The dots are the experimental points and the continuous curve is the fit using Eq. (5).

CD in each strand is $1/3$ and $2/3 \sim 0.67$ for double strand. The fit, which is considerably better with the first-order than with the zeroth-order approximation of Hill equation, is very good, robust, and returns the realistic parameter values with small uncertainties, $A_1 = 7.9 \pm 0.2$ nm, $A_2 = 125 \pm 20$ nm, $K_d = 9.6 \pm 0.3$ μ M, and $n = 3.45 \pm 0.15$. If one uses $r_{\max} C_{bp}$ as an additional free parameter, one obtains a slightly improved fit which returns $r_{\max} C_{bp} = 8.2 \pm 1.9$ μ M, but with increased uncertainties in the other parameters. For $r_{\max} = 0.67$, $C_{bp} = 12.2 \pm 2.8$ μ M, which is in agreement with the experimental value $C_{bp} = 11$ μ M. The two data points of Fig. 1 for $C_T > 55$ μ M were not included in the fitting analysis, since they correspond to DNA denaturation [5]. Our model in its present version does not include such an effect, since it is applicable only for double-strand DNA. This fitting procedure allows us to draw two important conclusions. First, the fact that we could not fit the data without any cooperativity ($n = 1$), implies that there is some cooperativity of the CD molecules binding to DNA. Second, the fact that we are able to fit the data with a single K_d indicates that this is a single binding process, with a single binding mode of CD. Considering this, the physical picture we propose is based on the fact that CD forms a stable host-guest complex with purine basis which flips out from dsDNA [15]. The flipped-out purine fits into the CD cavity, forms a stable complex, and locally denatures the DNA causing a local decrease of the persistence length. With the DNA decorated by CD, we expect that the local persistence length A_1 will be close, but higher than the persistence length of denatured dsDNA. The measured values for single-strand DNA persistence length are between 1.5–3 nm [16], so that for denatured dsDNA we expect a persistence length in the range from 3–6 nm. The value $A_1 = 7.9 \pm 0.2$ nm obtained is a little above this limit, as expected. The larger local persistence length, $A_2 = 125 \pm 20$ nm, is maybe due to CD-CD interaction,

or volume exclusion effects. The Hill exponent $n = 3.45 \pm 0.15$ obtained indicates that the DNA-CD interaction exhibits positive cooperativity, and suggests that the bound clusters are composed of three or four CD molecules. Denaturing is a positive cooperative process, such that when one DNA base pair is denatured by a bound CD molecule, the neighbor base pairs are more prone of denaturing, thus increasing the flipping-out rate of DNA basis and the formation of DNA-CD host-guest complex. Additional evidence for this picture is that for $C_T > 55 \mu\text{M}$ our data show an abrupt decrease in persistence length whose average value is $8.5 \pm 4.2 \text{ nm}$, which we associated to DNA denaturing [5]. Therefore, the value of the persistence length after the abrupt drop should really be close to A_1 . As can be seen in Eq. (1), as the bound ligand fraction approaches r_{max} , the persistence length approaches the larger value $A_2 > A_0$. However, near saturation $\sim 70\%$ of the DNA is covered by CDs, causing it to be structurally unstable, such that small external perturbations (like the pulling force itself) can denature the double-strand DNA, causing the observed abrupt change in (A) . On the other hand, the neutral CD forms a host-guest complex with DNA only very near the melting temperature of DNA ($\sim 61^\circ\text{C}$), where the basis flipping-out rate is larger [15]. In our experiments at room temperature, the probability of interaction is very small, which is reflected on the constancy of persistence length data. The cationic monovalent CD, otherwise, stays for a longer time closer to the negative charged phosphate groups of the dsDNA, thus increasing the probability of capturing a flipping-out basis and the forming of a stable host-guest complex.

In Fig. 3 is shown the data for the DNA-HU inverse persistence length as a function of total HU concentration C_T , measured using magnetic tweezers, by van Noort *et al.* [6]. The continuous curve is the fit using the zeroth-order

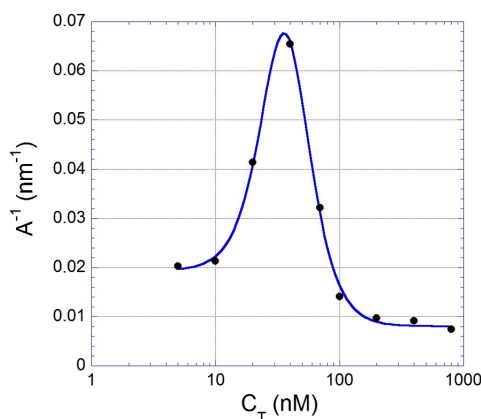


FIG. 3 (color online). Inverse persistence length as a function of HU total concentration. The dots are the experimental points from van Noort *et al.* [6] and the continuous curve is the fit using Eq. (5), with the zeroth-order approximation for the Hill equation.

approximation for the Hill equation [Eq. (3)], which is equivalent to set $r_{\text{max}}C_{bp} = 0$ in Eq. (5). The fit is very good, and suggests that $r_{\text{max}}C_{bp}$ is small, a few nM. For this fit A_0 was also left as a free parameter. The results are $A_0 = 51.7 \pm 3.6 \text{ nm}$, $A_1 = 8.2 \pm 0.2 \text{ nm}$, $A_2 = 125 \pm 15 \text{ nm}$, $K_d = 36.9 \pm 0.9 \text{ nM}$, and $n = 3.2 \pm 0.1$. The value for the Hill exponent $n = 3.2$ suggests that the bound clusters are composed of three or four HU molecules, which compares well with the estimate of four or five obtained in Ref. [7]. The C_{bp} is unknown for this data, because of the sample preparation procedure [17]. We also fit the data using Eq. (5) with fixed $A_0 = 52 \text{ nm}$ and $r_{\text{max}}C_{bp}$ as a free parameter. The fit is slightly better than the previous one and returns $r_{\text{max}}C_{bp} = (12 \pm 8) \text{ nM}$, confirming the robustness of our method. Since for the HU protein $r_{\text{max}} = 0.11$, then $C_{bp} = (109 \pm 73) \text{ nM}$. The other parameters remain about the same. In none of the articles which reported DNA-HU interaction the persistence length data have been fit to some model function to extract quantitative parameters.

In conclusion, we present a quenched disorder statistical model combined with a Hill-type equation able to reproduce the nonmonotonic behavior of the persistence length data. We derive a fitting function which fits the CD-DNA and HU-DNA data very well, confirming our assumption that these binding processes are mediated by size stabilized bound clusters. We obtain quantitative values for the binding constants and for the local changes in persistence length allowing us to propose a microscopic mechanism of how the CD-DNA interaction can change the entropic elasticity of DNA in a cooperative way.

The authors acknowledge helpful discussions with M. C. Barbosa, Y. Levin, U. Agero, L. G. Mesquita, E. B. Ramos, S. M. L. Silva, R. S. Schor, and support from the following Brazilian agencies: FAPEMIG, CAPES, CNPq, PRONEX-FACEPE, and INCT-Fluidos Complexos.

- [1] K. R. Chaurasiya, T. Paramanathan, M. J. McCauley, and M. C. Williams, *Phys. Life Rev.* **7**, 299 (2010).
- [2] G. D. Tavares, C. M. Viana, J. G. V. C. Araújo, G. A. Ramaldes, W. S. Carvalho, J. L. Pesquero, J. M. C. Vilela, M. S. Andrade, and M. C. de Oliveira, *Chem. Phys. Lett.* **429**, 507 (2006).
- [3] G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky, and A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7916 (1999).
- [4] J. F. Marko and E. D. Siggia, *Macromolecules* **28**, 8759 (1995).
- [5] M. S. Rocha, M. C. Ferreira, and O. N. Mesquita, *J. Chem. Phys.* **127**, 105108 (2007).
- [6] J. van Noort, S. Verbrugge, N. Goosen, C. Dekker, R. T. Dame, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6969 (2004).
- [7] D. Sagi, N. Friedman, C. Vorgias, A. B. Oppenheim, and J. Stavans, *J. Mol. Biol.* **341**, 419 (2004).

- [8] S.M. Rappaport and Y. Rabin, *Phys. Rev. Lett.* **101**, 038101 (2008).
- [9] A. Stradner, H. Sedgwick, F. Cardinaux, W. C. K. Poon, S. U. Egelhaaf, and P. Schurtenberger, *Nature (London)* **432**, 492 (2004).
- [10] *Nanoparticles: From Theory to Application*, edited by G. Schmid (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004).
- [11] J. Rudnick and R. Bruinsma, *Biophys. J.* **76**, 1725 (1999).
- [12] R. Phillips, J. Kondev, and J. Theriot, *Physical Biology of the Cell* (Garland Science, New York, 2008).
- [13] See Supplemental Material 1 at <http://link.aps.org/supplemental/10.1103/PhysRevLett.109.248103> for detailed calculation of the model.
- [14] See Supplemental Material 2 at <http://link.aps.org/supplemental/10.1103/PhysRevLett.109.248103> for convergence conditions of the method.
- [15] M. A. Spies and R. L. Schowen, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14049 (2002).
- [16] M. C. Murphy, I. Rasnik, W. Cheng, T. M. Lohman, and T. Ha, *Biophys. J.* **86**, 2530 (2004).
- [17] J. van Noort (private communication).

Lista de Figuras

- 2.1 Representação dos nucleotídeos presentes na molécula de DNA. Cada nucleotídeo é composto por três componentes: um açúcar, uma base e um fosfato. 8
- 2.2 Representação da ligação entre as duas fitas de DNA. As ligações de hidrogênio entre as bases A,T,G e C são representadas pelas linhas pontilhadas. 8
- 2.3 Representação da estrutura de dupla hélice do DNA. A distância entre os pares de base ao longo da hélice é de 0,34 nm. No caso dos fosfatos, a distância interfosfatos ao longo da hélice é de aproximadamente 0,5 nm, e entre as fitas é de 2,0 nm. 10
- 2.4 (a) Representação de um polímero semi-flexível preso por uma de suas extremidades e sujeito a uma força \vec{F} , aplicada na outra extremidade. (b) Representação de dois polímeros com comprimentos de persistência A diferentes. Quanto menor o valor de A , mais flexível é o polímero, apresentando muitas dobras. De forma contrária, quanto maior A , mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras. 13
- 2.5 Desenho esquemático da ciclodextrina modificada denominada 6 – monodeoxy – 6 – monoamino – β – ciclodextrina (*Am – beta – CD*). O derivado é formado pela substituição de um radical hidroxila por um grupamento amina (NH_2), conferindo à molécula uma carga +1e quando imersa em meio fisiológico. A molécula possui diâmetro interno de ~ 0.6 nm, diâmetro externo de ~ 1.5 nm e altura de ~ 0.8 nm. 15
-

2.6	(a) Força de espalhamento: parte da luz incidente é refletida na superfície da microesfera. Neste caso a força resultante tende a empurrar a microesfera para cima, na direção de propagação da luz. (b) Força de gradiente atuando em microesfera situada no centro do perfil gaussiano, porém acima do foco do laser. A força resultante tende a empurrar a esfera para a região do foco do laser. Figura retirada de [29].	18
2.7	(a) Desenho esquemático da montagem experimental de pinça óptica do Laboratório de Física de sistemas biológicos.	21
2.8	a) Configurações possíveis para as moléculas de DNA da amostra e b) Configuração desejada: a extremidade livre do DNA é presa à uma microesfera e a outra é presa à lamínula do microscópio. Após encontrar esta configuração, a molécula é estirada para todas as direções. Se o estiramento é o mesmo, temos um forte indício de que há apenas uma molécula presa à microesfera.	23
2.9	(a) Esquema mostrando como são as realizadas as medidas de estiramento de moléculas únicas de DNA. É importante notar que denotamos x como a posição do centro da microesfera no poço potencial e por x_{DNA} o estiramento da molécula de DNA. (b) F_{pinca} é a força que a pinça óptica exerce sobre a microesfera quando esta é afastada de sua posição de equilíbrio. No entanto, esta força é igual em módulo à força exercida pela molécula de DNA durante o estiramento.	24
2.10	(a) Intensidade versus estiramento e (b) Força versus estiramento para um DNA puro com o ajuste da equação de Marko e Siggia. Gráficos retirados de [29].	26
3.1	Comprimento de persistência em função da concentração total de ciclodextrina em solução. Os quadrados em azul representam os valores obtidos para a ciclodextrina monovalente e os pontos em vermelho representam os valores medidos para a ciclodextrina neutra.	30

-
- 3.2 (a) Comprimento de persistência em função da concentração total de HU em solução. As linhas são somente guias para os olhos. (b) Ilustração de um DNA condensado por unidades individuais de HU. (c) Ilustração de um filamento rígido de DNA ligado a dímeros de HU (esferas) de forma helicoidal. As figuras a e c foram retirados de [45]. 31
- 3.3 (a, b, c) Zooms de DNAs de 1000 pares de base (pb) incubados com uma concentração de 18 nM de HU (1 dímero por 92 pb). Em (d) temos a representação de como foi medido o ângulo de curvatura induzido pelas proteínas HU. (e) Esquema representando o modelo proposto por Rappaport *et al.*, retirado de [47]. 32
- 3.4 Inverso do comprimento de persistência em função da concentração total de ciclodextrina em solução. Os pontos representam os pontos experimentais e a curva contínua é o ajuste utilizando a equação 3.9. 40
- 3.5 (a) Representação de uma cadeia de DNA em sua configuração normal e (b) com uma base purina "flipada" formando um complexo de inclusão com a CD monovalente. A proporção entre os tamanho não foi mantida para melhor representação da ligação. 41
- 3.6 Inverso do comprimento de persistência em função da concentração total de proteína HU em solução. Os círculos representam os pontos experimentais de J. van Noort et al. [45] e a curva contínua é o ajuste utilizando a equação 3.9, com a aproximação de ordem zero para a equação de Hill. 44
-

-
- 4.1 (a) Imagem de hemácias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. No corpo humano uma hemácia dura de 90 a 120 dias e percorre cerca de 483 km dentro dos vasos sanguíneos. As células são produzidas em uma taxa de 2 milhões por segundo e seres humanos possuem cerca de 5 milhões de eritrócitos por mm^3 de sangue. Retirado de Nucleus Medical Media, Inc. 2009. (b) Ilustração do corte da seção reta de uma hemácia. (c) Ilustração da vista superior de uma hemácia. . . . 47
- 4.2 (a) Representação da bicamada lipídica das células sanguíneas e suas conexões ao citoesqueleto de espectrina. (b) Esquema do citoesqueleto das hemácias e sua estrutura bidimensional tipo triangular. Figuras retiradas do livro 'The molecular biology of the cell', Garland Science. 48
- 4.3 Representação dos três modos fundamentais de deformação de uma hemácia. Da esquerda para direita temos ilustrados a expansão/compressão, o cisalhamento e a curvatura de uma determinada área. 49
- 4.4 Figura de uma superfície descrita com a parametrização de Monge. Cada ponto \vec{r} da superfície é representado por $\vec{r} = [x, y, h(x, y)]$, onde a coordenada z é parametrizada pela função $h(x, y)$ 52
- 4.5 (a) Representação do citoesqueleto de hemácias como uma rede triangular de molas entrópicas. As molas são conectadas à bicamada lipídica por pontos discretos que limitam as flutuações de altura da bicamada. Para visualizar as molas entrópicas o desenho representa a visão interna do acoplamento bicamada/citoesquelto. (b) Representação de uma ligação membrana/citoesquelto quebrada devido à ação de ATPs, ocasionando um aumento temporário nas flutuações de altura da bicamada. 54
- 4.6 Representação das curvaturas principais de uma superfície. . . . 56
-

- 4.7 (a) Representação do acoplamento da bicamada lipídica e citoesqueleto, que passam a flutuar juntos. (b) Representação do acoplamento da curvatura local da membrana com o potencial de confinamento γ : quanto maior a curvatura local da membrana, maior o confinamento. 59
- 4.8 Calibração da câmera UNIQ para experimento com hemácias. Para um ganho de 20, 11db o parâmetro a da reta $N = a + bI$ é $a = -45 \pm 8$, atestando a linearidade da câmera. 62
- 4.9 Contraste médio $\langle C \rangle$ (pontos) em uma pequena área de curvatura constante de uma hemácia, em função da desfocalização z_f . Pelo ajuste $y = a + bx$ (linha contínua), vê-se que o contraste é linear para o intervalo de $[-2, 2]\mu\text{m}$ 63
- 4.10 Foto dos microscópios nos quais foram realizadas as medidas de MD. No estágio do Nikon TE300 (à esquerda) está acoplado um nanodeslocador (PZT) que controla a quantidade de desfocalização do sistema, e no Nikon Eclipse (à direita) tem-se um sistema de controle de foco (PFS Perfect Focus System) que mantém estável a posição focal desejada. Acoplado às saídas dos microscópios existem câmeras CCD (UNIQ UP1800 CL) e CMOS (SILICON VIDEO 642M) responsáveis pela captura de imagens. 64
- 4.11 Gráfico da calibração da taxa de captura da câmera CMOS. A flutuação quadrática média do contraste $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ é medida para diferentes taxas de captura entre 15 e 900 frames por segundo, para a qual a flutuação já saturou e é representada por $\langle (\Delta C_{max})^2 \rangle$. Pelos valores de $\frac{\langle (\Delta C)^2 \rangle}{\langle (\Delta C_{max})^2 \rangle}$ obtém-se que para uma taxa de 15 fps ser convertida em uma taxa de 333 fps, deve-se multiplicar o nível de cinza das imagens por 1.4. . . . 65
-

- 4.12 Observação de uma hemácia utilizando um microscópio desfocalizado. Os gráficos são do nível de cinza N em função do raio em micrôns, para a linha traçada sobre as imagens. Na letra a a desfocalização é positiva e portanto, o objeto de fase está localizado abaixo do plano focal da objetiva. Em b a desfocalização é negativa e portanto, a célula está acima do plano focal da objetiva. 66
- 5.1 (a) Acima, a imagem do nível de cinza de uma hemácia e abaixo o seu mapa de espessura. (b) Perfil de espessura da célula ao longo da linha horizontal representada no mapa de espessura. (c) Perfil radial de espessura da célula, obtido a partir de uma média angular da espessura ao longo de ρ (representado no nível de cinza). 70
- 5.2 Fluxograma do funcionamento de um algoritmo genético. . . . 72
- 5.3 Progressão do melhor indivíduo para uma dada execução do AG. Para melhor visualização o gráfico mostra o valor da função mérito Ψ^2 a cada 200 gerações. Após 92662 gerações retornou o melhor indivíduo com $\Psi^2 = 0,0095$. Neste caso, o AG leva cerca de 10 horas para convergir quando rodado em computadores com processadores *i7* e 32 GB de RAM. 74
- 5.4 Representação de um sistema hemácia + bolinha para determinação do índice de refração: h_{max} é a altura máxima da célula, z_{rbc} é o plano médio da célula e z_b é o plano médio da bolinha de poliestireno. A célula tem um índice de refração de $n + \Delta n$, onde n é o índice de refração da solução na qual está imersa. Além disto, z_f é a distância entre a lamínula e o plano focal da objetiva e h_1 e h_2 são as distâncias entre a lamínula e as membranas superior e inferior, respectivamente. 76
-

- 5.5 Representação de uma hemácia no referencial em que a origem do eixo z é definida como o plano médio da célula z_{rbc} , ou seja, o plano de contraste mínimo. Este novo referencial promove duas mudanças fundamentais: a quantidade de desfocalização é agora definida pela distância entre o plano z_{rbc} e o plano focal, e é chamada de Δf ; os perfis de altura h_1 e h_2 passam a ser medidos a partir do plano médio, e portanto, a espessura H da célula passa a ser definida como $H = h_1 + h_2$, para $|h_2| > 0$. Do lado direito da figura temos imagens do contraste de uma hemácia capturada acima ($\Delta f > 0$), sobre ($\Delta f = 0$) e abaixo do plano z_{rbc} ($\Delta f < 0$), respectivamente. Pelas imagens é fácil perceber que o contraste é mínimo quando o plano focal da objetiva coincide com o plano médio da célula, e que os contrastes acima e abaixo deste plano são invertidos. 77
- 5.6 (a-d) Perfil de espessura para quatro hemácias. (e) Reconstrução tridimensional da espessura da hemácia representada em d. (f) Perfil de espessura médio para as 42 hemácias analisadas. . . . 79
- 5.7 (a) Perfil radial completo do contraste médio sobre as 42 células analisadas e a indicação do efeito de difração (círculo em cinza). (b) Região do contraste médio $\langle C \rangle_m$ (pontos) usada para determinação dos perfis de altura e o ajuste retornado pelo AG (linha contínua). A área cinza indica a dispersão em relação à média dos ajustes. 81
- 5.8 (a) Perfil de altura h_1 (pontos) e h_2 (quadrados) retornados pelo AG e a dispersão (área cinza) relativa à média sobre as 42 hemácias. (b) Curvaturas κ_1 (pontos) e κ_2 (quadrados) para cada membrana. 82
- 5.9 Progressão do melhor indivíduo para uma dada execução do AG. O gráfico mostra o valor da função mérito Ψ^2 para cada geração. Após 1247 gerações retornou o melhor indivíduo com $\Psi^2 = 1,45 \times 10^{-10}$. Neste caso, o AG leva cerca de 20 horas para convergir quando rodado em computadores com processadores *i7* e 32 GB de RAM. 86
-

- 5.10 (a) Perfil radial dos três comportamentos observados para o dado de flutuação quadrática média do contraste ($\langle (\Delta C)^2 \rangle$). As curvas 1, 2 e 3 foram obtidas para hemácias de uma mesma amostra, indicando que esta variabilidade é natural das células. (b) Perfil de espessura associado a cada tipo de curva em (a). Como pode ser visto, existe uma relação entre forma e flutuação de contraste. 87
- 5.11 (a) Média sobre todos os perfis de flutuação quadrática média das 42 hemácias analisadas. Este são os dados a serem ajustados pelo AG. A área cinza ao redor da curva indica a dispersão em relação à média e reflete a variabilidade natural das células. (b) Média dos ajustes retornados pelo AG: os pontos representam o dado de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ e a linha contínua representa a média sobre os 10 ajustes finais. A dispersão em relação à média dos ajustes é ilustrada pela área cinza do gráfico. Como pode ser visto, o uso do AG com a equação 5.12 e espectro de potência proposto por Nir Gov *et al.* retorna um bom ajuste do dado experimental. 88
- 5.12 Perfis radiais das flutuações em altura obtidos para cada membrana pelo AG. Como geralmente utilizado na literatura, apresentamos o valor referente à raiz quadrada de $\langle (\Delta u)^2 \rangle$, $u_{1(rms)}$ e $u_{2(rms)}$. Os pontos em azul são relativos à membrana superior das células e os quadrados vermelhos são relativos à membrana inferior. Os símbolos vazios representam as flutuações $u_{1(rms)}$ e $u_{2(rms)}$ corrigidas por um fator $\sqrt{4 - 3 \cos^2(\theta)}$ devido à inclinação e movimento lateral da célula. 89
-

- 5.13 Representação das duas componentes da flutuação total u_{total} da membrana superior de uma hemácia: u_T na direção da superfície da membrana e u_N normal à superfície, que é a flutuação em altura. Na figura temos também representado o eixo z da nossa montagem experimental, que é o eixo ao longo do qual coletamos as flutuações. As flutuações obtidas pelo AG e representadas na figura 5.12 são as flutuações u_z , que é a projeção em z da flutuação total u_{total} . Pela figura b tiramos a correção para as flutuações u_z 90
- 5.14 Gráficos da espessura total $h(r)$ e das flutuações em altura $(\Delta h)^2(r)$ de 40 células publicados em [16]. Um análise criteriosa assinala que o aumento das flutuações até o raio de $\sim 2 \mu\text{m}$ é muito suave, e pequeno quando comparado à dispersão em relação à média (área cinza), questionando a afirmação de que as flutuações são "realçadas e altamente localizadas na região convexa externa das células". 93
- 5.15 Perfis radiais para os módulos de curvatura $k_{c1}(a)$ da membrana de cima e $k_{c2}(b)$ da membrana de baixo. Os símbolos cheios representam o módulo sem correção e os símbolos vazios o módulo corrigido. 94
- 5.16 (a) Representação de uma membrana plana e quadrada, de lado l_0 e espessura e . (b) A membrana é curvada pelas extremidades e assume a forma de uma calha de raio de curvatura R e ângulo θ 95
- 5.17 Perfis radiais para a espessura e_1 da membrana de cima (azul) e e_2 da membrana de baixo (vermelho), obtidos com os respectivos módulos k_c corrigidos. 96
- 5.18 Perfis radiais para os potenciais de confinamento $\gamma_1(a)$ da membrana de cima e $\gamma_2(b)$ da membrana de baixo. Os símbolos cheios representam o potencial sem correção e os símbolos vazios o potencial corrigido. 97
-

5.19 (a) Termo de curvatura $(2H^2 - K)$ para a membrana de cima.
 (b) Dados de γ_1 (pontos) e tentativas de ajustes com $\gamma_g = 2K_A(2H^2 - K)$ (linha contínua) e $\gamma_e = 4K_A(2H^2 - K)$ (linha pontilhada). 98

5.20 Ilustração do envelope esférico que garante a unidade da membrana composta. A forma do envelope lembra um pneu e possui como curvaturas principais $\frac{1}{H_{max}/2}$ e $\frac{1}{R_h}$, onde H_{max} e R_h são a espessura máxima e o raio da hemácia, respectivamente. 100

5.21 Ajuste dos dados experimentais de γ_1 utilizando a função $\gamma = 4K_A(2H^2 - K) + 2K_A\left(\frac{4}{H_{max}^2} + \frac{1}{R_h^2}\right)$. O ajuste retorna um potencial de confinamento $K_A = (7, 8 \pm 0, 1) \times 10^3 k_B T / \mu m^2$. . 101

5.22 (a) Termo de curvatura $(2H^2 - K)$ para a membrana de baixo.
 (b) Dados de γ_2 (pontos) e tentativa de ajuste com a equação indicada na figura (linha contínua). Claramente o ajuste não é bom, indicando que um outro potencial deve existir. 102

5.23 (a) Dados $\gamma_2 - 17 \times 10^3 [4(2H^2 - K) + 2(\frac{4}{H_{max}^2} + \frac{1}{R_h^2})]$ (pontos) e ajuste por uma gaussiana (linha pontilhada). 103

5.24 Perfis radiais para as tensões superficiais σ_1 (a) para a membrana de cima e σ_2 (b) para a membrana de baixo. Os símbolos cheios representam a tensão sem correção e os símbolos vazios a tensão corrigida. 104

5.25 (a) Ilustração da área da circunferência de raio r definida pela região da hemácia aderida ao substrato. (b) Ilustração de uma membrana presa por uma armação, delimitando uma região de aderência de raio r 105

A.1 a) Arco de curva representando uma corda "biológica". b) Entre as posições \hat{t}_1 e \hat{t}_2 o arco é aproximado por um segmento de círculo de raio R_c , definindo um ângulo $\Delta\theta = \Delta s / R_c$, onde Δs é o tamanho do segmento. 111

A.2 A corda de comprimento L_c e momento de inércia da seção transversal I encontra-se inicialmente esticada. A corda sofre uma deformação e adquire a forma de um círculo de raio R_c . A energia de curvatura é dada por $E_f = \kappa_f L_c / 2R_c^2$ 113

- A.3 a) Conjunto de configurações para um filamento flexível. Para um dado k_f a energia de curvatura do filamento aumenta a medida que sua forma se torna mais contorcida. b) Se o filamento é aproximado pela seção de um círculo, o ângulo subtendido pelo arco de tamanho s é o mesmo que o ângulo de mudança de direção do vetor tangente t ao longo do arco. 114
- D.1 Esquema de um objeto observado por um microscópio invertido com óptica corrigida no infinito e iluminação do tipo campo claro. O objeto é posicionado no plano focal da objetiva onde é iluminado por feixe de raios paralelos. Ao passar pelo objeto a luz é espalhada ou transmitida, e coletada pela objetiva que conjuga sua imagem no infinito. Para que a imagem seja conjugada no plano imagem, onde a câmera está acoplada, usa-se a lente de tubo. 125
- D.2 (a) Ilustração de um problema de espalhamento óptico para representação do espectro angular de um campo. Um campo incidente E_0 é espalhado por um objeto, resultando em um campo espalhado E_e . Para determinarmos o espectro angular deste campo definimos um eixo z arbitrário e avaliamos a transformada de Fourier bidimensional em um plano transversal a este eixo. (b) Representação das coordenadas cartesianas e dos vetores de onda. 126
- D.3 Esquema do microscópio desfocalizado: objeto está desfocalizado por uma distância z_f em relação ao plano focal; as lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano imagem. 128
- D.4 Esboço de um objeto de fase de única interface fina e plana: \vec{E}_0 é o campo elétrico incidente; $h(\vec{\rho})$ é a amplitude de altura do objeto; n e $n + \Delta n$ são os índices de refração do meio por onde o campo elétrico se propaga antes e depois da interface; $\vec{\rho}$ é o vetor posição no plano (x, y) perpendicular à direção z de propagação do campo elétrico. 131
-

-
- D.5 (a) Esquema do microscópio desfocalizado para observação de um objeto de fase espesso: objeto está desfocalizado de uma pequena distância z_f . No entanto, cada ponto do perfil de espessura do objeto está a uma distância particular $z_f - h(\vec{\rho})$ do plano focal. 135
- D.6 Representação de uma hemácia observada por um microscópio desfocalizado. A célula é representada por duas interfaces h_1 e h_2 que englobam um meio com índice de refração $n + \Delta n$. Reproduzindo a amostra, a célula está imersa em um meio com índice de refração n , e h_1 representa a membrana livre e h_2 representa a membrana aderida ao substrato (lamínula). Na figura o plano focal está situado acima da célula, a uma distância z_f da lamínula. 139
-

Referências Bibliográficas

- [1] **K. Chaurasiya et al.** 2010 Biophysical characterization of DNA binding from single molecule force measurements *Phys. of Life Rev.* **7** 299
 - [2] **G. D. Tavares et al.** 2006 Development and physico-chemical characterization of cyclodextrin-DNA complexes loaded liposomes *Chemical Physics Letters* **429** 507
 - [3] **L. Siman** 2007 Estudo da interação DNA-ciclodextrina com a técnica de pinçamento óptico com aplicação em terapia gênica *Dissertação de Mestrado DF UFMG*
 - [4] **L. Siman et al.** 2012 Quantitative assessment of the interplay between DNA elasticity and cooperative binding of ligands. *Phys. Rev. Lett.* **109** 24
 - [5] **S. Tuvia, S. Levin, A. Bitler, and R. Korenstein** 1998 Mechanical Fluctuations of the Membrane-Skeleton are Dependent on F-actin ATPase in Human Erythrocytes *J. Cell Biol.* **141** 1551
 - [6] **N. Gov, A. Zilman and S. Safran** 2003 Cytoskeleton confinement of red blood cell membrane fluctuations *Phys. Rev. Lett* **90** 228101
 - [7] **N. Gov and S. Safran** 2005 Red-blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects *Biophys. J.* **88** 1859
 - [8] **S. Safran** 2007 Physics of cell elasticity, shape and adhesion *Physica A* **352** 171
-

-
- [9] **N. Gov** 2007 Active elastic network: Cytoskeleton of the red blood cell *Phys. Rev. E* **75** 011921
- [10] **T. Auth, S. Safran and N. Gov** 2007 Fluctuations of coupled fluid and solid membranes with application to red blood cells *Phys. Rev. E* **76** 051910
- [11] **B. Rappaz et al.** 2008 Comparative Study of Human Erythrocytes by Digital Holographic Microscopy, Confocal Microscopy and Impedance Volume Analyzer *Cytometry* **73** 895-903
- [12] **B. Rappaz et al.** 2009 Spatial Analysis of Erythrocytes Membrane Fluctuation by Digital Molographic Microscopy, *Blood Cells, Mol. and Dis.* doi:10.10016
- [13] **D. Boss et al.** 2012 Spatially-Resolved Eigenmode Decomposition of Red Blood Cells Membrane Fluctuation Questions Role of ATP in Flickering, *PLoS ONE* **7** 8
- [14] **G. Popescu et al.** 2008 Imaging Red Blood Cell dynamics by quantitative phase microscopy, *Blood Cells, Mol. Dis.* **41**, 10.
- [15] **Y. Park et al.** 2010 Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes, *Proc. Nat. Ac. of Sc.* **107** 6731
- [16] **Y. Park et al.** 2010 Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane *Proc. Nat. Ac. Sc.* **107** 1289
- [17] **Y. Park et al.** 2011 Measurement of the nonlinear elasticity of red blood cell membranes. *Physical Review E* **83(5)** 051925
- [18] **Giuseppe Glionna** 2009 Tomografia de Hemácias *Tese de Doutorado DF UFMG*
- [19] **Camilla Karla Q. B. O. Martins** 2008 Aplicação de Técnicas Ópticas em amostras biológicas *Dissertação de Mestrado DF, UFMG*
- [20] **Ulisses Moreira Silveira Andrade** 2010 Microscopia de Desfocalização e seus limites de validade: um estudo experimental *Dissertação de Mestrado DF UFMG*
-

-
- [21] **U. Agero, C. H. Monken, C. Ropert, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita** 2003 Cell Surface Fluctuations Studied with Defocusing Microscopy *Physical Review E* **67** 051904
- [22] **J. C. Neto, U. Agero, D. C. P. Oliveira, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita** 2005 Real-time Measurements of Surface Dynamics on Macrophages and the Phagocytosis of Leishmania Parasites *Experimental Cell Research* **303** 207
- [23] **J. C. Neto, U. Agero, D. C. P. Oliveira, R. T. Gazinelli, and O. N. Mesquita** 2006 Measuring Optical and Mechanical Properties of a Living Cell with Defocusing Microscopy *Biophysics Journal* **91** 1101
- [24] **L. G. .Mesquita, U. Agero, and O. N. Mesquita** 2006 Defocusing Microscopy: An approach for Red Blood Cell Optics *Applied Physics Letters* **88** 133901
- [25] **G. Glionna, C. K. Oliveira, L. G. Siman, H. W. Moyses, D. M. U. Prado, C. H. Monken, and O. N. Mesquita** 2009 Tomography of fluctuating biological interfaces using defocusing microscopy *Applied Phys. Lett.* **94** 193701
- [26] **L. Siman et al.** 2013 Shape reconstruction and height fluctuation of pahse objects using DM: an application to red blood cells *em fase de submissão*
- [27] **L. V. Yakushevich** 1998 Nonlinear physics of DNA *Jonh Wiley and Sons, England*
- [28] **J. D. Watson e F. H. C. Crick** 1953 The structure of DNA *Cold spring harbor symposia on quantitative biology* **18** 123
- [29] **M. S. Rocha** 2008 Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação DNA-fármacos. *Tese de doutorado DF UFMG*
- [30] **M. C. Ferreira** 2007 Estudo da Transição Entrópica do DNA Induzida por Intercalantes Utilizando a Técnica de Pinçamento Óptico e Espectroscopia de Autocorrelação de Intensidades *Dissertação de Mestrado DF UFMG*
-

-
- [31] **C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia e S. Smith** 1994 Entropic elasticity of λ -phage DNA *Science* **265** 1599
- [32] **Jonh F.Marko et al.** 1995 Stretching DNA *Macromolecules* **28** 8759
- [33] **C. Bustamante et al.** 2000 Single-molecule studies of DNA mechanics *Nucleic Acid* **10** 279
- [34] **Rudolf Podgornik** 2006 DNA off the Hooke *Nature Nanotechnology* **1** 100
- [35] **A. Ashkin** 1997 Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 4853
- [36] **G. D. Tavares et al.** 2006 Development and physico-chemical characterization of cyclodextrinDNA complexes loaded liposomes *Chem. Phys. Lett.* **429** 507
- [37] **C. O'Driscoll et al.** Cyclodextrin Constructs for Delivery of Genotherapeutic Agents *Business Briefing: Pharmatech2002*
- [38] **P. Nelson** 2004 Biological Physics - Energy, information, life. *W. H. Freeman and Company, New York*
- [39] **A. Ashkin** 1970 Acceleration and trapping of particles by radiation pressure *Phys. Rev. Lett.* **24** 156
- [40] **K. C. Neumann et al.** 2004 Optical trapping *Rev. Sci. Instrum.* **75(9)** 2787
- [41] **D. Boal** Mechanics of the Cell 2002 *Cambridge University Press, New York*
- [42] **A. Mazolli et al.** 2003 Theory of trapping forces in optical tweezers *Proc. R. Soc. Lon. A* **459(2040)** 3021
- [43] **R. S. Dutra et al.** 2012 Absolute calibration of optical tweezers including aberrations *Appl. Phys. Lett.* **100** 131115
-

-
- [44] **G. V. Shivashankar et al.** 1999 RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: The role of ATP hydrolysis *PNAS* **96** 7916
- [45] **J. van Noort et al.** 2004 Dual architectural roles of HU: Formation of flexible hinges and rigid filaments *PNAS* **101** (18) 6969
- [46] **D. Sagi et al.** 2004 Modulation of DNA conformations through the formation of alternative high-order HU-DNA complexes *J. Mol. Biol.* **341** 419
- [47] **S. M. Rappaport and Y. Rabin** 2008 Model of DNA Bending by Cooperative Binding of Protein *Phys. Rev. Lett.* **101** 038101
- [48] **A. Stradner et al.** 2004 Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids *Nature* **432** 492
- [49] Nanoparticles: From Theory to Application 2004 *Gunther Schmid, Wiley-VCH Verlag*
- [50] **A. V. Hill** 1910 The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves *J. Physiol.* **40**
- [51] **W. N. James** 1997 The Hill equation revisited: uses and misuses. *The FASEB J.* **11**
- [52] **M. S. Rocha, M. C. Ferreira, and O. N. Mesquita** 2007 Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules *J. Chem. Phys.* **127** (10) 105108
- [53] **M. A. Spies, and R. L. Schowen** 2002 The trapping of a spontaneously "flipped-out" base from double helical nucleic acids by host-guest complexation with beta-cyclodextrin: the intrinsic base-flipping rate constant for DNA and RNA *J. Am. Chem. Soc.* **124** 14049
- [54] **J. Hoon Kim et al.** 2007 Stretching and immobilization of DNA for studies of protein- DNA interactions at the single-molecule level *Nanoscale Res Lett* **2** 185
-

-
- [55] **J. Rudnick and R. Bruinsma** 1999 DNA-protein cooperative binding through variable-range elastic coupling *Biophys. J.* **76** 1725
- [56] **R. Phillips, J. Kondev, and J. Theriot** 2008 Physical Biology of the Cell *Garland Science*
- [57] **M. C. Murphy et al.** 2004 Probing Single-Stranded DNA Conformational Flexibility Using Fluorescence Spectroscopy *Biophys. J.* **86** 2530
- [58] **J. van Noort** private communication January 2012
- [59] **J. -F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bnsimon e V. Croquette** 1997 pH-Dependent specific binding and combing DNA *Biophysical Journal* **73** 2064
- [60] **O. Kratky and G. Porod** 1949 Rontgenuntersuchung geloster Fadenmolekule *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.* **98** 1106
- [61] **B. Alberts et al.** 1994 Molecular Biology of the cell *Garland Publishing, New York*
- [62] **K. Ritchie** 1998 Probing nanoscale adhesion and sturcture at soft interfaces *PhD Thesis Univerdity of British Columbia*
- [63] **O. Farago** 2011 Mechanical surface tension governs membrane thermal fluctuations *Phys. Rev. E* **84** 051914
- [64] **R. Waugh and E. Evans** 1979 Thermoelasticity of red blood cell membrane. *Biophy. Journal* **26** 115
- [65] **G. Lenormand et al.** 2001 Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton *Biophy. Journal* **81** 43
- [66] **Y. Kim et al.** 2012 Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances em Blood Cell, An Overview of Studies in Hematology 9
- [67] **F. Brochard and J. F. Lennon** 1975 Frequency Spectrum Of Flicker Phenomenon In Erithrocytes *Le Journal De Physique* **36** 1035
-

-
- [68] **S. Safran** 1994 Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces, and Membranes *Addison-Wesley Publishing Company*
- [69] **H. Deuling e W. Helfrich** 1976 Red blood cell shapes as explained on the basis of the curvature elasticity *Biophysical Journal* **16**
- [70] **J. W. Goodman** 2002 Introduction to Fourier Optics *McGraw-Hill Co., Inc.*
- [71] **C.H. Monken** Teoria da Difração através da Óptica de Fourier *Notas de aulas do curso de Óptica - DF - UFMG*
- [72] **J.D. Jackson** 1925 Classical Eletrodynamics *John Wiley & Sons, Inc.*
- [73] **J. R. Koza** 1998 Genetic programming *The MIT Press, Cambridge*
- [74] **K. Keren et al.** 2011 Actin disassembly clock determines shape and speed of lamellipodial fragments *Proc. Nat. Aca. Sci.* **108** 20394
- [75] **Y. Fung and P. Tong** 1968 Theory of sphering of red blood cells *Biophys. J.* **18** 175
- [76] **O. Farago** 2008 Membrane fluctuation near a plane rigid surface *Phys. Rev. E* **78** 051919
- [77] **D. Gingell et al.** 1987 Direct measurements of cell detachment force on single cells using a new electromechanical method *Journal of Cell Science* **87** 519
- [78] **O. Farago and P. Pincus** 2003 The effect of thermal fluctuation on Schulman area elasticity *Eur. Phys. J. E.* **11** 399
- [79] **C. L. Curl et al.** 2006 Single Cell Volume Measurment by Quantitative Phase Microscopy (QPM): A case Study of Erythrocytes Morphology *Cellular Physiology and Biochemistry* **17** 193
- [80] **M. S. Rocha et al.** 2013 DNA interaction with Actinomycin D: mechanical measurements reveal the details of the binding data *J. Chem. Chem. Phys.* **15** 11070
-

- [81] **M. S. Rocha et al.** 2013 DNA Interaction with Hoechst 33258: Stretching Experiments Decouple the Different Binding Modes *J. Chem. Phys. B* **117** (24) 7292
- [82] **B. Coste et al.** 2012 Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels *Nature* **483** 176
- [83] **R. Zarychanski et al.** 2012 Mutation in mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis *Blood* **120** 1908
- [84] **M. C. Brain et al.** 2004 Evidence for a mechanosensitive calcium influx into red cells *Blood cells, Molecules and Diseases* **32** 349
- [85] **B. Martinac** 2012 Mechanosensitive ion channels: An evolutionary and scientific tour de force in mechanobiology *Channels* **6:4** 1
-