
**Caracterização de parâmetros biomecânicos de
hemácias via Microscopia de Desfocalização: Imagem
tridimensional total e elasticidade da membrana**

Paula Magda Roma da Lapa

Caracterização de parâmetros
biomecânicos de hemácias via
Microscopia de Desfocalização:
Imagem tridimensional total e
elasticidade da membrana

Paula Magda Roma da Lapa

Orientador: Prof. Dr. Oscar Nassif de Mesquita

Co-orientador: Prof. Dr. Ubirajara Agero

Co-orientador: Dra. Lívia Siman Gomes

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

Belo Horizonte

Agosto de 2014

Aos meus familiares, em especial aos meus amados pais, Ademir Paulo (em memória) e Magda.

Sumário

Agradecimentos	viii
Resumo	xi
Abstract	xiii
1 Introdução	1
2 Hemácia: Estrutura da Membrana Composta e Elasticidade	7
2.1 Formas da Hemácia	8
2.2 Estrutura da membrana das Hemácias	11
2.2.1 Propriedades Elásticas da Membrana	13
2.3 Modelos de Elasticidade da Membrana de Hemácias	17
3 Metodologia Experimental	21
3.1 Montagem Experimental	21
3.2 Preparo das Amostras	22
3.3 Homogenização do nível de cinza da imagem	24
3.4 Calibrações	25
3.4.1 Calibração do Nível de Cinza	25
3.4.2 Calibração da Taxa de Captura	27
4 Microscopia de Desfocalização Aplicada em Hemácias	29
4.1 Contraste MD	29
4.1.1 Resolução Axial da MD	33
4.1.2 Perfil de Espessura - $H(\vec{\rho})$	34
4.1.3 Métodos para determinar o raio da hemácia via MD	37

4.1.4	Métodos para obter o perfil de altura da membrana de hemácias	38
4.1.5	Métodos para a determinação do Índice de Refração de Hemácias	45
4.2	Flutuação Quadrática Média MD	48
4.2.1	Métodos para determinar flutuação em altura e parâmetros elásticos das membranas	48
5	Resultados e Discussões	53
5.1	Análise do Contraste MD	53
5.1.1	Perfil de Espessura - $H(\vec{\rho})$ e Volume	53
5.1.2	Perfil de Altura de Membranas de hemácias em solução isotônica, hipotônica e hipertônica via AG	54
5.1.3	Perfil de Altura de Membranas de hemácias em solução isotônica, hipotônica e hipertônica via método de Assimetria	58
5.2	Análise da Flutuação Quadrática Média do contraste MD $< \Delta C^2 >$	65
5.2.1	Flutuação de altura das membranas	65
5.2.2	Parâmetros elásticos das membranas	71
6	Considerações Finais	89
A	Microscopia de Desfocalização	96
A.1	Modelo do microscópio óptico invertido	97
A.2	Propagação do Espectro Angular pelos Elementos de um Microscópio	99
A.2.1	Propagação Livre do Espectro Angular	99
A.2.2	Propagação do Espectro Angular através de uma Lente Delgada	101
A.2.3	Propagação do Espectro Angular através de um Objeto de Fase	103
A.3	Propagação do Espectro Angular pelos Elementos de um Microscópio Desfocalizado	105
A.4	Campo Elétrico para um Microscópio Desfocalizado	107

A.5	Contraste de objetos de fase em um microscópio desfocalizado	109
A.5.1	Contraste de objeto de fase fino e plano	109
A.6	Flutuação Quadrática Média do Contraste $\langle \Delta C^2(\vec{\rho}) \rangle$	114
Lista de Figuras		124
Referências Bibliográficas		132

Agradecimentos

◇ Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por ser meu abrigo durante as tempestades, pelo dom da vida e por seu eterno amor que sempre me conduziu à caminhos mais altos.

◇ Agradeço aos meus queridos pais, Ademir Paulo e Magda, por todo amor, dedicação, carinho e ensinamentos que foram oferecidos a mim e à Carol. Por sempre acreditarem que poderíamos mudar a nossa história de vida, mesmo quando as circunstâncias não eram favoráveis. Meu querido Papito, apesar de você não estar mais presente entre nós, a sua semente foi plantada e estar florescendo. O elo que nos liga é eterno! Minha mamys linda, obrigada por ser essa mulher visionária que sempre nos incentivou a trilhar os caminhos do saber e a lutar pela realização dos nossos sonhos. Esta conquista é de vocês, meus amados pais e amigos.

◇ Agradeço a minha querida irmã Carolina Magda, que sempre foi minha melhor amiga em todos os momentos e minha parceira de estudo durante vários finais de semana na UFMG. Sou muito grata por seus conselhos, orações, amor incondicional e também pelas chatices. Agradeço a Deus por tê-la em minha vida.

◇ Agradeço ao meu querido esposo Rodrigo Lapa, por todo apoio, incentivo e compreensão. Seu amor, amizade, carinho e nossas trocas de experiências sobre a vida e sobre a Física, contribuíram para que este momento fosse concretizado.

◇ Agradeço aos professores do Departamento de Física da UFAM, em especial aos professores Abraham Cohen (em memória), José Ricardo Sousa e Eduardo Cotta, pelos excelentes cursos ministrados e por todo trabalho que tem sido desenvolvido em prol da divulgação e desenvolvimento da Física na região Amazônica.

◇ Agradeço ao meu orientador, Oscar Nassif, por sua orientação, paciência, incentivo, segurança transmitida, maturidade, amizade e pelas várias discussões sobre a Física e a vida. Por ser um profissional sempre dedicado ao desenvolvimento da ciência em nosso País e à construção do saber de seus alunos. Vou guardar com carinho, os momentos em que você chegava em nosso laboratório com as suas teorias fenomenais, com aquele olhar de quem descobriu algo e quer compartilhar... ele realmente adora o que faz.

◇ Agradeço ao meu co-orientador, Ubirajara Agero, mais conhecido como Bira, por sua orientação, por todo ensinamento transmitido, apoio, paciência, amizade, pelas sugestões nas montagens dos experimentos, na construção dos programas e nas análises dos dados. Obrigada por ser acessível e por sempre está disposto a compartilhar o conhecimento. Sua contribuição foi essencial para a conclusão desta tese.

◇ Agradeço a minha co-orientadora, Lívia Siman, por sua orientação, paciência, incentivo, dedicação e amizade. Uma pessoa sempre disposta a ajudar o próximo, a compartilhar seu conhecimento e trocar experiências. Além de uma ótima orientadora e colaboradora, uma excelente amiga. Obrigada pela ajuda nas discussões dos resultados e pelas sugestões e correções relativas à escrita da tese.

◇ Agradeço ao grupo de Física Biológica da UFMG, o qual tive o privilégio de fazer parte. Muito obrigada pela acolhida!!! Agradeço aos meus queridos colegas: Oscar, Bira, Lívia (Lili ou mana), Ana, Bárbara (nossa querida Babi), Ulisses (Uebinha), Patrícia (Paty) e Felipe (da Engenharia elétrica - UFMG) por todos os momentos prazeros que vivemos, pela amizade, pela troca de conhecimento, pelas conversas informais, enfim, por tudo.

◇ Agradeço à Shirley por cuidar tão bem da biblioteca e sempre disposta a ajudar os alunos. À Marluce e à Juliana pela ajuda na secretaria da pós. Ao Seu João e ao Thiago, da oficina mecânica, pela ajuda na fabricação das peças. Agradecimentos a todos os funcionários do Departamento de Física, que trabalham na parte administrativa, na limpeza e segurança, por todo apoio dado e pela boa convivência. Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram diretamente e indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

◇ Agradeço às agências financiadoras: Conselho Nacional de Pesquisa e

Desenvolvimento (CNPq), Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Apoio a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), Instituto de Fluidos Complexos e Aplicações (INFCx) e ao PRONEX-FACEPE.

Resumo

O objetivo geral desta tese foi o desenvolvimento de novos métodos experimentais e computacionais em microscopia óptica, em particular, utilizando a técnica de Microscopia de Desfocalização (MD) no estudo do contraste de objetos de fase (objetos transparentes) quando visualizados em um microscópio óptico desfocalizado operando em campo claro, o qual denominamos de contraste MD. A MD foi desenvolvida no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos da UFMG e possibilita a medida direta da curvatura local de objetos de fase e a discriminação das interfaces que compõem estes objetos. Como objetivos secundários, a tese visou empregar os métodos desenvolvidos na caracterização de parâmetros morfológicos e elásticos de hemácias, os quais são influenciados diretamente pela ação de agentes químicos e físicos e por várias doenças hematológicas. Para tanto, a metodologia desenvolvida foi empregada em 25 hemácias sujeitas a soluções com diferentes osmolalidades: isotônica - 300 mOsm/kg, hipotônica - 200 mOsm/kg e hipertônica - 400 mOsm/kg. Adicionalmente, outras formas de hemácias (estomatócito e equinócito) foram avaliadas. Os métodos foram desenvolvidos a partir de dois grupos de medidas experimentais: contraste e flutuação do contraste MD de hemácias. A partir do contraste MD foi possível a determinação de parâmetros relacionados à morfologia da hemácia, tais como: raio, área superficial, volume, índice de esfericidade, índice de refração, perfil de espessura, perfil de altura de cada superfície da membrana (bicamada lipídica/citoesqueleto) e a imagem 3D total da hemácia. Através destes, as alterações na superfície das membranas superior (livre) e inferior (em contato com o substrato) das hemácias, tanto devido às diferentes soluções nas quais foram imersas quanto à adesão da célula ao substrato, foram aferidas. A resolução axial da MD nos permitiu obter imagens das superfícies das hemácias separadas por uma dis-

tância de até 300 *nm*. A partir das flutuações do contraste MD de hemácias, foi possível a determinação dos perfis radiais das flutuações em altura e dos comportamentos radiais dos parâmetros elásticos: módulo de curvatura (k_c), tensão superficial (σ) e potencial de confinamento (γ) para cada superfície ao longo da extensão da célula. Estes resultados permitiram uma discussão dos aspectos físicos das membranas de hemácias, incluindo novas interpretações para estes parâmetros.

Abstract

The general aim of this thesis was the development of new experimental and computational methods in light microscopy, in particular, using Defocusing Microscopy (DM) technique in the study of contrast of phase objects (transparent objects) when observed by an optical defocused microscope operating in bright field, which we call contrast MD. The MD was developed at the Physics Biological Systems Laboratory of UFMG and allows the direct measurement of local curvature of phase objects and the discrimination of interfaces that compose these objects. As secondary objectives, the thesis aimed to employ the developed methods in the characterization of morphological and mechanical changes of red blood cells (RBCs), which are influenced directly by the action of chemical and physical agents and various hematologic diseases. Therefore, the methodology was applied in 25 red blood cells subjected to different osmolality solutions: isotonic - 300 mOsm/kg, hypotonic - 200 mOsm/kg and hypertonic - 400 mOsm/kg. Additionally, other forms of red blood cells (stomatocytes and echinocyte) were evaluated. The methods were based on two groups of experimental measurements: DM contrast and contrast fluctuation of red blood cells. From the DM contrast it was possible to determine parameters related to the red blood cell's morphology, such as radius, surface area, volume, sphericity index, refractive index, thickness, shape profile of each surface-membranes (lipid bilayer/cytoskeleton), besides the image 3D total of the cell. Through these, the changes in the upper (free) and lower (in contact with the substrate) surface-membranes of red blood cells, either due to different solutions in which they were immersed or due the cell's adhesion to the substrate, were measured. The DM axial resolution allowed us to obtain images of the red blood cells' surfaces separated by a distance of down to 300 nm. From DM contrast fluctuations of red

blood cells it was possible to determine the radial profiles of fluctuations in height and the radial behaviors of the elastic parameters: bending modulus (k_c), surface tension (σ) and confining potential (γ) for each surface along the cell extension. These results allowed a discussion of physical aspects of red blood cells membranes, including new interpretations for these parameters.

Capítulo 1

Introdução

As células são altamente sensíveis e receptivas aos seus ambientes externos, como é o caso quando são expostas à soluções com pH e osmolalidades* não fisiológicas, por exemplo. A resposta celular a estas diferentes condições altera as suas propriedades elásticas e morfológicas, as quais podem nos fornecer informações tanto sobre a estrutura da membrana plasmática quanto do citoesqueleto e seus acoplamentos. O citoesqueleto é uma estrutura bastante dinâmica, responsável pela motilidade das células, que se rearranja e se desfaz mediante estímulos externos, para desempenhar suas funções em quimiotaxia, fagocitose, entre outras funções. Além disso, muitas patologias podem ser caracterizadas por alterações nestas propriedades e, portanto, na biomecânica das células [1–3].

Como veremos, a hemácia, que é uma célula constituinte do sangue, é uma célula interessante de ser estudada, tanto devido à simplicidade da sua membrana quanto a facilidade de sua extração. Além disso, a caracterização da sua biomecânica em seu estado de equilíbrio nos permite estudar desde os processos básicos de funcionamento da célula (por exemplo, processo pelo qual a hemácia regula o seu volume) até os mecanismos envolvidos na adaptação de espécies a fim de garantir a sua sobrevivência. Por exemplo, na referência [4], é enfatizada a importância da forma da hemácia na sobrevi-

*A concentração de soluções biológicas é expressa como osmolalidade, o número de partículas ativas (íons ou moléculas sem carga) presentes em 1 kg de solução. A unidade de osmolalidade é expressa em osmoles por quilograma de água (osmol/kg ou Osm/kg). Em solução fisiológica a osmolalidade encontra-se entre 290-300 miliosmóis/kg (mOsm/kg).

vência de um camelo. Segundo o autor, este animal permanece ativo mesmo após uma perda de 30% de sua massa corporal e, nesta condição de desidratação, pode beber, em poucos minutos, uma quantidade suficiente de água para reidratar-se. Esta rápida captação pelo sangue de uma quantidade de água tão grande, causaria ruptura da membrana das hemácias na maioria dos animais. As hemácias do camelo, no entanto, possuem uma forma elíptica achatada ao invés de um disco bicôncavo como é o caso das hemácias humanas. Esta forma permite que este tipo 'anormal' de hemácia seja mais resistente à ruptura da membrana causada pelo desequilíbrio osmótico, garantindo assim a sobrevivência deste animal.

Hemácias, eritrócitos ou glóbulos vermelhos, tem sido usados como sistemas modelo no estudo de motilidade e acoplamento bicamada lípidica e citoesqueleto, principalmente devido à sua simplicidade. Em sua forma adulta, a hemácia é uma célula anucleada e sem organelas, e cujo citoesqueleto, constituído basicamente por espectrina, não apresenta polimerização de filamentos e nem motores moleculares [5]. No entanto, a membrana da hemácia é um sistema composto por um citoesqueleto (que dá rigidez ao cisalhamento) e por uma bicamada lípidica (que promove a rigidez à curvatura). As mudanças observadas em sua biomecânica devido ao desequilíbrio osmótico, por exemplo, refletem tanto a sua morfologia quanto a elasticidade da sua membrana quando tensionada ou relaxada devido ao influxo ou efluxo de água, respectivamente.

Como consequência das propriedades elásticas, as hemácias exibem flutuações de membrana (em espessura ou em altura) de forma espontânea, denominadas de *flickering*, mensuradas em escala nanométrica. Inicialmente, estas flutuações em espessura foram interpretadas como sendo de origem puramente térmica, sendo descritas apenas pela energia de curvatura da membrana [6]. No entanto, resultados experimentais [7,8] tem mostrado que as flutuações em espessura podem ser influenciadas por processos metabólicos ativos controlados pela ação de adenosina trifosfato (ATP). Em virtude do acoplamento bicamada/citoesqueleto ser feito basicamente por filamentos de actina, os quais podem ser desfeitos e refeitos pela ação de ATP, introduz um mecanismo ativo de transformação de energia química em trabalho mecânico, capaz de aumentar as flutuações de espessura na superfície das

hemácias em comparação com as flutuações puramente térmicas. Assim, as hemácias, além de sua grande importância em Biologia e Medicina, são um sistema modelo interessante para o estudo da Física de fenômenos de não-equilíbrio [9–14]. Embora o estudo de flutuações em espessura da membrana de hemácias tenha mais de 30 anos de pesquisa, a origem do fenômeno ainda é bastante controversa na literatura.

Todos os eritrócitos de mamíferos saudáveis possuem a forma discóide quando não estão sujeitos a nenhum tipo de estresse externo. Nesta forma, os eritrócitos possuem uma membrana flexível para lhes conceder uma deformação elástica reversível ao passarem por pequenos capilares ($2 - 3 \mu m$) durante o processo de microcirculação. Vários fatores são responsáveis por alterar a sua forma de equilíbrio, tais como: o próprio processo de microcirculação, envelhecimento da célula, deficiência na regulação da pressão osmótica sanguínea, ação de fármacos e doenças [1–3]. Alterações em suas propriedades geométricas e mecânicas são muitas das vezes um bom indicativo de mudanças que ocorrem na composição molecular e organizacional da célula. Como essas mudanças ocorrem na escala nanométrica e micrométrica, novas ferramentas tem sido desenvolvidas para quantificar estas propriedades, tais como microscopia de força atômica, aspiração por micropipeta e pinças ópticas [15,16], as quais fornecem informações quantitativas dos módulos de cisalhamento e de curvatura da célula. Adicionalmente, existem técnicas baseadas em microscopia óptica, como por exemplo a MD, capazes de investigar de forma não-invasiva as propriedades biomecânicas da célula.

A microscopia óptica tem sido uma excelente ferramenta para pesquisas no campo da Biologia e Biomedicina e embora outras técnicas tais como microscopia eletrônica ofereçam uma melhor resolução espacial, o microscópio óptico ocupa um papel importante dentro deste campo multidisciplinar devido a facilidade do manuseio do microscópio óptico e por seu potencial em obter imagens de células vivas de forma não-invasiva. No campo da microscopia óptica tradicional, a imagem de objetos de fase (objetos transparentes, como as hemácias) é geralmente obtida com microscópios que operam nas configurações de Contraste de Fase ou Nomarsky [17–19]. No entanto, mesmo para objetos com índice de refração uniforme estas técnicas apresentam dificuldades para a obtenção de perfis precisos de espessura. Em decorrer

disto, surgiram novas abordagens conhecidas como técnicas de microscopia quantitativa de fase, tais como DPM (*Diffraction Phase Microscopy*) e DHM (*Digital Holograph Microscopy*) [20–22]. Estas técnicas obtêm o perfil e as flutuações em espessura das hemácias, mas não são capazes de discriminar o perfil e as flutuações de cada superfície da célula (livre e em contato com o substrato) como a MD [23–25]. Recentemente, Kim *et al.* [26] utilizando uma técnica de desfocalização em um microscópio de contraste de fase, com iluminação branca, em conjunto com um módulo capaz de mensurar de forma quantitativa a fase em cada ponto da imagem, obteve imagens 3D de células. A técnica possui resolução transversal de 350 nm e resolução axial de 900 nm , e portanto, não pode resolver superfícies separadas por uma distância axial menor que 900 nm , que é o caso de muitos tipos de hemácias. Notavelmente, o método desenvolvido nesta tese, o qual utiliza a técnica MD consegue resolver superfícies de membranas de hemácias separadas por uma distância axial de $\sim 300\text{ nm}$ [25]. Uma outra técnica que é usada no estudo de flutuações de membrana e na investigação de mecanismos de adesão da célula ao substrato e que também foi usada em hemácias é a técnica de RICM (*Reflection Interference Contrast Microscopy*) [27], que utiliza a interferência entre a luz refletida na superfície de baixo da hemácia e a refletida na lamínula para fornecer informações sobre a dinâmica do padrão de interferência e da separação entre essas superfícies. Sendo assim, esta técnica também apresenta desvantagem em relação a MD, já que não observa a superfície livre. Neste aspecto, esta tese tem como um dos objetivos demonstrar as vantagens que a MD possui em relação às técnicas convencionais de microscopia óptica e outras mais recentes que têm sido usadas no estudo da forma e flutuações da membrana de hemácias.

Como parte inicial deste trabalho, medidas do contraste e das propriedades geométricas e a caracterização dos perfis radiais das flutuações do contraste de hemácias normais (solução isotônica - 300 mOsm/kg) foram realizadas. A fim de testarmos os métodos propostos, também foram realizados experimentos com hemácias sujeitas à osmolalidades de 200 mOsm/kg e 400 mOsm/kg , que geram tanto alterações na forma quanto na mecânica das hemácias [28–30]. As medidas experimentais foram realizadas com a técnica de Microscopia óptica de Desfocalização [23,24,31–38], que será exposta re-

sumidante no Apêndice A. Uma versão detalhada pode ser vista na tese de Giuseppe Glionna [36]. No capítulo 2, '*Hemácia: Estrutura da Membrana Composta e Elasticidade*' faremos uma descrição da composição, forma e elementos básicos ligados à elasticidade da membrana da hemácia. Além disso, discutiremos os modelos elásticos mais importantes, dentre os quais, encontra-se o modelo utilizado na tese. No capítulo 3, '*Metodologia Experimental*' iremos detalhar os métodos experimentais, os quais envolvem a montagem experimental, preparo das amostras, homogenização do nível de cinza da imagem e as calibrações do sistema experimental. No capítulo 4, '*Microscopia de Desfocalização Aplicada em Hemácias*', iremos detalhar os procedimentos metodológicos desenvolvidos para as análises do contraste e da flutuação quadrática média do contraste MD, bem como os programas utilizados e desenvolvidos para a extração das informações de forma e elasticidade da membrana da célula. No capítulo 5, '*Resultados e Discussões*', apresentaremos os resultados dos métodos desenvolvidos, que foram aplicados em 25 hemácias sujeitas a soluções (ou meio de imersão) com diferentes osmolalidades: hipotônica - 200 mOsm/kg, isotônica - 300 mOsm/kg e hipertônica - 400 mOsm/kg. Os resultados serão divididos em duas partes. Na primeira parte, serão expostos os resultados obtidos a partir dos métodos desenvolvidos para o contraste MD, os quais caracterizam a morfologia da célula: raio, volume, área superficial, índice de esfericidade, índice de refração, perfil de espessura, perfil de altura de cada superfície de membrana e a imagem 3D total da hemácia. Na segunda parte, serão expostos os resultados obtidos a partir dos métodos desenvolvidos para as medidas da flutuação quadrática média do contraste MD, os quais estão relacionados à elasticidade da membrana da célula: os perfis radiais das flutuações em altura para cada membrana e os perfis radiais dos parâmetros elásticos (k_c , σ e γ) para cada membrana (bicamada+citoesqueleto) ao longo da extensão da célula. Nesta tese, também empregamos a metodologia desenvolvida no doutorado de *Siman* [24] na análise da flutuação do contraste de 42 hemácias normais (solução isotônica- 300 mOsm/kg). Esta metodologia deu origem ao artigo "*Shape reconstruction and height fluctuation of phase objects using Defocusing Microscopy: an application to red blood cells*" [38], no qual Paula Magda é co-autora. Esta metodologia será empregada na análise da flutua-

ção quadrática média do contraste MD de hemácias em duas novas soluções: hipotônica (200 mOsm/kg) e hipertônica (400 mOsm/kg). Nesta tese pretendemos testar a modelagem física desenvolvida e utilizada na análise dos parâmetros elásticos da membrana de hemácias normais nestas duas novas formas de hemácias geradas por alterações da osmolalidade do meio no qual estão imersas. O entendimento físico envolvido nestes casos mais simples nos permitirá num futuro próximo, estender os métodos aqui propostos em problemas mais complexos, como por exemplo, a caracterização da ação de fármacos e doenças na biomecânica da célula.

No capítulo 6 '*Considerações Finais*' apresentaremos as conclusões e perspectivas deste trabalho. Por fim, anexamos o artigo publicado na revista *Applied Physics Letters*, expondo a metodologia e os resultados gerados a partir do contraste MD de hemácias sujeitas à diferentes condições osmóticas e a matéria que saiu no *MIT Technology Review* sobre o nosso artigo.

Capítulo 2

Hemácia: Estrutura da Membrana Composta e Elasticidade

As hemácias, constituem o tipo mais comum de célula sanguínea e representam o meio principal do organismo de fornecer oxigênio (O_2) aos tecidos que compõem o corpo e, em menor grau, o transporte de dióxido de carbono (CO_2). O fato de serem células sem núcleo e sem organelas e gerarem ATP por mecanismos anaeróbicos, faz com que não haja consumo do oxigênio que transporta, tornando-as eficientes no transporte de oxigênio [4]. O citoplasma destas células é rico em hemoglobina, uma biomolécula complexa, composta de quatro grupos *heme* que possuem ferro. Cerca de um terço de cada eritrócito consiste de hemoglobina. Os valores normais de hemoglobina em um humano adulto são de 12 a 18 gramas por 100 mililitros de sangue [5]. Os átomos de ferro presentes nesses grupos *heme* são capazes de ligar-se com o oxigênio para formar a oxi-hemoglobina e são responsáveis pela cor vermelha viva do sangue. Além disso, a hemoglobina também consegue transportar uma parte do CO_2 produzido no corpo de volta aos pulmões, para ser eliminado.

As hemácias desenvolvem-se na medula óssea e possuem um tempo de

vida limitado de cerca de 100 – 120 dias no corpo antes de seus componentes serem reciclados por macrófagos. Elas são produzidas na velocidade de 2 milhões por segundo, e com isso temos cerca de 5 milhões de célula por mm^3 de sangue, sob condições normais [39]. Aproximadamente um quarto das células presentes no corpo humano são hemácias.

As hemácias normais apresentam a forma de um disco bicôncavo (formato discóide), figura 2.1 (a), o qual permite que a célula passe por várias deformações mantendo sua área superficial constante. Adicionalmente, este formato assegura a rápida difusão de CO_2 para as moléculas de hemoglobina, colocando-as a uma distância não maior que $1 \mu m$ da superfície celular. Além disso, as hemácias normais e maduras de humanos adultos possuem um volume corpuscular médio de $90 \mu m^3$, com uma concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de 33% e área superficial de $136 \mu m^2$. Em casos de situação patológica, por exemplo, esferocitose hereditária, a área superficial destas hemácias pode alcançar $98 \mu m^2$ com um CHCM de 40% [40].



Figura 2.1: Imagem obtida por microscopia eletrônica. Em condições normais, uma hemácia possui o formato de disco bicôncavo e tem como principal função o transporte de oxigênio através do corpo. Foto: Dave McCarthy and Annie Cavanagh/Wellcome Trust.

2.1 Formas da Hemácia

Um eritrócito humano típico tem um diâmetro de $6.2 \mu m$ a $8.2 \mu m$ e uma espessura máxima de $2-2.5 \mu m$, sendo muito menor do que a maioria das ou-

tras células humanas. Estas células sanguíneas podem aumentar de volume para uma forma esférica contendo $150 \mu m^3$, sem ruptura da membrana [41]. Os desvios do estado normal alteram a relação área superficial/volume e podem mudar consideravelmente as características biomecânicas destas células.

Além da sua forma normal discóide, a hemácia pode assumir uma variedade de outras formas distintas [42]. Nesta tese utilizamos soluções hipotônica (200 mOsm/kg), isotônica (300 mOsm/kg) e hipertônica (400 mOsm/kg) para gerar perfis de hemácias com formato quase esférico, normal e com perfil bicôncavo mais pronunciado, respectivamente. Adicionalmente, hemácias na forma de alguns casos de estomatócitos e equinócitos (figura 2.2) também foram utilizadas. É conhecido experimentalmente que a forma das hemácias pode ser sistematicamente modificada usando dois grupos de reagentes químicos. O primeiro grupo de reagentes (adição de colesterol, alto pH (> 7.4), diminuição de ATP, solução hipertônica e drogas anfipáticas aniônicas) induz uma série de perfis conhecidos como equinócitos. Enquanto que o segundo grupo de reagentes (diminuição de colesterol, solução hipotônica, baixo pH (< 7.4) e drogas anfipáticas catiônicas) produz uma sequência de estomatócitos [43]. Uma tentativa de explicar as mudanças das formas das hemácias é através da hipótese de bicamada acoplada, proposta por Sheetz *et al.* [44]. De acordo com Sheetz, o primeiro grupo de reagentes leva a uma expansão da camada externa da membrana em relação à camada interna, a qual produz uma tendência de formar estruturas convexas, como as da forma equinócita. Alternativamente, qualquer expansão da camada interna, relativa à externa, favorece a formação de cavidades côncavas, como as da forma de estomatócito. Estas formas de hemácias também são peculiares à ação de diversas doenças hereditárias causadas por distúrbios no metabolismo de sais e água [45].

O papel do soro sanguíneo é manter a osmolalidade do meio fisiológico, e então controlar o fluxo de água circulante nas hemácias, permitindo que as hemácias mantenham a sua forma normal. Este controle passivo consiste na difusão de moléculas de água (solvente), predominantemente do meio com maior para o com menor concentração destas moléculas, através de uma membrana semipermeável. Esse processo é chamado de osmose, e é facilmente demonstrado pela imersão de uma célula em uma solução contendo um soluto

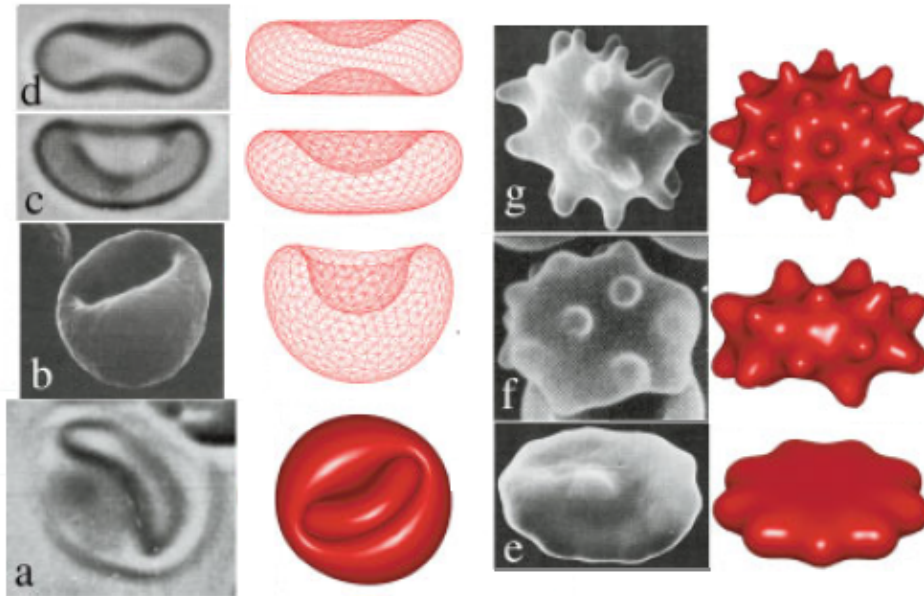


Figura 2.2: Comparação lado-a-lado de imagens experimentais e perfis correspondentes obtidos por métodos computacionais de hemácias na forma de estomatócitos III, II e I (a - c), discóide (d) e equinócitos I, II e III (e - g). Figura retirada de [43].

não-penetrante (NaCl) em uma concentração diferente do que aquela presente dentro da hemácia [46].

Quando as hemácias são colocadas em solução hipotônica, ou seja, soluções com baixa concentração de soluto, a célula incha devido à entrada de água por osmose e, em casos extremos, ocorre a ruptura da membrana gerando hemácias *ghosts*[¶]. Em outro extremo, quando as hemácias são imersas em solução hipertônica, a pressão osmótica será maior fora do que no interior da célula, fazendo com que a água no interior da célula seja drenada para o exterior da mesma, deixando a célula encolhida e sua membrana com protuberâncias. Uma vez que a concentração interna de soluto se iguala a concentração externa, os fluidos internos e externos são isotônicos, e o mo-

[¶]São o resultado direto do processo chamado de hemólise ou ruptura da membrana do eritrócito, que pode ser obtido por lise osmótica. Este processo faz com que a hemoglobina seja filtrada para o exterior da célula, deixando-a com o aspecto de um *ghost* [4].

vimento de água ocorre para dentro ou para fora da célula [46]. Na figura (2.3), é ilustrado os efeitos osmóticos na alteração da forma da hemácia.

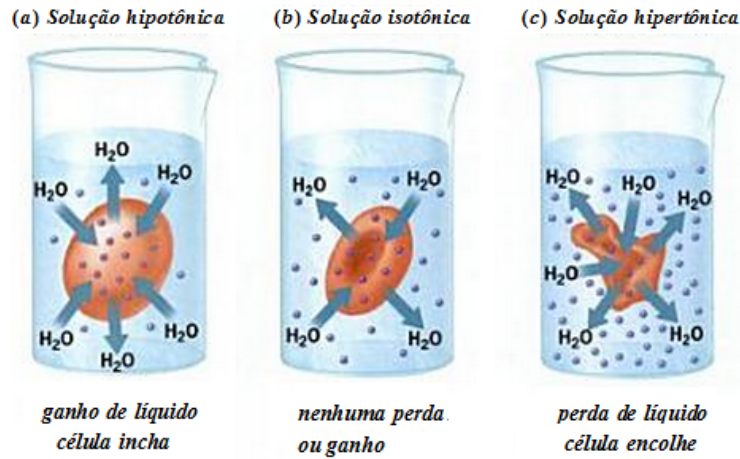


Figura 2.3: Efeitos na forma de hemácias devido às diferenças na concentração de solutos em lados opostos da membrana da célula. Partindo da esquerda para a direita, retrata-se a forma das hemácias quando imersas em solução hipotônica, isotônica e hipertônica, respectivamente. Figura retirada de [46].

2.2 Estrutura da membrana das Hemácias

As membranas plasmáticas de um modo geral apresentam-se como barreiras seletivas que asseguram a composição interna constante das células, através do controle da transferência ativa e passiva de inúmeras moléculas. Estas membranas têm um sistema estrutural complexo, citoesqueleto, que define tanto a forma da célula, como sua mobilidade, deformabilidade e o transporte de macromoléculas. Entre os diferentes constituintes da membrana, apresentam-se receptores envolvidos em funções complexas que permitem a comunicação entre as células, reconhecimento imunológico e fenômenos de adesão celular [47]. O fato de serem desprovidas de núcleo e organelas, tornam a membrana das hemácias num modelo primário para estudo de membrana plasmática celular animal.

A membrana eritrocitária, como as milhares de outras células do organismo humano, é essencialmente constituída de lipídeos e proteínas. A he-

mácia não é um simples reservatório contendo hemoglobina. Os lipídeos e proteínas estão dispostos na superfície da hemácia de forma bastante complexa. Esta membrana consiste em uma bicamada fosfolipídica, que forma a barreira entre dois compartimentos líquidos, intra e extracelular e de um citoesqueleto, que desempenha um papel crucial no formato bicôncavo da célula. Em conjunto, a bicamada lipídica e o citoesqueleto possuem uma espessura de cerca de $\simeq 50 \text{ nm}$ [48].

A bicamada lipídica com aproximadamente $\simeq 5 \text{ nm}$ de espessura oferece pouca resistência ao cisalhamento, mas contribui para a resistência à flexão e ajuda a manter a área superficial da célula, enquanto que, o citoesqueleto das hemácias que as capacita a suportarem a tensão de cisalhamento sofrida ao fluírem por vasos estreitos do sistema circulatório. Conforme apresentado na figura 2.4(b - c), a estrutura desse citoesqueleto é bidimensional do tipo triangular formada principalmente por filamentos de espectrina de $\simeq 200 \text{ nm}$ que se ligam através de filamentos de actina. A espectrina é uma molécula cilíndrica longa, fina e flexível, com cerca de 100 nm de comprimento e 5 nm de comprimento de persistência. As moléculas de espectrina comportam-se como molas entrópicas, de tamanho $L \sim 80 - 100 \text{ nm}$ e com uma constante de mola efetiva $4 \times 10^{-6} \text{ J/m}^2$ [10]. Sendo assim, tanto a bicamada quanto o citoesqueleto são essenciais à sobrevivência da célula, permitindo que a hemácia passe por deformações sem perder sua integridade, sua forma e elasticidade [5,49].

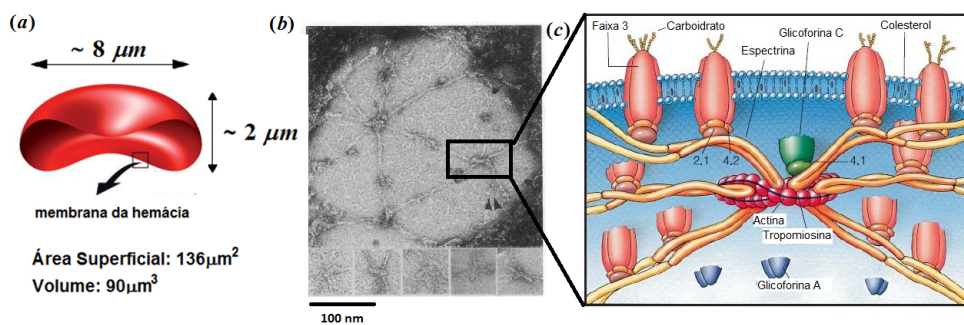


Figura 2.4: (a) Morfologia da célula sanguínea saudável, forma geométrica discóide. (b) rede de espectrina obtida por microscópio eletrônico. (c) Esquema da membrana das hemácias e as suas proteínas. Figura retirada de [30,45].

As proteínas da membrana das hemácias são classificadas em três grupos de acordo com as suas propriedades funcionais na estrutura da membrana. O primeiro grupo é representado pelas proteínas do citoesqueleto (espectrinas, proteína 4.1 e actina), as quais estão associadas com a forma do citoesqueleto. O segundo grupo é representado pelas proteínas integrais (banda 3 e glicoforinas, etc.), as quais estão presentes na bicamada lípídica. O terceiro grupo são as proteínas de ancoragem (anquirina e proteína 4.2), as quais são responsáveis pela conexão entre as proteínas integrais e o citoesqueleto.

Alterações na densidade das proteínas que formam a membrana eritrócitária são conhecidas por resultarem em alterações morfológicas celulares e desordens na deformabilidade das hemácias [40]. O termo deformabilidade representa a habilidade das hemácias recuperarem a sua forma normal, sem fragmentações ou perda da sua integridade, após sofrerem distorções e deformações. A deformabilidade das hemácias pode ser determinada por três fatores: (1) geometria da célula (forma bicôncava), (2) a viscosidade do citoplasma, determinado pela concentração de hemoglobina no interior das células e, (3) as propriedades viscoelásticas intrínsecas da membrana da hemácia (ou capacidade de deformação da membrana) [50]. A deformabilidade das hemácias representa a chave para diagnosticar e entender a ação de doenças hematológicas que afetam a sua principal função: o transporte de oxigênio e dióxido de carbono para todo o corpo.

2.2.1 Propriedades Elásticas da Membrana

A viabilidade da célula ao passar pelo processo de circulação depende das propriedades mecânicas da membrana (bicamada+citoesqueleto), já que o citoplasma da célula é composto essencialmente por hemoglobina. Devido a espessura da membrana (bicamada + citoesqueleto) ser da ordem ou até menor que o tamanho (80 – 100 *nm*) da rede de espectrina que forma o citoesqueleto, podemos tratá-la por um modelo bidimensional contínuo. Para suportar grandes tensões, a membrana deve ser resistente o bastante para prevenir fragmentações da célula e ser flexível o bastante para fluir através dos capilares, tais requisitos podem ser caracterizados fenomenologicamente por três módulos elásticos [51] (tensão = módulo de elasticidade \times defor-

mação): módulo de dilatação/compressão K_A , módulo de cisalhamento μ e módulo de curvatura k_c . Estes módulos estão associados a três deformações básicas: expansão/compressão de área, cisalhamento e curvatura da membrana, conforme ilustrado na figura 2.5(a - c). A um nível microscópico, cada um destes módulos representa propriedades específicas ou conjuntas da componente estrutural da membrana, bicamada lipídica e/ou citoesqueleto da membrana.

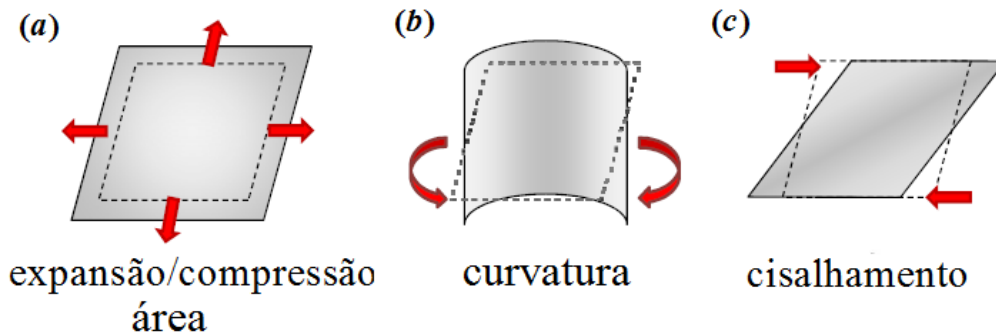


Figura 2.5: Representação dos três modos de deformação da membrana. Em (a) expansão/compressão, (b) curvatura e em (c) cisalhamento da membrana. Figura retirada de [30].

Módulo de Expansão de área. Como ilustrado na figura 2.5(a), quando a membrana está sujeita a uma tensão isotrópica resultante, \bar{N} , sofre uma expansão/compressão em área. Este fenômeno é representado por uma simples equação linear:

$$\bar{N} = K_A \left(\frac{\Delta A}{A} \right), \quad (2.1)$$

onde ΔA é a mudança em área devido às forças aplicadas (normais a superfície da membrana), A a área de referência e K_A representa o módulo de expansão/compressão. O módulo K_A reflete a energia elástica envolvida em uma expansão/compressão isotrópica da superfície da membrana [30]. Este tipo de deformação possui um correspondente custo de energia, o qual penaliza a mudança de área da membrana relativa a algum valor de referência (estado de equilíbrio) e que pode ser escrito em termos da densidade superficial de energia livre f_t como [49,52]

$$f_t = \frac{K_A}{2} \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2. \quad (2.2)$$

Na literatura os valores reportados para K_A de hemácias podem ser divididos em dois grupos: (1) resultantes de medidas de flutuações da membrana, nas quais encontra-se um K_A dentro do intervalo $1 - 40 \mu N/m$ [29,53] e, (2) valores reportados pela técnica de aspiração por micropipeta, que estão na faixa de $200 - 300 mN/m$ [54]. A aparente inconsistência entre os diferentes experimentos pode ser entendida notando que há um aumento na rigidez da membrana, caracterizado por um K_A maior (redução da área em excesso), quando as flutuações da membrana são suprimidas pela tensão aplicada com a técnica de aspiração por micropipeta [29]. Como veremos, este resultado é evidente em nossos dados quando a membrana é tensionada devido ao choque osmótico hipotônico.

Módulo de Cisalhamento. As deformações da membrana devido às tensões de cisalhamento podem ser grandes o suficiente, de tal forma que uma simples relação linear entre força e extensão não é suficiente para descrever o comportamento da membrana. Somada a isto, a alta resistência da membrana a dilatação de área leva a postular que a membrana mantém a sua densidade superficial constante durante a deformação devido ao cisalhamento, isto é, que a sua superfície bidimensional é incompressível. Muitas das abordagens existentes na literatura a cerca deste tipo de deformação, são baseadas nesta hipótese. Somente em 1994 [55], surgiram evidências experimentais que esta hipótese é uma simplificação do verdadeiro comportamento celular, e que este tipo de deformação produz mudanças locais na densidade superficial do citoesqueleto da membrana. Temos então, que 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 módulo de cisalhamento μ é descrito como,

$$N_S = \frac{\mu}{2} \left(\frac{\lambda_1}{\lambda_2} - \frac{\lambda_2}{\lambda_1} \right) \quad (2.3)$$

onde N_S é a tensão de cisalhamento e $\lambda_{1/2}$ são as razões principais da extensão da membrana ao longo do raio da célula [56]. Na literatura, os valores reportados para μ estão dentro do intervalo de $6 - 10 \mu N/m$ para experimentos envolvendo diferentes técnicas como pinças ópticas [57] e flutuações da membrana [29].

Módulo de Curvatura. Embora a membrana da hemácia seja muito

fina, ela possui uma elevada resistência à mudança de sua área superficial. Esta propriedade, combinada com a espessura finita da membrana, exibe uma pequena resistência a flexão. Esta resistência caracteriza-se em termos do módulo de curvatura da membrana. O módulo de curvatura k_c é determinado pela energia necessária para deformar a membrana a partir da sua curvatura original. O módulo de curvatura de uma membrana 2D é descrito como

$$M = k_c(C_1 + C_2 - C_0) \quad (2.4)$$

onde M representa o momento fletor envolvido na curvatura e C_1 , C_2 e C_0 são as curvaturas principais e espontânea, respectivamente [30]. A curvatura C_0 define a curvatura de equilíbrio da membrana. No caso de haver assimetrias devido à composição lipídica de uma ou das duas camadas lipídicas, temos que $C_0 \neq 0$, que é o caso das hemácias. No caso de membranas planas, $C_0 = 0$.

Em 1973 Wolfgang Helfrich [58] propôs uma expressão para a densidade de energia de curvatura de biomembranas como sendo,

$$E_b = \frac{1}{2}k_c(C_1 + C_2 - C_0)^2 + \frac{1}{2}\overline{k}_c(C_1C_2), \quad (2.5)$$

onde k_c é o módulo de curvatura e \overline{k}_c é o módulo elástico Gaussiano. A partir desta expressão, Helfrich foi capaz de prever diferentes formas de hemácias e de vesículas lipídicas artificiais. Para uma membrana constituída somente de bicamada lipídica, k_c é determinado pela composição química dos lipídios e apresenta valores diversos entre $5 - 35 k_B T$ [49], 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 $3 - 50 k_B T$. Medidas com micropipetas e análise de flutuações da membrana na borda da célula reportam valores para k_c próximos a $50 k_B T$ [8,30], enquanto medidas de flutuações de membrana, fora da borda, reportam valores da ordem de $10 k_B T$ [6,29,53]. Segundo Park *et al.* [29], estes valores mais altos para k_c podem ser atribuídos a não-linearidades elásticas da membrana. No entanto, como veremos nesta tese, nossos dados indicam uma variação de k_c ao longo da extensão da hemácia, o que acreditamos está relacionado à variação da espessura da membrana. No caso dos valores do módulo \overline{k}_c , sabe-se experimentalmente pouco sobre esta quantidade, o que em parte está

relacionado ao teorema *Gauss-Bonnet* [59]. De acordo com este teorema, a integral de superfície sobre a quantidade $\int(C_1C_2)dA$ é uma constante para superfícies com mesma topologia. Sendo assim, se assumirmos uma superfície com forma fixa, a topologia da superfície é preservada, o que simplifica a descrição da energia de curvatura, deixando-a apenas em termos de $\frac{1}{2}k_c(C_1 + C_2 - C_0)^2$.

Embora as propriedades mecânicas de hemácias venham sendo estudadas por mais de 30 anos, ainda existem várias questões em aberto que modelos físicos recentes tentam responder [7,10,12–14].

2.3 Modelos de Elasticidade da Membrana de Hemácias

As primeiras observações do movimento vibratório (efeito *flickering*) da membrana da hemácia foi relatado no final do século 19, quando Browicz descreveu o fenômeno, visto através de um microscópio óptico. Entretanto, a primeira análise quantitativa das flutuações da membrana da hemácia é atribuída a Brochard e Lennon [6]. Estes autores desenvolveram um modelo no qual a hemácia é representada por duas superfícies de membranas (superior e inferior) planas termicamente excitadas. De acordo com os autores, este efeito vibratório é devido às flutuações de espessura da membrana da hemácia resultantes de um efeito puramente térmico (movimento Browniano). Além disso, estas flutuações foram descritas ou modeladas por um espectro de potência associado somente à energia de curvatura da membrana,

$$\langle |u(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_c q^4}. \quad (2.6)$$

onde k_c é o módulo de curvatura da membrana e q é o vetor de onda da flutuação observada. Com base neste modelo, Brochard e Lennon obtiveram um módulo de curvatura de $k_c \approx (2 - 7) \times 10^{-20} J \approx (5 - 11)k_B T$.

Embora o efeito venha sendo estudado por várias décadas, ainda existem controvérsias na literatura sobre a hipótese que as flutuações de membranas são derivadas de um processo puramente térmico. Em 1998, Tuvia *et al.* [60] sugeriram que as flutuações de membrana de hemácia não seriam de origem

puramente térmica, em virtude da amplitude das flutuações decrescerem sob a diminuição da concentração de ATP (adenosina trifosfato), suportando a teoria que as flutuações poderiam ser de origem metabólica (processos fora de equilíbrio). Um resultado similar foi encontrado recentemente por Park *et al.* [7]. De acordo com estes autores, a dinâmica de ligar/desligar do citoesqueleto à bicamada na presença de ATP pode aumentar as flutuações na região convexa na membrana de hemácias. Em contraste, Evans *et al.* [61] e Szekely *et al.* [62] não observaram nenhum decréscimo nas amplitudes das flutuações com a diminuição da concentração de ATP. Já no trabalho de Timo e co-autores [8], a dependência das flutuações com o ATP foi observada experimentalmente em baixas frequências ($f < 10\text{Hz}$), indicando que neste limite as flutuações possuem um caráter não-térmico e, para frequências maiores, o sistema foi bem descrito considerando a teoria de equilíbrio termodinâmico. Além disso, o espectro descrito por Brochard e Lennon mostrou-se muito simples para explicar as flutuações de membranas de hemácias observadas por outras medidas experimentais, levando assim, a formulação de novos modelos, os quais levam em consideração termos de energias associados à presença do citoesqueleto e à contribuição do ATP.

As interações entre a bicamada/citoesqueleto durante o *flickering* usando um modelo de membrana plana foram propostas mais recentemente por Nir Gov *et al.* [10] e revisada em 2007 por Auth *et al.* [14]. No trabalho de 2003 [10] a abordagem utilizada foi modelar, via teoria elástica, a membrana das hemácias como uma estrutura composta por uma camada fluida (bicamada lípidica) e uma rede bidimensional interna rígida (citoesqueleto de espectrina), a qual conecta-se esparsamente à bicamada através dos nodos de actina, como mostra a figura 2.6 (a). Além disto, a distância média entre a bicamada lípidica e o citoesqueleto d mantém-se fixa e, sua magnitude está relacionada à amplitude das flutuações térmicas que depende das ondulações conjunta entre a bicamada e o citoesqueleto. Devido às interações entre o citoesqueleto/bicamada, fez-se necessário introduzir dois novos termos ao espectro de potência das flutuações (equação 2.6), um termo de tensão superficial efetiva (σ) e um termo de potencial de confinamento, modelado como um potencial harmônico (γ). Sendo a energia livre da membrana, dada

portanto, por,

$$F = \int dA \left(\frac{1}{2} k_c (\nabla^2 u)^2 + \frac{1}{2} \sigma |\nabla u|^2 + \frac{1}{2} \gamma u^2 \right), \quad (2.7)$$

onde dA é um elemento de área da membrana. No equilíbrio termodinâmico o teorema de equipartição de energia pode ser usado, resultando no espectro de potência espacial das flutuações da membrana $\langle |u(\vec{q})|^2 \rangle$,

$$\langle |u(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_c q^4 + \sigma q^2 + \gamma}. \quad (2.8)$$

Para maiores detalhes sobre o formalismo matemático para se chegar nas equações 2.7 e 2.8, recomendamos as teses do Glionna e Siman [24,36].

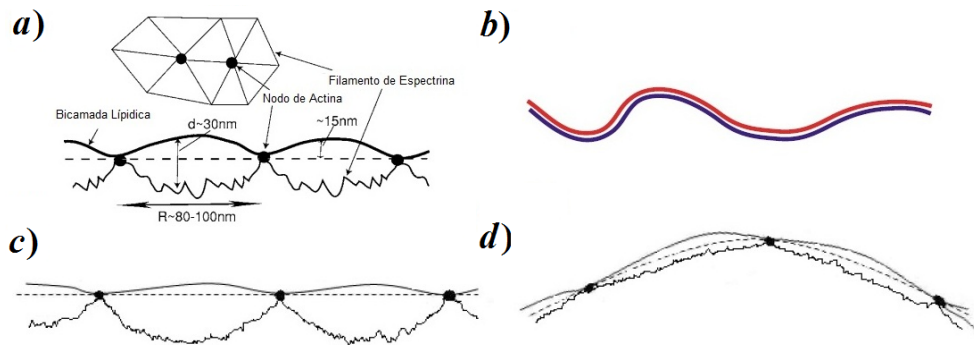


Figura 2.6: (a) Modelo de acoplamento entre citoesqueleto e bicamada lipídica. (b) Esquema ilustrando flutuações fortemente acopladas. Em (c-d) esquema ilustrando a relação entre a flutuação e a curvatura.

O modelo proposto em 2003 foi sofrendo algumas modificações ao longo dos anos e, uma das principais mudanças foi de levar em consideração a contribuição de ATP nas flutuações de membrana das células sanguíneas [12–14]. De acordo com estes trabalhos, o ATP corta as ligações entre a bicamada lipídica e o citoesqueleto, que são refeitas após algum tempo, aumentando as flutuações da bicamada. Para isso, Auth *et al.* [14], introduziu uma temperatura efetiva T_{eff} como um conceito fenomenológico para quantificar os efeitos ativos e não-térmicos (associados ao ATP) no espectro de potência (equação 2.8), onde $T_{eff} > T$. Essa temperatura é maior que a temperatura real devido à conversão de energia química em energia mecânica.

Além desta modificação, no trabalho de 2007 [14] é mostrado que devido a interação entre o módulo de curvatura da bicamada lípidica com o módulo de cisalhamento do citoesqueleto, para comprimentos de onda maiores que a distância típica entre os nodos (da ordem de $80 - 100 \text{ nm}$) surge um regime de acoplamento forte (figura 2.6 (b)) entre bicamada/citoesqueleto, onde as flutuações podem ser descritas por uma única membrana efetiva que combina as propriedades elásticas da bicamada/citoesqueleto. Neste regime, a tensão superficial é dada por,

$$\sigma = \frac{9\mu k_B T}{16\pi k_c}. \quad (2.9)$$

Além disto, é proposto que o potencial de confinamento γ depende da curvatura local da hemácia. A relação seria que quanto maior a curvatura local da hemácia, maior o número de ligações bicamada/citoesqueleto esticadas tensionando a estrutura e aumentando o potencial de confinamento,

$$\gamma = \frac{4\mu}{A} \int_A dS (2H^2 - K), \quad (2.10)$$

com a A área da região da membrana considerada, μ o módulo de cisalhamento do citoesqueleto, H a curvatura média da membrana e K a curvatura Gaussiana local, sendo $H = \frac{(C_1+C_2)}{2}$ e $K = C_1 C_2$. Na figura 2.6 (c - d), ilustramos essa dependência. No caso (c), a curvatura local da célula é nula e portanto, as ligações membrana/citoesqueleto estão relaxadas, deixando a bicamada mais propensa a flutuar. No caso (d), a curvatura local é negativa, tensionando as ligações e impedindo a bicamada de flutuar. Sendo assim, quanto maior a curvatura local, as molas entrópicas de espectrina irão encontrar-se mais esticadas ou tensionadas, fazendo com que o potencial de confinamento aumente deixando a bicamada menos propensa à flutuar. Apesar destas modificações, a equação para o espectro de potência para as flutuações continua igual àquele formulado em 2003, com a tensão superficial dada pela equação 2.9 e levando-se em consideração a constante fenomenológica T_{eff} . Nesta tese, iremos utilizar o espectro de potência dado pelo modelo de 2003 [10], por ser mais geral, deixando os parâmetros k_c , γ e σ como parâmetros a serem determinados por métodos computacionais. Uma discussão mais detalhada deste espectro será feita nos capítulos 4 e 5. Além disso, apresentaremos novas interpretações para estes parâmetros.

Capítulo 3

Metodologia Experimental

Neste capítulo apresentaremos a metodologia utilizada na realização dos experimentos usando a técnica MD, a qual envolve a montagem experimental, preparo das amostras, homogeneização do nível de cinza da imagem e as curvas de calibração do sistema experimental. Os experimentos de MD realizados nesta tese consistiram em filmar/coletar imagens de hemácias sujeitas a soluções com diferentes osmolalidades em diferentes desfocalizações. Por exemplo, em $\Delta f = 0 \mu m$ e $\Delta f = 2 \mu m$. A desfocalização pode ser feita movendo-se a objetiva, ou movendo-se a própria amostra, utilizando o nanodeslocador acoplado ao estágio do microscópio, ou movendo-se a câmera utilizando um micrômetro, acoplada à uma das saídas do microscópio.

3.1 Montagem Experimental

Os experimentos com a técnica de Microscopia de Desfocalização foram realizados no laboratório de Física de Sistemas Biológicos - Departamento de Física da UFMG/ICEX. Os microscópios ópticos invertidos utilizados nos experimentos foram: Nikon TE300 e Nikon TI-E Eclipse (figura 3.1). Os experimentos de contraste e flutuação do contraste MD foram realizadas no Nikon TI-E Eclipse. Esse microscópio possui um sistema de controle de foco (PFS - Perfect Focus System) que mantém a posição focal estável durante o experimento. Já as medidas de índice de refração da amostra foram feitas no Nikon TE300, em virtude do mesmo possuir acoplado em seu estágio um

deslocador piezoelétrico (PI Digital Piezo Controller, Modelo *E – 710.3CD*), que permite deslocamentos nanométricos nos eixos x,y e z com relação ao seu plano. Na parte de aquisição das imagens, foram utilizadas as câmeras CCD (Uniq *UP1800 CL* - 12 bits) e CMOS (SILICON VIDEO *642M* - 8 bits) que ficam acopladas às saídas dos microscópios. A Uniq possui taxa de captura fixa em 15 imagens (frames) por segundo (fps) e a CMOS (SILICON VIDEO *642M* - 8 bits) possui taxa de captura e resolução variáveis, podendo chegar a 19.600 fps. Apenas as medidas de índice de refração foram feitas com a câmera Uniq, as demais medidas foram realizadas com a câmera CMOS, com uma taxa de captura de 333 fps. Os experimentos foram realizados utilizando-se objetiva Nikon com aumento de 100X (Nikon Plan APO DIC H, 100X, 1.30 NA). Para esta magnificação, o pixel da imagem para a câmera Uniq e para a câmera CMOS possuem dimensões de $0.064 \mu\text{m} \times 0.064 \mu\text{m}$ e $0.098 \mu\text{m} \times 0.098 \mu\text{m}$, respectivamente.

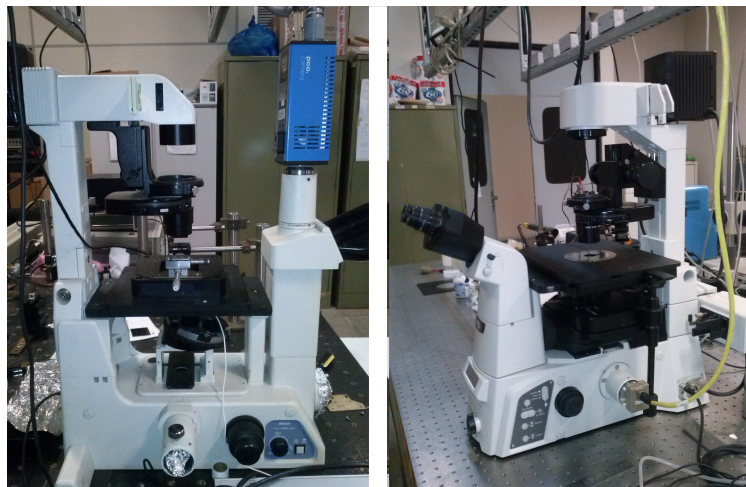


Figura 3.1: Foto dos microscópios do Laboratório de Física Biológica da UFMG/ICEX: Nikon TE300 e Nikon Ti-E.

3.2 Preparo das Amostras

O protocolo de preparação das amostras de hemácias é simples e rápido e por isso são preparadas no momento do experimento [33]. Utilizamos uma

solução tampão fosfato-salina ou PBS (*Phosphate Buffer Saline*, pH=7.4 e 0.9% NaCl) misturado com BSA (*Bovine Serum Albumin* - Sigma A2153) na concentração $1\text{mg}/1\text{mL}$ para diluirmos o sangue, que é retirado do dedo do estudante minutos antes do início do experimento. Esta solução possui osmolalidade de aproximadamente 290 mOsm/kg e índice de refração $n_{sol} = 1.333 \pm 0.001$. Em virtude da concentração salina presente no PBS ser igual ao do corpo humano (solução isotônica), ao utilizarmos esta solução tampão, as hemácias conservam a forma discóide durante a realização do experimento. Nos experimentos realizados com hemácias em solução hipotônica e hipertônica ajustamos a concentração de NaCl para 0.6% e 1.2% da solução tampão, a fim de obtermos osmolalidades de 200 mOsm/kg (solução hipotônica) e 400 mOsm/kg (solução hipertônica), respectivamente. Utilizando um osmômetro (*Osmometer Model 3250-Advanced Instruments*) verificamos todas as osmolalidades das soluções preparadas antes e no final de cada experimento. Com o intuito de não sobrecarregarmos o texto, iremos simplesmente chamar as soluções avaliadas de: solução hipotônica, isotônica e hipertônica, as quais referem-se às osmolalidades de 200, 300 e 400 mOsm/kg, respectivamente.

Após o preparo das soluções, diluímos cerca de $0.5 \mu\text{l}$ de sangue em 1ml desta solução previamente filtrada. Em seguida, transfere-se $300 \mu\text{l}$ desta solução final para um porta-amostra, que por fim é levada ao microscópio e deixado em repouso por cerca de 20 *minutos*, para permitir a adesão das células ao substrato. O porta-amostra é formado por uma lamínula de vidro, previamente limpa^{||}, com espessura de $170 \mu\text{m}$ colada a uma cubeta de acrílico, de diâmetro de cerca de 1.5cm (graxa de silicone para auto-vácuo). Vale ressaltar que todo procedimento é realizado dentro da capela de fluxo laminar para evitar contaminação da solução final por fungos e bactérias. Em média, os experimentos tem duração de 2 horas, sendo este um tempo razoável no qual as hemácias mantem o contorno de sua forma estável. Após esse período, as células começam apresentar sinais de instabilidade celular,

^{||}Esta limpeza consiste em retirarmos a camada de gordura que fica sobre as lamínulas. Esta película de gordura dificulta a adesão da célula ao substrato de vidro. Para isso, as lamínulas são imersas em um recipiente contendo álcool e éter na proporção 1:1 durante o período de 12 horas.

como por exemplo, rugosidades em sua superfície. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente.

3.3 Homogenização do nível de cinza da imagem

Esta seção explica o procedimento utilizado na correção da iluminação de fundo (do inglês, *background*) das imagens coletadas por técnicas de microscopia de campo claro, como é o caso da MD. Devido à câmera CMOS utilizada em nossos experimentos não possuir um *background* com nível de cinza homogêneo ao longo dos pixels que formam a imagem, como é ilustrado na figura 3.2, faz-se necessário esta correção. Para isso, seguimos os seguintes passos:

- 1) Capturamos um filme do *background* da imagem (imagem sem amostra), o qual denominamos de N_b ;
- 2) Capturamos um filme da amostra;
- 3) Capturamos um filme com a lâmpada do microscópio desligada e sem amostra, o qual denominamos de N_d .

Feito isso, aplicamos a seguinte operação matemática na imagem coletada com a câmera CMOS:

$$IC = \frac{\text{amostra} - N_d}{N_b - N_d} \times \overline{N_b}, \quad (3.1)$$

onde IC representa a imagem corrigida. Essa operação matemática é realizada no ImageJ (Rasband WS. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012) [63]. O resultado desta divisão é normalmente um número real entre 0 e 2, que ao ser multiplicado pelo valor de nível de cinza médio de fundo $\overline{N_b}$ nos retorna uma imagem com nível de cinza uniforme, conforme ilustrado na figura 3.2. Para mantermos a precisão, ao realizarmos esta divisão, a imagem resultante é uma imagem de números reais com precisão de 32 bits.

Vale ressaltar que este procedimento pode ser estendido à outros eventos que também produzem degradações nas imagens, como é o caso de ruídos

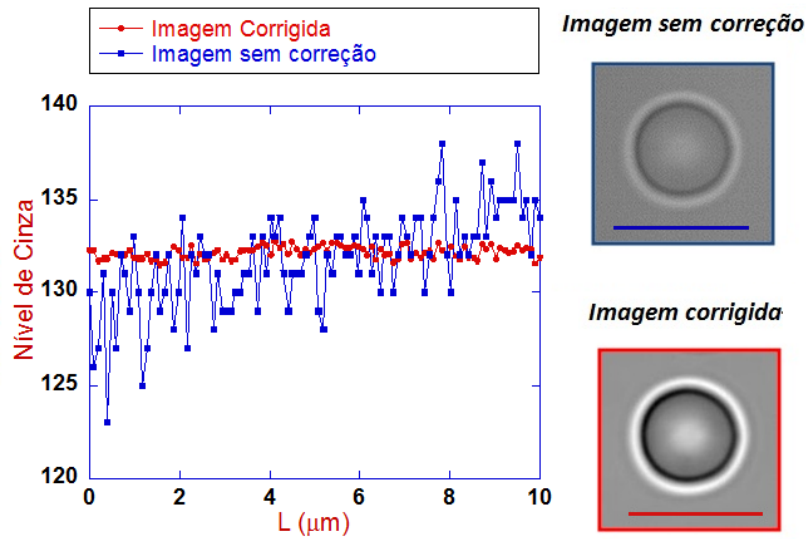


Figura 3.2: Correção do nível de cinza na imagem.

aleatórios e pixels quentes** (do inglês, *hot pixels*). Para maiores informações sobre esta correção, recomendamos a referência [64].

3.4 Calibrações

3.4.1 Calibração do Nível de Cinza

As imagens capturadas pelas câmeras Uniq e CMOS, utilizadas em nossa montagem experimental fornecem imagens formadas por pixels com diferentes níveis de cinza, cujos valores correspondem aos números inteiros 0 a 4095 para a Uniq - 12 bits e de 0 a 255 para CMOS - 8 bits. ††. Como a nossa técnica retira informações do contraste de intensidade da luz, faz-se necessário realizar uma transformação do nível de cinza (NC) dos pixels em intensidade luminosa da imagem (I). Esta transformação é obtida através de um gráfico de calibração, no qual são coletados pares de nível de cinza e intensidade para diferentes níveis de iluminação do microscópio. Como pode ser visto nas figuras 3.3 (a-b), os gráficos das calibrações obtidos para as câmeras são

**Um pixel que está todo o tempo ligado, mostrando a cor branca.

††O valor 0 representa o nível mais escuro e o valor máximo o nível mais claro.

lineares e, portanto, tem a forma,

$$NC = \alpha I + \beta \quad (3.2)$$

onde α e β são constantes. A relação entre o contraste C , dado pela equação A.1, e o C_{NC} com base nos níveis de cinza gerados pelas câmeras é dada por

$$C = \frac{I - I_0}{I_0} = \frac{\frac{NC - \beta}{\alpha} - \frac{NC_0 - \beta}{\alpha}}{\frac{NC_0 - \beta}{\alpha}} = C_{NC} \left(\frac{NC_0}{NC_0 - \beta} \right), \quad (3.3)$$

onde I_0 é a intensidade do *background*, NC_0 representa o nível de cinza medido correspondente a esta intensidade e $C_{NC} = \frac{NC - NC_0}{NC_0}$. Mantendo o ganho fixo para UNIQ em 11.08 dB e para a CMOS em 8 dB e utilizando um filtro vermelho passa-altas ($\lambda = 610 \text{ nm}$) para evitar efeitos de absorção pela célula, determinamos o fator de calibração para cada câmera $a_c = \frac{NC_0}{NC_0 - \beta}$. A partir dos gráficos apresentados nas figuras 3.3 (a) e 3.3 (b), retiramos as relações $NC_{Uniq} = -57.9 + 1447I$ e $NC_{CMOS} = -9.89 + 26I$, respectivamente.

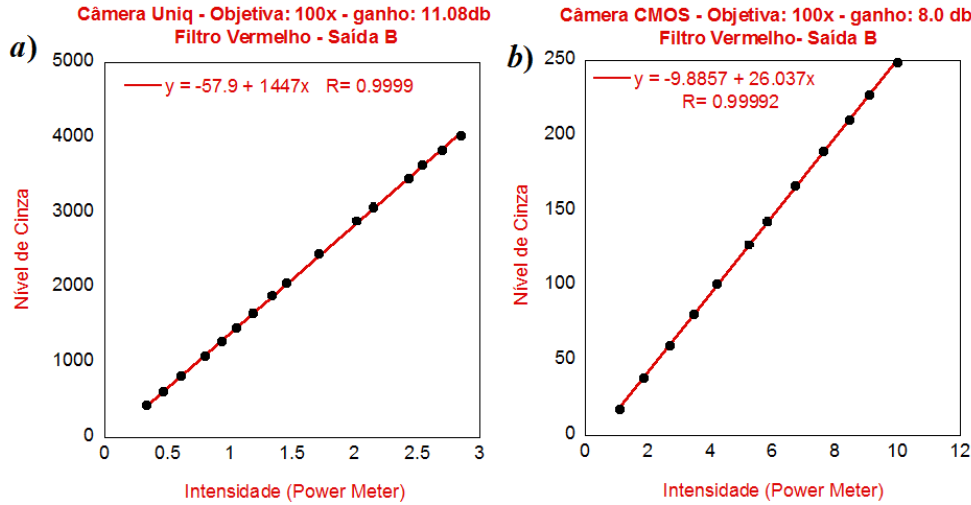


Figura 3.3: Nível de cinza (NC) versus intensidade luminosa (I) para as câmeras Uniq (a) e CMOS (b). A linha em vermelho representa o ajuste linear, com $NC_{Uniq} = -57.9 + 1447I$ e $NC_{CMOS} = -9.89 + 26I$, evidenciando a linearidade das câmeras.

Usando $NC_0 = 2000$ para a UNIQ e $NC_0 = 130$ para a CMOS resulta em um fator de calibração de $a_{Uniq} = 0.97$ e $a_{CMOS} = 0.93$. Sendo assim,

vemos que a calibração no contraste gera uma diferença menor que 10% para os níveis de cinza médios utilizados. Após a conversão do nível de cinza em contraste, obtemos então imagens representando o contraste de intensidade de hemácias desfocalizadas.

3.4.2 Calibração da Taxa de Captura

As medidas das flutuações da membrana de células são realizadas com técnicas de videomicroscopia comuns, que em geral, são delimitadas pela taxa de captura das câmeras. As flutuações da membrana das hemácias e consequentemente as flutuações de contraste MD tem tempos de relaxação que são diferentes para cada componente espacial \vec{q} de Fourier: componentes com \vec{q} maiores relaxam mais rápido. Por exemplo, para uma taxa de captura de 100 *fps* o intervalo de aquisição para cada frame será de 10 *ms*. Assim, as flutuações com tempo de relaxação menor que este acabam não sendo observadas. A fim de garantirmos que as flutuações das membranas da hemácia não sejam sub-dimensionadas pelo nosso sistema de captura, realizamos uma calibração da taxa de captura da câmera CMOS. Para isso, medimos o contraste e a flutuação quadrática média do contraste na região central ($\rho = 1 \mu m$) de hemácias normais e desfocalizadas de $2 \mu m$ com relação à posição de contraste mínimo da hemácia para diferentes taxas de captura entre 15 e 900 *fps*. O tempo total de aquisição para cada filme foi de 10 segundos.

Como a câmera CMOS tem uma taxa de captura ajustável com relação ao tamanho da janela de aquisição da imagem (resolução horizontal e vertical), conseguimos variar a taxa de captura de 15 *fps* a 900 *fps*. Na figura 3.4(a), temos o comportamento do contraste médio normalizado pelo valor máximo $\langle C \rangle / \langle C \rangle_{max}$ obtido, para uma mesma hemácia, em função da mudança na taxa de captura. Este resultado nos diz que todas as medidas realizadas estavam sob as mesmas condições de nível de cinza e portanto, com o mesmo contraste, podendo assim, serem comparadas entre si. Na figura 3.4(b) temos o gráfico da flutuação quadrática média do contraste normalizada pelo valor máximo $\langle (\Delta C)^2 \rangle / \langle (\Delta C)^2 \rangle_{max}$ em função da taxa de captura 15 – 900 *fps*. Por este gráfico, vemos que a partir da taxa

de 333 fps surge uma saturação de $\langle (\Delta C)^2 \rangle / \langle (\Delta C)^2 \rangle_{max}$, indicando que a partir desta taxa de captura as medidas de flutuação do contraste não estão mascaradas pelo nosso sistema de aquisição de imagens, ou seja, que estamos conseguindo capturar todos os q 's observáveis do nosso sistema.

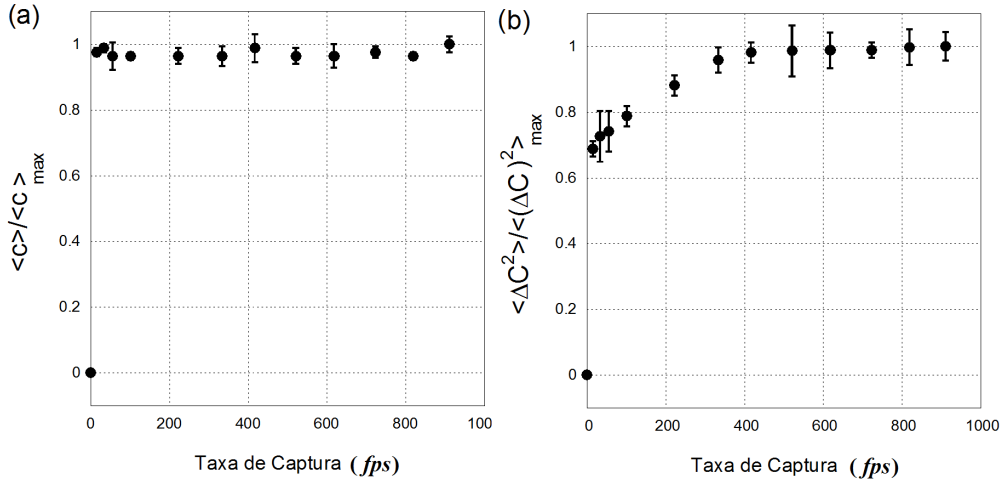


Figura 3.4: Gráfico da calibração da taxa de captura da câmera CMOS para experimentos com hemácias. Em (a) temos o contraste normalizado pelo valor máximo do contraste observado em função da taxa de captura. Em (b) temos a flutuação quadrática média do contraste normalizada pelo valor máximo da flutuação observada em função da taxa de captura. A partir de 333 fps temos uma saturação nas amplitudes, indicando que a partir desta taxa, conseguimos medir flutuações das membranas de hemácias com todos os q 's observáveis em nosso sistema ($q \sim 12 \mu m^{-1}$).

Os valores de contraste e da flutuação quadrática média do contraste foram obtidos mediante à aplicação de programas desenvolvidos pelo nosso grupo nas imagens capturadas, os quais serão descritos no próximo capítulo.

Capítulo 4

Microscopia de Desfocalização Aplicada em Hemácias

4.1 Contraste MD

Objetos de fase, ou seja, objetos que são transparentes ao serem observados por um microscópio óptico, podem se tornar visíveis ao desfocalizar o microscópio. Isto ocorre porque o ato de desfocalizar introduz uma diferença de fase entre as ordens difratadas e transmitida (ordem zero), de forma que objetos transparentes podem ser visualizados no plano imagem (no caso a câmera de vídeo). Sendo assim, a partir de medidas de contraste de intensidade de imagens capturadas em dois planos focais diferentes é possível obter informação sobre a fase do campo elétrico, e então acessar as interfaces que compõem o objeto de fase. O formalismo da equação de Transporte de Intensidade [65] já tem sido utilizado para este propósito [25,66–68]. No entanto, este último resulta em uma equação que não possui os termos necessários para que seja feita uma caracterização completa de todas as interfaces do objeto de fase. Em nossa abordagem utilizamos a teoria de difração de Fresnel e o formalismo de propagação do espectro angular [69,70] para propagar o campo elétrico da luz através do nosso modelo para um microscópio desfocalizado. Para isso tratamos o campo elétrico com uma quantidade escalar e desprezamos os efeitos de polarização. Esta propagação resulta em uma expressão em forma de integral sobre os vetores de onda (\vec{q}), na qual as dis-

tâncias entre o plano focal da objetiva (z_f) e as interfaces do objeto de fase observado aparecem explicitamente, permitindo discriminar a contribuição de cada interface separadamente no contraste da imagem, que consequentemente, possibilita a geração da imagem 3D total do objeto de fase e o estudo das flutuações nas superfícies deste objeto.

Definindo o contraste da imagem como $C(\vec{\rho}) = \frac{I(\vec{\rho}) - I_0}{I_0}$, onde $I(\vec{\rho})$ é a intensidade da imagem no objeto e I_0 é a intensidade da imagem no *background*, e considerando a difração de primeira ordem, foi demonstrado no apêndice A que o contraste MD de uma hemácia decomposta em componentes espaciais \vec{q} de Fourier é,

$$C(\vec{\rho}) = \frac{2\Delta n k_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[h_1(\vec{q}) \sin\left(\frac{(z_f - h_1)q^2}{2k}\right) - h_2(\vec{q}) \sin\left(\frac{(z_f - h_2)q^2}{2k}\right) \right] \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}, \quad (4.1)$$

onde z_f representa a posição focal da objetiva com o sistema de referência na lamínula, A é a área de superfície da célula observada e $h(\vec{\rho}) = \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho})$. Na equação 4.1 consideramos que a luz incidente é difratada por uma ou pela outra superfície, com probabilidade pequena de ser difratada pelas duas superfícies.

Como o contraste MD de hemácias não é nulo e nem uniforme é possível obter informações sobre a forma de equilíbrio da hemácia observada por um microscópio óptico desfocalizado utilizando a equação 4.1. Durante a preparação das amostras, as hemácias entram em contato com o substrato (lamínula de vidro) e a célula passa a constituir um objeto de fase formado por duas superfícies, onde cada ponto da membrana que flutua livremente é identificado pelo perfil de altura $h_1(\vec{\rho})$ e cada ponto da membrana em contato com o substrato é localizado pelo perfil de altura $h_2(\vec{\rho})$. Durante a realização do experimento a posição mais fácil de se localizar é a posição de contraste mínimo da célula (figura 4.1(c)), que ocorre quando o plano focal da objetiva está sobre o plano médio da hemácia. Desta forma, é mais conveniente colocarmos a origem do eixo z no plano médio da hemácia (z_{rbc}). Para exemplificar, temos na figura 4.1 (a) a representação de uma hemácia no referencial no qual a origem do eixo z está localizada no plano

de contraste mínimo (z_{rbc}). Neste referencial, a grandeza $z_f = \Delta f + z_{rbc}$ é a distância entre a lamínula e o plano focal da objetiva e Δf é a quantidade de desfocalização, dada pela distância entre o plano médio da hemácia e o plano focal da objetiva. O perfil de espessura da célula neste referencial passa a ser $H = h_1 + |h_2|$. Em conjunto, temos representado na figura 4.1(b - d) três imagens do contraste observado quando posicionamos o plano focal da objetiva acima, sobre e abaixo do plano médio da hemácia, respectivamente.

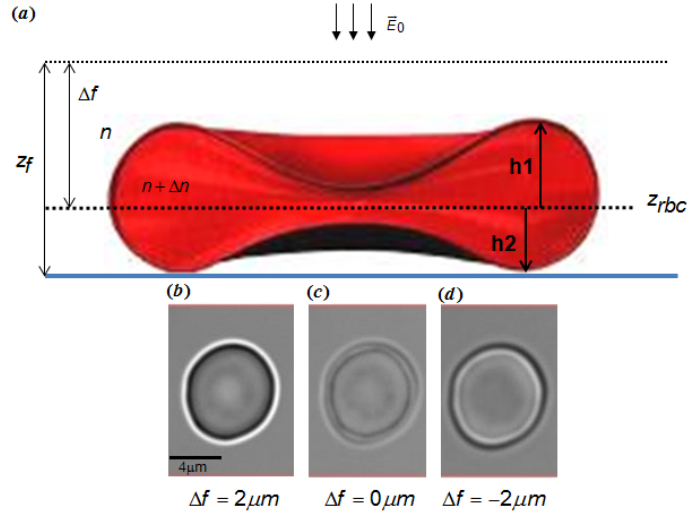


Figura 4.1: (a) Representação da hemácia com o referencial no plano médio da célula (z_{rbc}): Δf representa a distância entre o plano médio da célula z_{rbc} e o plano focal da objetiva e h_1 e h_2 são as distâncias entre z_{rbc} e a membrana superior e inferior, respectivamente. Em (b) temos a imagem do contraste acima ($\Delta f = 2 \mu m$), (d) abaixo ($\Delta f = -2 \mu m$) e sobre o (c) plano médio da célula ($\Delta f = 0 \mu m$).

No limite de pequenos vetores de onda e de pequenas desfocalizações $\frac{\Delta f q^2}{2k} \ll 1$, o contraste MD gerado por uma hemácia, neste referencial, pode ser aproximado por,

$$C(\vec{\rho}) = \frac{\Delta n}{n_0} \left((\Delta f - h_1) \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) + (\Delta f + |h_2|) \nabla^2 |h_2|(\vec{\rho}) \right). \quad (4.2)$$

Nesta aproximação o contraste é linear com a quantidade de desfocalização Δf e com a curvatura local ($\kappa(\vec{\rho})$) de cada superfície de membrana, já que $\nabla^2 h(\vec{\rho}) \cong -\kappa(\vec{\rho})$. Na figura 4.2 podemos comprovar esta aproximação

e visualizar os limites para os quais ela é válida. Na figura apresentamos o comportamento do contraste médio $\langle C \rangle$ para cada média radial de 3 pixels, gerados desde a região central da célula ($\rho = 0.29 \mu m$) até a região próxima à espessura máxima ($\rho = 2.35 \mu m$), em função da desfocalização. Os símbolos $\langle \rangle$ representam uma média sobre os vários frames coletados durante um período de tempo t . Vê-se que o contraste apresenta um comportamento linear dentro do intervalo de $\Delta f = [-2, 2] \mu m$. Sendo assim, todos os experimentos para obter o contraste médio foram realizados dentro dessa faixa de desfocalização. Outro resultado importante da figura 4.2 é o fato das retas interceptarem o eixo x em pontos diferentes. Isto nos diz que os termos $h_1 \nabla^2 h_1$ e $h_2 \nabla^2 h_2$ estão variando ao longo do raio da hemácia, e portanto, o contraste gerado não é uniforme ao longo da sua extensão, indicando que existe uma assimetria ligada à geometria da célula. Este resultado é importante, pois foi a partir dele que formulamos uma nova proposta de obter os perfis de altura de cada membrana, como será exposto mais adiante. Vemos também que em $\rho = 1.76 \mu m$ o contraste é praticamente nulo, o que representa uma região de inversão da curvatura.

Vale ressaltar aqui, que a introdução das coordenadas dos perfis de altura $h_1(\vec{\rho})$ e $h_2(\vec{\rho})$ dentro da fase na equação do contraste, é que nos permite obter imagens 3D totais, sendo que nenhuma outra técnica que usa desfocalização considerou estes fatores importantes antes. Além disso, o acoplamento não-linear entre $h(\vec{\rho})$ e $\nabla^2 h(\vec{\rho})$, como mostrado na equação 4.2, é responsável pela alta resolução axial alcançada pela MD, como será mostrado a seguir.

✓ Programa 1: Extraíndo o perfil radial do Contraste

Este programa é um plugin escrito na linguagem JAVA e executado no ImageJ. Este plugin transforma, pixel a pixel, o nível de cinza de cada quadro do filme (8, 12 ou 32 bits) em contraste médio. Para obter o contraste médio de cada pixel i das imagens, usamos a equação 3.3 que transforma cada pixel i de nível de cinza N_i em contraste C_i . Em seguida, calculamos uma média sobre todas as imagens coletadas, que resulta no contraste médio $\langle C \rangle_i$. Por fim, calculamos o contraste médio em função do raio através de médias angulares realizadas em anéis de espessura variáveis. A escolha da espessura do anel está ligada com a quantidade de pixels que entra na estatística para

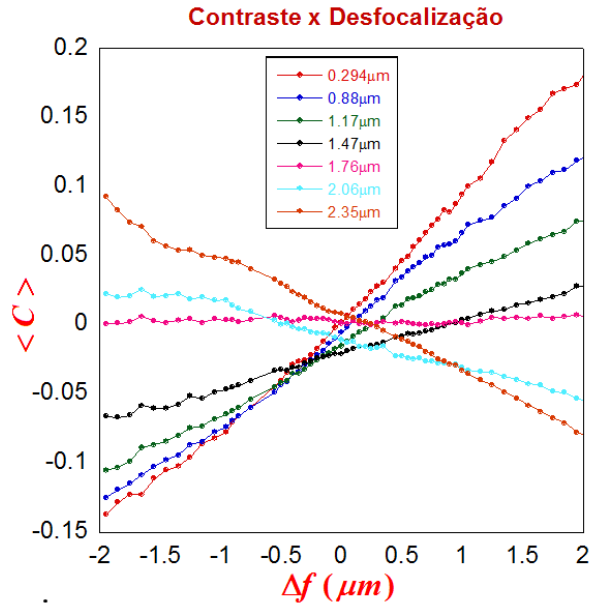


Figura 4.2: Comportamento de $\langle C(\vec{\rho}) \rangle$ em função da desfocalização Δf . O perfil radial do contraste médio foi determinado em anéis com espessura de 3 *pixels*, gerados desde a região central ($0.29 \mu m$) até a região próxima à espessura máxima ($2.35 \mu m$). Este resultado nos diz que o contraste não é homogêneo ao longo do perfil da hemácia, ou seja, que há uma assimetria ligada à geometria da célula. Além disso, a linearidade de $\langle C \rangle \times \Delta f$ valida a equação 4.2.

calcular a média. Como entrada desse programa, deve-se selecionar uma região quadrada que englobe tanto a hemácia quanto o *background*. Além disso, deve-se entrar com o valor de calibração β , referente à equação 3.3, e o valor de nível de cinza médio do filme (hemácia + *background*). Como saída, o programa fornece uma tabela contendo o raio da análise, a quantidade de pixels utilizados para calcular a média para cada raio e o perfil radial do contraste médio. Este perfil radial representa a rotação de $\vec{\rho}$ em 360° .

4.1.1 Resolução Axial da MD

A resolução axial da MD depende da sensibilidade do contraste da imagem, do contraste óptico do objeto de fase e da curvatura média das superfícies consideradas. Para uma estimativa desse valor em hemácias podemos de-

terminar a diferença de contraste (equação 4.2) entre as duas superfícies da célula, em $\vec{\rho} = 0$, ou seja, no centro da célula. Para $z_f = h_1$,

$$C_1 = \frac{\Delta n}{n_0}(h_1 + |h_2|)\nabla^2 h_2, \quad (4.3)$$

e para $z_f = -|h_2|$,

$$C_2 = \frac{\Delta n}{n_0}(-h_1 - |h_2|)\nabla^2 h_1, \quad (4.4)$$

tal que,

$$\Delta C = C_1 - C_2 = \frac{\Delta n}{n_0}(h_1 + |h_2|)\nabla^2(h_1 + |h_2|) = \frac{\Delta n}{n_0}H(0)\nabla^2 H(0), \quad (4.5)$$

onde $H(0) = h_1(0) + |h_2(0)|$ representa a distância axial entre as duas superfícies de membranas na região central da hemácia ($\vec{\rho} = 0$). A distância axial mínima que pode ser resolvida usando MD é, então,

$$H(0)_{min} = \frac{n_0 \Delta C_{min}}{\Delta n \nabla^2 H(0)}. \quad (4.6)$$

Considerando a sensibilidade ao contraste da câmera de $\Delta C_{min} = 10^{-2}$, o índice de refração do óleo de imersão da objetiva $n_0 = 1.51$ e usando os valores típicos para hemácias em solução isotônica, $\Delta n = 0.058$, $\nabla^2 H(0) = 1.7 \mu m^{-1}$, então $H(0)_{min} \sim 150 \text{ nm}$. Como veremos mais adiante, somos capazes de obter imagens da superfície de membranas separadas por distâncias de $\sim 300 \text{ nm}$.

4.1.2 Perfil de Espessura - $H(\vec{\rho})$

Os experimentos para obter o perfil de espessura $H(\vec{\rho}) = h_1(\vec{\rho}) + |h_2(\vec{\rho})|$, a reconstrução tridimensional da espessura e o volume consistem em obter o contraste MD da imagem da célula em duas posições focais diferentes, $\langle C_1(\Delta f_1) \rangle$ e $\langle C_2(\Delta f_1) \rangle$. Com base na equação 4.2, realizamos uma subtração pixel a pixel na imagem do contraste para duas posições focais diferentes, de tal forma que o valor de cada pixel do frame resultante é dado por,

$$\langle C_2 \rangle - \langle C_1 \rangle = \frac{\Delta n}{n_0}(\Delta f_1 - \Delta f_2)\nabla^2(h_1 + |h_2|). \quad (4.7)$$

Reescrevendo o perfil de altura h em série de Fourier e, aplicando a transformada bidimensional de Fourier $\mathfrak{F}\{\langle C \rangle\} = \int_{-\infty}^{+\infty} \langle C \rangle \exp^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{\rho}$ nos pixels da imagem resultante, obtemos,

$$\mathfrak{F}\{\langle C_2 \rangle - \langle C_1 \rangle\} = -\frac{\Delta n}{n_0} \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} (2\pi)^2 \delta(\vec{q} - \vec{q}') q'^2 \times \\ \times (\Delta f_1 - \Delta f_2)(h_1(\vec{q}) + |h_2(\vec{q})|). \quad (4.8)$$

Dividindo esta nova imagem por $-q'^2$ e em seguida aplicando a transformada inversa de Fourier $\mathfrak{F}^{-1}\{\langle C \rangle\} = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \langle C \rangle \exp^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}$, obtemos,

$$H(\vec{\rho}) = h_1 + |h_2| = \frac{n_0}{\Delta n(\Delta f_1 - \Delta f_2)} \mathfrak{F}^{-1} \left(\frac{\mathfrak{F}\{\langle C_2(\vec{\rho}) \rangle - \langle C_1(\vec{\rho}) \rangle\}}{-q^2} \right) \quad (4.9)$$

Desde que os valores para n_0 , Δn e Δf sejam conhecidos, a imagem final representa o mapa de espessura H do objeto. Como a intensidade média da imagem total de um objeto de fase puro é uma constante, determinada pela intensidade do *background* $\langle I \rangle_{\vec{\rho}} = \langle I_0 \rangle$, temos que o contraste médio da imagem toda $\langle C \rangle_{\vec{\rho}} = (\langle I \rangle_{\vec{\rho}} - I_0)/I_0$ será zero. Sendo assim, a transformada de Fourier para $q = 0$ é $\langle C \rangle_{\vec{\rho}} = 0$, e portanto ignoramos este termo na equação acima, eliminando o problema da divisão por $q = 0$.

✓ **Programa 2: Perfil de Espessura ($H(\vec{\rho})$), Reconstrução tridimensional de espessura e volume.**

O programa para obter o perfil de espessura foi implementado no software Matlab (MathWorks) e realiza inicialmente a conversão de nível de cinza das imagens em contraste, e posteriormente executa as operações matemáticas descritas na equação 4.9. Usando plugins em Java desenvolvidos, cada conjunto de imagens capturado é transformado em uma única imagem representando o nível de cinza médio temporal $\langle N \rangle$ da imagem capturada. Como dados de entrada do programa são necessários duas imagens em posições focais diferentes ($\langle N_1 \rangle$ e $\langle N_2 \rangle$) de uma mesma hemácia, o valor do pixel da câmera que foi utilizada para realizar a captura das imagens e o valor de $\Delta n = n_{rbc} - n_{meio}$, onde $n_{meio} = 1.333$ e n_{rbc} representa o índice de refração da hemácia. Ao realizarmos uma subtração entre as duas imagens

$\langle N_{1/2} \rangle$ os defeitos do *background* são amenizados, além de realçar a determinação do contorno da hemácia. Como resultado, o programa fornece uma imagem que representa o mapa de espessura. Na figura 4.3 (a) temos o mapa de espessura de uma hemácia imersa em solução isotônica. Adicionalmente, podemos determinar a reconstrução tridimensional (3D) de espessura a partir deste mapa, como ilustrado na figura 4.3(b). Para a reconstrução 3D da espessura da hemácia, aplicamos o plugin de domínio gratuito do ImageJ, *Interactive 3D Surface Plot* sobre o mapa de espessura. Além disso, podemos obter o perfil de espessura da seção reta da hemácia, que pode ser visto na figura 4.3 (c), ao traçarmos uma linha na horizontal ao longo deste mapa. Outra informação que pode ser retirada a partir do mapa de espessura é o perfil radial de espessura, conforme visto na figura 4.3 (d). O plugin utilizado para determinar este perfil radial é de domínio gratuito do ImageJ, o qual intitula-se *Radial Profile*.

Por fim, usando o mapa de espessura, o volume da célula pode ser facilmente obtido por $V = A_{pixel} \times H(\vec{\rho})$, onde A_{pixel} representa a área de cada pixel da imagem (μm^2).

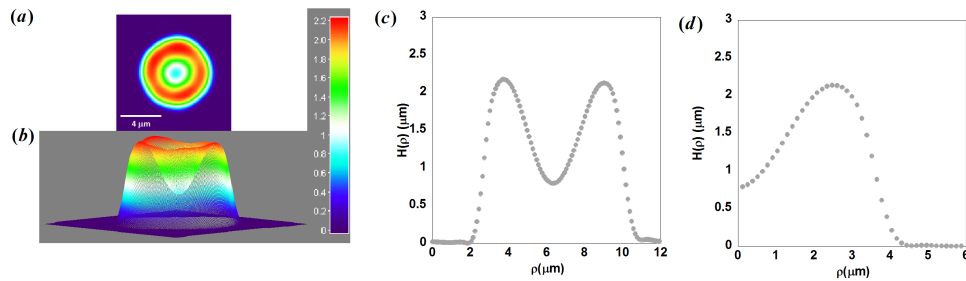


Figura 4.3: Em (a) temos o mapa de espessura de uma única hemácia imersa em solução isotônica. Em (b) temos a reconstrução 3D desse mapa, em (c) o perfil de espessura da seção reta e em (d) o perfil radial de espessura desta hemácia, obtido por uma média angular sobre o mapa de espessura.

4.1.3 Métodos para determinar o raio da hemácia via MD

Imagens de pequenos objetos de fase coletadas com MD, como é o caso das hemácias, exibem franjas de interferência, que resultam da mudança abrupta do índice de refração entre a célula e o meio que a circunda. Na figura 4.4 (a), apresentamos a imagem do contraste MD de uma hemácia em $\Delta f = 2 \mu m$, em que a primeira franja reflete a borda da célula com um certo deslocamento (seta em verde).

Nesta tese utilizamos dois critérios baseados na análise do contraste MD a fim de determinarmos o raio da hemácia. Na figura 4.4 (b) temos o perfil radial do contraste (pontos em vermelho) e o perfil da derivada do contraste MD (pontos em azul) da hemácia apresentada em (a). O primeiro critério consistiu em estimarmos a posição em que ocorre a inversão do contraste (seta em vermelho), a partir da borda da célula, com base no perfil radial do contraste da hemácia. O segundo critério consistiu em localizarmos a posição em que a derivada radial do contraste assume valor máximo, posição esta indicada pela seta em azul.

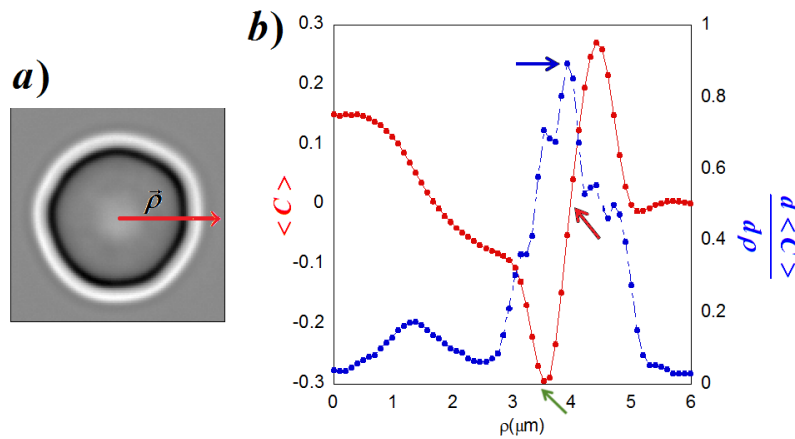


Figura 4.4: Métodos utilizados na determinação do raio da hemácia (r_{rbc}). Em (a) representação de uma hemácia em $\Delta f = 2 \mu m$. Em (b) temos o perfil radial do contraste (pontos em vermelho) e de sua derivada $\frac{d\langle C \rangle}{d\rho}$ (pontos em azul). As setas indicam o raio da hemácia pelos dois critérios.

Após vários testes em diferentes posições focais e, respeitando o intervalo

de $[-2, 2] \mu m$, comprovamos que os dois critérios representam a mesma posição. No programa de imagem 3D total optamos pelo segundo critério para determinarmos o raio da hemácia, pois trata-se de uma abordagem menos complexa e tão robusta quanto o primeiro critério. Vale ressaltar que a intensidade relativa à posição $\Delta f = 0$ é imprecisa, pois nesta posição o contraste é mínimo e por isso, evitamos determinar o raio da hemácia nesta posição focal.

4.1.4 Métodos para obter o perfil de altura da membrana de hemácias

Nesta seção iremos apresentar os métodos utilizados para obter o perfil de altura de cada membrana. Em ambos os métodos, para determinar separadamente o perfil de altura das membranas superior e inferior das células faz-se necessário determinar inicialmente a espessura da célula e o contraste para uma posição específica de desfocalização, $\langle C_1 \rangle$ em Δf_1 , por exemplo. O que difere nas abordagens são como as informações dos perfis de altura de cada membrana são acessadas: uma de forma radial (usando o Algoritmo Genético - AG) e delimitada a um raio de aproximadamente $2.5 \mu m$ e a outra, a partir de toda a imagem e, incluindo uma assimetria no contraste MD (equação 4.2), a qual nos permite obter a imagem 3D total da célula. Embora o parâmetro assimetria também possa ser obtido via AG, iremos por conveniência, nomear estes métodos simplesmente por método AG e método Assimetria. Vale ressaltar que ambos os métodos em sua atual formulação são eficazes para objetos de fase puros, que no caso das hemácias, equivale a realizar experimentos com luz de comprimento de onda $\lambda_0 = 610 nm$ para evitar efeitos de absorção.

Método 1: AG. Neste método, os perfis são determinados a partir do perfil radial de espessura da célula em conjunto com o perfil radial do contraste para uma posição específica de desfocalização, $\langle C_1 \rangle$ em z_{f_1} , por exemplo. Utilizando a relação, $H = h_1 + |h_2|$ de forma que o contraste da hemácia (equação 4.2) pode ser reescrito em função de h_1 e H .

$$\langle C_1(\vec{\rho}) \rangle = \frac{\Delta n}{n_0} [(\Delta f_1 + H(\vec{\rho}) - h_1(\vec{\rho})) \nabla^2 H(\vec{\rho}) - H(\vec{\rho}) \nabla^2 h_1(\vec{\rho})]. \quad (4.10)$$

Desde que Δn , n_0 , $H(\vec{\rho})$, $\langle C_1(\vec{\rho}) \rangle$ e Δf sejam conhecidos, $h_1(\vec{\rho})$ pode ser determinada por métodos computacionais. Determinado $h_1(\vec{\rho})$, voltamos a relação $H = h_1 + |h_2|$, de modo que o perfil médio $h_2(\vec{\rho})$ também é definido. Nós implementamos o programa Algoritmo Genético para acessar essas informações, o qual foi implementado no software Matlab.

✓ **Programa 3: O Algoritmo Genético (AG)** é baseado nas teorias de evolução *Darwiniana*. Ele aplica operações de mutação, cruzamento e seleção aleatória para determinar a melhor solução a partir de uma população aleatória. A evolução ocorre a partir de uma população inicial, formada por indivíduos aleatórios ao longo de gerações. A cada geração, a adaptação de cada indivíduo na população é avaliada, alguns indivíduos são selecionados para a próxima geração e recombinados ou mutados para formar uma nova população. Nesta população, os melhores indivíduos têm maior probabilidade de serem selecionados para serem submetidos às operações de cruzamento e mutação, com o objetivo de formar uma nova população. A nova população então é utilizada como entrada para a próxima iteração do algoritmo.

Os parâmetros primários de controle do AG são o tamanho da população (P) e o número de gerações (G). Como parâmetros secundários temos a reprodução (pr), o cruzamento (pc) e a mutação (pm) que controlam a probabilidade para a geração de uma nova população. Como ponto de partida, entramos com uma população aleatória, o AG executa operações de reprodução, cruzamento e reprodução para gerar uma nova população de indivíduos, até que algum critério de parada seja satisfeito.

A função de mérito (Ψ^2) utilizada para avaliar a aptidão de cada indivíduo no AG utilizado é o erro quadrático total entre os dados obtidos experimentalmente (T) e os dados obtidos com o modelo matemático do processo (t_i) [71]:

$$\Psi^2 = \sum_i^N (T_i - t_i)^2 \quad (4.11)$$

onde T representa os dados experimentais de contraste $\langle C \rangle$ e da flutuação quadrática média do contraste $\langle (\Delta C)^2 \rangle$, t é o resultado da avaliação de cada indivíduo (no caso, o conjunto de parâmetros) inseridos na equação 4.11 e N é o número de pontos que avalia-se cada indivíduo. Usando a informação do ajuste, o AG executa as operações com as probabilidades especificadas pelos parâmetros pr, pc e pm para gerar uma nova população. Teoricamente, os critérios de parada devem ser que a função Ψ^2 atinja um valor igual a zero. No entanto, uma vez que o conjunto de dados são obtidos por medições experimentais, as incertezas intrínsecas devem ser levadas em conta. Portanto, o processo foi encerrado quando o valor retornado pela função Ψ^2 , dado pelos melhores indivíduos, não era alterada durante centenas de gerações, começando a contagem de valores da função Ψ^2 abaixo 10% da variância dos dados experimentais. Finalmente, a fim de testar a robustez do algoritmo às condições iniciais, executamos o AG com diferentes populações aleatórias.

Nesta tese, empregamos o AG para obter dois resultados: o perfil radial de altura $h_1(\vec{\rho})$, usando a equação 4.10 a partir do ajuste do dado experimental do contraste MD e o espectro de potência para cada membrana $|\langle u_{1/2}^2 \rangle|$, usando a equação 4.17 a partir do ajuste do dado experimental da flutuação quadrática média do contraste MD. Em ambos os casos, cada procura é iniciada com uma população aleatória de indivíduos cerca de 20X maior do que o número de variáveis da equação a ser ajustada.

Adaptação do AG para análise de $\langle C \rangle$

No caso do contraste MD, o AG será empregado na determinação do perfil radial de altura $h_1(\vec{\rho})$, com número de variáveis correspondente a quantidade de pontos que definem o raio de análise para cada grupo de hemácias, onde cada ponto representa um pixel radial da câmera Uniq ou da câmera CMOS. O raio de análise é definido nos seguintes critérios:

- 1) Perfil radial do contraste MD, figura 4.5(a - c). Com base nesse perfil, determinamos aproximadamente a posição radial em que o efeito de difração das bordas começa a ser mais evidente em nossos dados experimentais. Esta região é caracterizada por um aumento brusco no contraste MD, conforme indicado na figura 4.5(a - c). A região fora do círculo define a quantidade de

pontos para a execução do AG para cada grupo de hemácias.

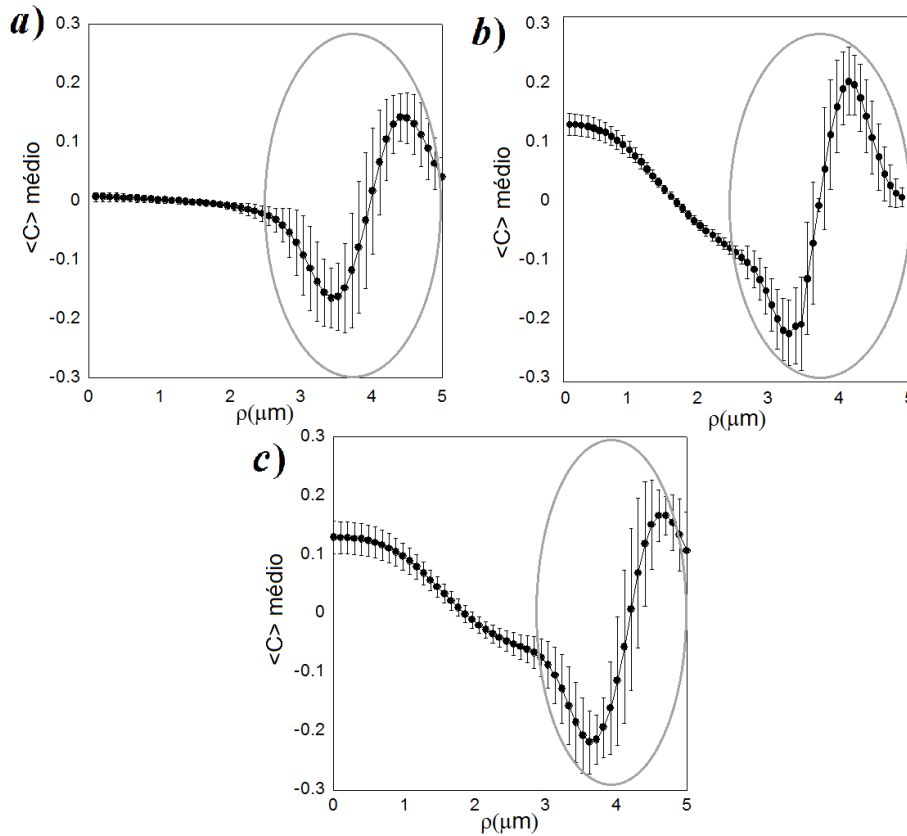


Figura 4.5: Perfil radial completo do contraste médio sobre 25 células analisadas em solução (a) hipotônica e (c) hipertônica. Em (b) sobre 42 células em solução isotônica [24]. O círculo em cinza indica a região do efeito de difração que deve ser evitada.

2) Pela equação 4.10, vê-se que o cálculo de h_1 envolve derivadas de primeira e segunda ordem do perfil h_1 em função do raio $\vec{\rho}$, que também delimita a quantidade radial de pontos. No caso do grupo de hemácia normais (solução isotônica), h_1 possui um vetor com $n = 32$ elementos (critério 1), e portanto uma distância radial total de $\rho = 2.72 \mu m$. Sendo a população inicial 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 calcular as derivadas 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 26

pontos radiais, relativos ao intervalo radial $[0.25-2.50] \mu m$. No caso do grupo de hemácias sob condição osmótica hipotônica e hipertônica, as populações iniciais foram compostas de 500 e 600 números aleatórios e as distâncias radiais totais foram $\rho = 2.45 \mu m$ e $\rho = 2.94 \mu m$, respectivamente. Sendo os intervalos radiais dados por $[0.29-2] \mu m$ e $[0.29-2.50] \mu m$, respectivamente.

Após inúmeros testes, conclui-se que o algoritmo deve ser encerrado quando o valor retornado pela função de mérito não apresenta modificações maiores que 1% da variância dos dados experimentais, por 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^{-3} nos dados de contraste $\langle C(\vec{\rho}) \rangle$. Por fim, para avaliar a robustez do algoritmo às condições iniciais, cinco execuções adicionais foram realizadas com populações aleatórias, sendo que em cada execução uma média de 6×10^7 avaliações da função de mérito foram necessárias para que o algoritmo convergisse.

Método 2: Assimetria. Outra proposta utilizada para determinar o perfil de altura de cada membrana da hemácia foi escrever $h_1(\vec{\rho})$ e $h_2(\vec{\rho})$ em termos da espessura ($H(\vec{\rho})$) e de uma assimetria ($\zeta(\vec{\rho})$). Como vimos pela figura (4.2), à medida que 'varremos' o plano focal da objetiva acima ($\Delta f > 0$) e abaixo ($\Delta f < 0$) do plano médio da hemácia ($\Delta f = 0$) vemos que o contraste é não homogêneo ao longo do raio da hemácia, validando a idéia que existe sim, uma assimetria devido à geometria da hemácia. Desta forma, a inserção da assimetria à expressão do contraste MD é bastante razoável. Sendo assim, sabendo que $H = h_1 + |h_2|$ e, escrevendo a diferença entre os perfis de altura das membranas como $\zeta = h_1 - |h_2|$, de modo que o perfil de altura para a membrana superior e inferior será dado, respectivamente por:

$$h_1(\vec{\rho}) = \frac{H(\vec{\rho}) + \zeta(\vec{\rho})}{2} \quad e \quad h_2(\vec{\rho}) = \frac{-H(\vec{\rho}) + \zeta(\vec{\rho})}{2}. \quad (4.12)$$

Partindo deste resultado, podemos reescrever a expressão para o contraste (equação 4.2) para uma dada posição focal em termos de H e ζ :

$$\langle C_1 \rangle = \frac{\Delta n}{n_0} \left[(\Delta f_1 \nabla^2 H - \frac{\zeta}{2} \nabla^2 H - \frac{H}{2} \nabla^2 \zeta) \right], \quad (4.13)$$

desde que os parâmetros Δn , n_0 , H , $\langle C_1 \rangle$ e Δf_1 sejam conhecidos e, lembrando que obtemos H por meio da equação 4.9, a única informação que nos falta é a ζ . Com a finalidade de determiná-la, reescrevemos a equação 4.13 como,

$$\nabla^2 \zeta + \frac{\nabla^2 H}{H} \zeta = \frac{2}{H} (\Delta f_1 \nabla^2 H - \frac{n_0 C(\Delta f_1, \vec{\rho})}{\Delta n}), \quad (4.14)$$

para $\Delta f_1 = 0$, temos,

$$\nabla^2 \zeta + \frac{\nabla^2 H}{H} \zeta = -\frac{2n_0 C(0, \vec{\rho})}{H \Delta n}. \quad (4.15)$$

A equação 4.15 corresponde à uma equação de Helmholtz não-homogênea com coeficientes variáveis e foi utilizada para determinar a assimetria ($\zeta(\vec{\rho})$). A variável $\zeta(\vec{\rho})$ foi obtida por meio de métodos computacionais, conforme será descrito abaixo. Após obtido $\zeta(\vec{\rho})$, temos todas as informações necessárias para determinar outros parâmetros que também caracterizam a forma da célula.

✓ Programa 4: Imagem 3D Total

A fim de obtermos a variável $\zeta(\vec{\rho})$, utilizamos o algoritmo *Trust-region-reflective* na função do Matlab - *lsqcurvefit*. Esta função de ajuste é baseada no método de mínimos quadrados. A essência por trás desta função é encontrar o coeficiente ζ que retorna o melhor ajuste para a equação 4.15, de forma que a soma dos quadrados dos resíduos seja mínima

$$\min_x \sum_i (F(\zeta, xdata_i) - ydata_i)^2, \quad (4.16)$$

com $F(\zeta, xdata_i)$ representando a função $\nabla^2 \zeta + \frac{\nabla^2 H}{H} \zeta$ e $ydata$ dado por $-\frac{2n_0 C(0, \vec{\rho})}{H \Delta n}$.

Para realizar o ajuste, o *lsqcurvefit* necessita de um valor inicial para ζ . A fim de testarmos a robustez do método, utilizamos várias condições iniciais para ζ . Estas condições consistem em matrizes compostas por zeros, por uns e por números aleatórios variando entre $[-1;1]$. A matriz composta de números aleatórios foi gerada usando a função *rand* do Matlab, sendo o tamanho

da matriz determinado pelo tamanho da imagem. Em nosso caso, as imagens são quadradas contendo 128×128 pixels. Na figura 4.6(a), apresentamos o perfil radial médio da ζ retornado para 20 diferentes condições iniciais com a respectiva dispersão (área em cinza), para uma hemácia normal. Por este resultado, vemos que a convergência do ajuste é bastante robusta. O mesmo

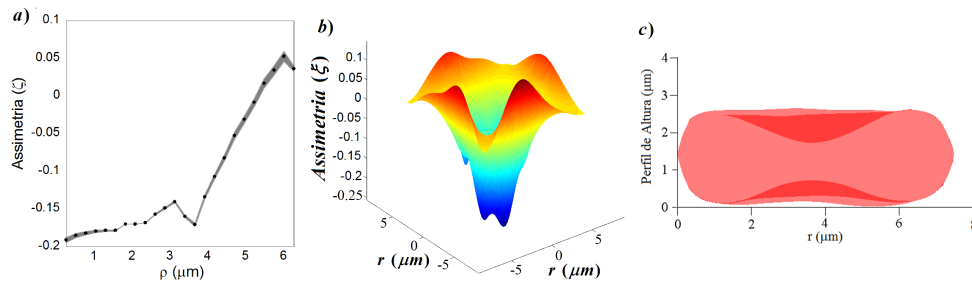


Figura 4.6: Em (a) temos o perfil radial médio da assimetria de uma hemácia normal e, a área em cinza representa a dispersão relativa à média sobre 20 condições iniciais diferentes para ζ . As condições iniciais consistiram em matrizes de 128×128 de zeros, uns e de números aleatórios. Em (b) temos a imagem 3D da assimetria retornada pelo ajuste da equação 4.15 usando a função *lsqcurvefit* para uma hemácia em condição isotônica e em (c) sua respectiva imagem 3D total.

teste foi realizado em outros tipos de hemácias analisadas nesta tese, e a mesma robustez foi observada. Todas as condições iniciais foram realizadas com $\vec{\zeta} = 0$. O critério de parada usado na rotina de otimização foi quando o programa convergiu para uma solução estável. Para isso, avaliamos a função tolerância TolFun^{‡‡} para diferentes condições iniciais e, verificamos que quando a função TolFun for menor ou igual a 10^{-3} , a solução retornada para ζ é estável. Para imagens de 128×128 pixels, o programa leva aproximadamente 7200 s para ser finalizado utilizando um computador desktop (Intel Core i7, 3.4 GHz, 32 GB de memória RAM). Para imagens de 64×64 pixels este tempo diminui para aproximadamente 300 s^{§§}. Em média, após 10 itera-

^{‡‡}Define a tolerância da função objetivo (equação 4.16) que o programa minimiza.

^{§§}As imagens de 128×128 pixels podem ser facilmente transformadas em imagens de 64×64 pixels. Para isso, basta utilizar a sequência de comandos *Image > Scale* no ImageJ. Para esta nova janela, o pixel agora será de $0.196 \mu m$ (CMOS, objetiva 100 \times).

ções o algoritmo converge. Como saída do programa, temos a matriz ζ , que serve de parâmetro de entrada para executar as demais rotinas. Neste programa foram escritas as rotinas para gerar os perfis $h_1(\vec{\rho})$ e $h_2(\vec{\rho})$, conforme descrito pela equação 4.12. Ao empregarmos a função *surf*, responsável por gerar o plot 3D de superfícies do Matlab, no perfil $H(\vec{\rho}) = h_1(\vec{\rho}) + |h_2(\vec{\rho})|$, geramos a imagem 3D total do objeto, conforme apresentada na figura 4.6(c). Por esta figura, vê-se que a membrana inferior não aderiu completamente ao substrato. Além disso, exibiu um perfil de altura mais achatado do que apresentado pela membrana superior. Com o intuito de obtermos uma visualização mais completa da forma e das deformações das membranas da hemácia, criamos uma rotina em Matlab que permite gerar um vídeo^{¶¶} da imagem 3D total da hemácia sob diferentes ângulos. Na figura 4.7 temos ilustrado algumas imagens 3D totais de uma hemácia normal retiradas do filme.

Os perfis de altura h_1 e h_2 de cada membrana da hemácia obtidos, por cada método brevemente descrito acima e para cada solução avaliada nesta tese, bem como a imagem 3D total, serão apresentados no próximo capítulo.

4.1.5 Métodos para a determinação do Índice de Refração de Hemácias

Através da análise do índice de refração das hemácias, cujo citoplasma é constituído basicamente por hemoglobina, pode-se caracterizar o estado fisiológico do corpo. No caso de hemácias de pacientes com diabetes foi verificado que as propriedades refrativas são bastante diferentes das hemácias normais [72]. Na literatura, os valores encontrados para o índice de refração das hemácias variam de 1.37 a 1.42 [20,73]. A discrepância entre os resultados não são apenas devido aos diferentes métodos experimentais usados, mas também devido à concentração de hemoglobina da célula e às condições experimentais.

O método para determinar o índice de refração de uma hemácia (n_{rbc}) utilizando a MD consiste em comparar o valor máximo da altura do perfil

^{¶¶}Os vídeos são rotações sobre uma hemácia estática, que é rotacionada inicialmente em z e então sobre o eixo x de 360° .

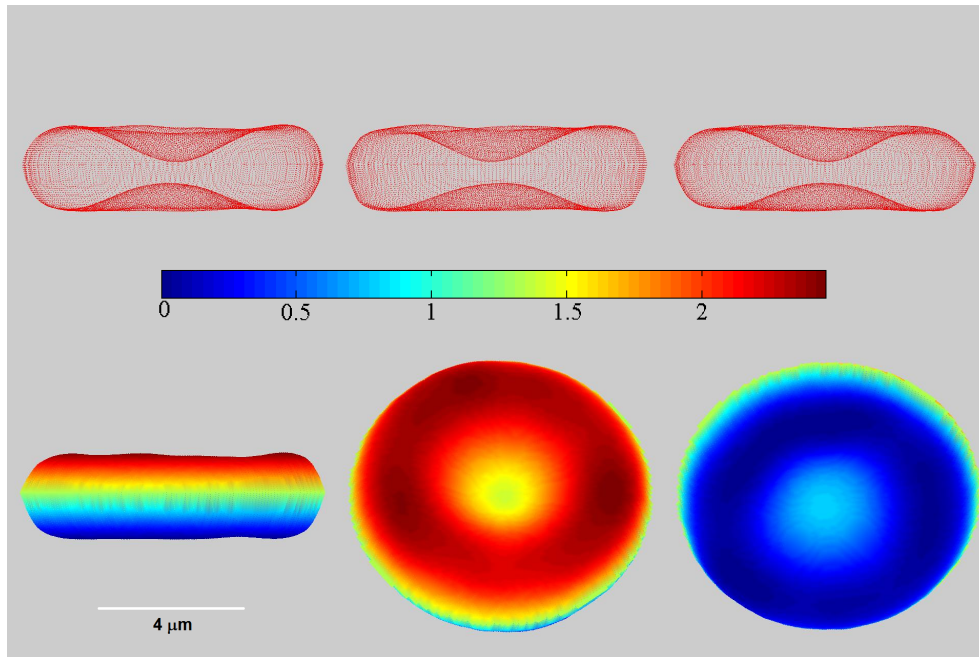


Figura 4.7: Imagem 3D total de uma hemácia em solução isotônica visualizada sob diferentes ângulos. A barra de cores representa a espessura da hemácia em μm .

da membrana inferior da célula h_{2m} , obtido a partir de dois procedimentos distintos: medição direta e mapa de altura de h_2 . A representação do experimento pelo método direto pode ser vista na figura 4.8 (a). Em uma lamínula limpa, depositamos bolinhas de poliestireno de diâmetro $0.198 \mu m$ e esperamos que elas sequem sobre o substrato. Em seguida, depositamos as hemácias sobre a lamínula e, esperamos que elas adiram ao substrato (15 – 30 minutos). Escolhemos então uma região com hemácia e bolinhas e, realizamos uma varredura em z à fim de localizarmos a posição de contraste mínimo de uma bolinha de poliestireno (z_b) e a posição de contraste mínimo da hemácia (z_{rbc}). Estas posições ocorrem quando o plano focal da objetiva coincide com o diâmetro da bolinha e o plano de maior diâmetro da hemácia, respectivamente.

Desde que não haja absorção da luz, a intensidade média espacial da imagem completa é igual a intensidade do *background*, $\langle I \rangle_{\rho} = I_0 = (1/N_P) \sum_i I_i$, onde N_P é o número total de pixels da imagem e I_i é a inten-

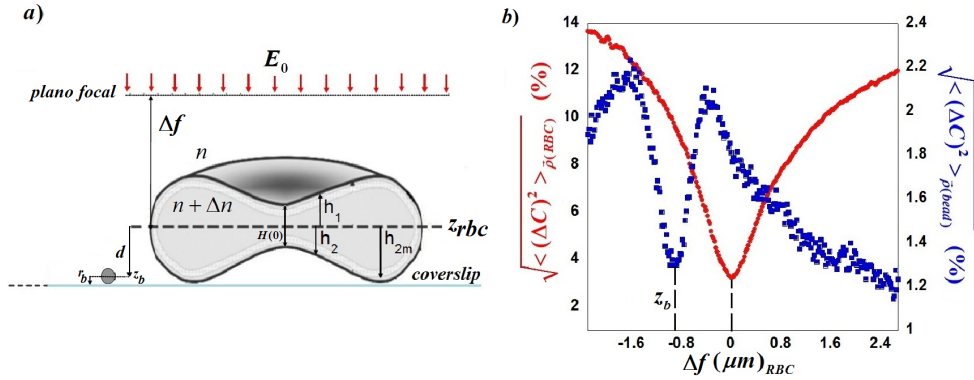


Figura 4.8: (a) Representação do sistema experimental utilizado na determinação do índice de refração com o sistema de referência no plano de contraste mínimo da hemácia z_{rbc} . Com z_b representando o plano médio da bolinha, Δf a distância entre o z_{rbc} e o plano focal da objetiva e h_1 e h_2 são as coordenadas da membranas superior e inferior, com relação plano z_{rbc} , respectivamente. Em (b) Temos o perfil do desvio padrão do contraste em função de Δf da hemácia e da bolinha. O perfil de ambos os valores são claramente determinados, e a distância entre eles é $|d|$, tal que $|h_{2m}| = |d| + |r_b| = |d| + 0.099 \mu m$.

sidade de cada pixel. Com a finalidade de determinarmos a posição de contraste mínimo, calculamos o desvio padrão da intensidade média (espacial) I para cada frame e dividimos por I_0 , o qual corresponde a $\sqrt{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2} / \langle I \rangle = \sqrt{\langle \Delta C^2 \rangle_{\bar{\rho}}}$, com $\langle I^2 \rangle = (1/N_P) \sum_i (I_i)^2$. Na figura 4.8(b), apresentamos o comportamento de $\sqrt{\langle \Delta C^2 \rangle_{\bar{\rho}}}$ como função de Δf , a partir do qual os valores de mínimo de $\sqrt{\langle \Delta C^2 \rangle_{\bar{\rho}}}$ para uma hemácia ($\Delta f = 0$) e da bolinha de poliestireno ($\Delta f = z_b$) são claramente determinados. Sabendo essas quantidades, determinamos $|h_{2m}| = |d| + |r_b| = |d| + 0.099 \mu m$. Para a determinação do índice de refração das hemácias em solução hipotônica, isotônica e hipertônica foram realizadas 3 medidas no conjunto hemácia/bolinha e, para cada conjunto o experimento foi repetido 3 vezes. Como a taxa de captura utilizada foi de 15 fps e a varredura em z foi realizada com velocidade de $v = 0.1 \mu m/s$, a precisão na determinação de d é de aproximadamente $0.04 \mu m$ (± 3 frames).

No segundo procedimento, utilizamos o mapa de altura da membrana inferior da célula h_2 , porém definindo $\frac{\Delta n}{n_0} = \frac{n_{rbc} - n_{sol}}{n_0} \equiv 1$ como parâmetro

de entrada no programa de imagem 3D total (programa 4). Seguindo as operações citadas na seção anterior, o programa retornará o mapa de h_2 da célula, reescalado pelo fator $\frac{\Delta n}{n_0} \equiv 1$. Uma média angular sobre este mapa de altura nos retorna o perfil $h_2 \frac{\Delta n}{n_0}$, com o valor máximo correspondendo a $h_{2m} \frac{\Delta n}{n_0}$. Por fim, comparamos este valor com o obtido pelo método direto, e determinamos a constante real $\frac{n_0}{\Delta n}$. Desde que n_0 e n_{sol} sejam conhecidos, o valor de n_{rbc} é determinado. Neste segundo procedimento foram usadas duas imagens de contraste para cada hemácia, sendo uma em $\Delta f = 0$ e a outra em $\Delta f = 2 \mu m$, as quais são retiradas do vídeo em z , obtido no método 1. Os resultados obtidos serão apresentados no próximo capítulo.

4.2 Flutuação Quadrática Média MD

4.2.1 Métodos para determinar flutuação em altura e parâmetros elásticos das membranas

Uma característica importante das membranas celulares é a sua flutuação em altura em relação à sua posição média. Estas flutuações geram flutuações de contraste, de forma que a flutuação quadrática média do contraste*** ($\langle (\Delta C)^2 \rangle$) contem informações da mecânica da membrana. A fim de acessarmos estas flutuações em altura, desenvolvemos um método no qual necessitamos apenas da medida da flutuação quadrática média do contraste $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ de hemácias em uma única posição focal Δf . Nesta tese utilizamos uma desfocalização de $2 \mu m$, acima do plano médio da célula, que proporciona um contraste com boa razão sinal/ruído. As medidas de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ foram feitas a uma taxa de 333 fps com duração de 30 segundos o que representa aproximadamente 10^4 frames.

Como feito anteriormente com o contraste MD, temos que a equação para a flutuação quadrática média MD (equação A.77) com a origem do eixo z no

***Representa uma medida das flutuações temporais em torno da forma de equilíbrio, $\Delta C(\rho, t) = C(\rho, t) - \langle C \rangle$. Em outras palavras, a medida da flutuação quadrática média de uma variável x ao longo do tempo é uma medida da sua dispersão estatística, indicando quão longe em geral os seus valores se encontram do valor médio $\langle x \rangle$ ao longo do tempo.

plano médio da célula (z_{rbc}) é dada por,

$$\langle \Delta C^2(\vec{\rho}) \rangle = (\Delta n k_0)^2 \int_q q dq \left[|u_1(\vec{q})|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{\Delta f - h_1(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) + |u_2(\vec{q})|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{\Delta f + |h_2(\vec{\rho})|}{2k} q^2 \right) \right]. \quad (4.17)$$

Como k , Δf , Δn , $\langle (\Delta C(\vec{\rho}))^2 \rangle$, h_1 , h_2 e os vetores de onda (\vec{q}) são conhecidos, o único fator a ser inserido são os espectros de potência $|u_{1/2}(\vec{q})|^2$. Sabendo a forma desses espectros, a flutuação de altura de cada membrana,

$$\langle |u_{1/2}(\vec{\rho})|^2 \rangle = \int_q \langle |u_{1/2}(\vec{q})|^2 \rangle q dq, \quad (4.18)$$

pode ser determinada por métodos computacionais. Nesta tese modelamos o espectro de potência para cada membrana de acordo com o modelo proposto por Gov *et al.*, os quais são descritos por,

$$\langle |u_1(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_{c1} q^4 + \sigma_1 q^2 + \gamma_1}, \quad \langle |u_2(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_{c2} q^4 + \sigma_2 q^2 + \gamma_2}, \quad (4.19)$$

com os parâmetros k_c , σ e γ como apresentados no capítulo 2. No entanto, como temos acesso à flutuação de contraste para vários pontos ao longo do raio ρ da hemácia, supomos que os parâmetros elásticos variam lentamente ao longo deste raio, podendo ser considerados como dependentes da posição ρ . Utilizando um AG foi possível ajustarmos os dados experimentais da flutuação quadrática média do contraste ($\langle (\Delta C)^2 \rangle$) para um certo Δf com as equações 4.17 e 4.19 e obtermos a flutuação em altura para cada membrana (equação 4.18).

Os intervalos de integração usados para as hemácias em solução isotônica foram $q = [0.6, 12] \mu m^{-1}$ para a membrana superior e $q = [1.2, 12] \mu m^{-1}$ para a membrana inferior. Sendo o limite inferior referente ao primeiro zero da função de Bessel para a célula com raio $R = 4 \mu m$ (membrana superior) e para $R = 2 \mu m$ (membrana inferior). Como será mostrado no capítulo 5 (figura 5.7(b)), esta diferença ocorre devido à região de contato da membrana inferior com o substrato em $R \sim 2 \mu m$, reduzindo assim, alguns vetores de onda. Estendendo essa análise para as hemácias em solução hipertônica, os

limites de integração foram $q = [0.6, 12] \mu m^{-1}$ para a membrana superior e $q = [0.8, 12] \mu m^{-1}$, para a membrana inferior. Com base nos resultados retornados pelos métodos AG e Assimetria para os perfis de altura da membrana de hemácias imersas em solução hipotônica (figura 5.7(a)), vê-se que a membrana inferior apresentou-se praticamente colada ao substrato, o que nos levou a desprezar a contribuição desta membrana na flutuação do contraste MD. Sendo assim, os limites de integração foram $q = [0.6, 12] \mu m^{-1}$. O limite superior é dado pela abertura numérica da objetiva utilizada na captura das imagens, que em nosso caso ocorre para $q_{max} = k_0 NA \sim 12 \mu m^{-1}$, limitando a resolução lateral em $\frac{0.667\lambda}{NA} = 0.3 \mu m$ [69].

✓ Programa 5: Extraindo o perfil radial de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ MD

Este programa é um plugin escrito na linguagem JAVA. Ele obtém, pixel a pixel, o nível de cinza de cada imagem do filme (8, 12 e 32bits) em contraste e em flutuação quadrática média do contraste. Como entrada desse programa deve-se selecionar uma região quadrada que englobe tanto a hemácia quanto o *background*. Além disso, deve-se entrar com o valor de calibração β , referente à equação 3.3 e o valor de nível de cinza médio do filme.

Para obter a flutuação quadrática média de cada pixel i das imagens, definimos primeiramente o valor do contraste C_i , e depois subtraímos este valor do contraste médio $\langle C \rangle_i$. Com este procedimento obtemos o desvio $(\Delta C)_i$ para um dado tempo. Ao elevarmos ao quadrado o valor para cada pixel, temos uma imagem representando $(\Delta C)_i^2$. Em seguida, calculamos uma média sobre todas as imagens coletadas, obtendo assim, a flutuação quadrática média $\langle \Delta C^2 \rangle$. Por fim, calculamos a flutuação quadrática média do contraste em função do raio através de médias angulares realizadas em anéis de espessura variáveis de 1 pixel ou 3 pixels. Como saída, o programa retorna uma tabela contendo o raio da análise, a quantidade de pixels cuja a média foi calculada para cada raio e o perfil radial da flutuação quadrática média do contraste. Este perfil radial representa a rotação de $\vec{\rho}$ em 360° . Para eliminar possíveis flutuações de contraste inerentes ao processo de captura das imagens subtraímos o valor da flutuação quadrática média do *background*.

Adaptação do AG para análise de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$

Nesta tese também utilizamos o AG para obter os espectros de potências $\langle |u_1(\vec{q})|^2 \rangle$ e $\langle |u_2(\vec{q})|^2 \rangle$ (equação 4.19) a partir de um ajuste da equação 4.17. A procura foi iniciada com uma população aleatória de x indivíduos 20 vezes maior do que o número de variáveis da equação de ajuste. Na equação 4.17 cada indivíduo na população é descrito pelos parâmetros elásticos κ_1 , κ_2 , γ_1 , γ_2 , σ_1 e σ_2 . Esses 6 parâmetros referem-se aos parâmetros elásticos da membrana superior e inferior (em contato com o substrato). Os parâmetros elásticos foram postos a variar ao longo do raio da hemácia, tendo como número de variáveis 6 e a quantidade de pontos ρ (25 pontos - isotônica), o que corresponde a um total de 150 variáveis e, uma população inicial de 3000 indivíduos. Como cada parâmetro elástico possui uma faixa de valores particular, foi definida uma região de busca inicial para cada parâmetro para todos os grupos de soluções. A região de busca foi então: $k_c = [0, 100]k_B T$, $\gamma = [0, 50000]k_B T/\mu\text{m}^4$ 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 ($T = 298K$). É importante ressaltar que os limites foram continuamente modificados até que a zona de convergência do algoritmo fosse alcançada. Os resultados finais, para cada parâmetro e para cada solução, foram obtidos com os seguintes limites:

Tabela 4.1: Membrana superior - Limites finais para cada parâmetro e para cada solução avaliada.

Solução	k_{c1}	σ_1	γ_1
mOsm/kg	$k_B T$	$k_B T/\mu\text{m}^4$	$k_B T/\mu\text{m}^2$
Hipotônica	[0, 25]	[0, 300]x10 ³	[0, 300]x10 ³
Isotônica	[0, 60]	[0, 220]x10 ³	[0, 80]x10 ³
Hipertônica	[0, 30]	[0, 130]x10 ³	[0, 180]x10 ³

Para avaliação dos indivíduos ao longo das gerações utilizou-se novamente o cálculo da função de mérito (equação 4.11), na qual T é o conjunto de dados $\langle (\Delta C(\vec{\rho}))^2 \rangle$. Além disso, o algoritmo foi encerrado quando o valor retornado pela função 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 pre-

Tabela 4.2: Membrana inferior - Limites finais para cada parâmetro e para cada solução avaliada.

Solução	k_{c2}	σ_2	γ_2
mOsm/kg	$k_B T$	$k_B T / \mu\text{m}^4$	$k_B T / \mu\text{m}^2$
Hipotônica	—	—	—
Isotônica	[0, 30]	[0, 500]x10 ³	[0, 220]x10 ³
Hipertônica	[0, 30]	[0, 500]x10 ³	[0, 220]x10 ³

cisão de 10^{-10} nos dados de flutuação de contraste $\langle (\Delta C(\vec{\rho}))^2 \rangle$. 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 mérito foram necessárias para que o algoritmo convergisse.

Capítulo 5

Resultados e Discussões

5.1 Análise do Contraste MD

5.1.1 Perfil de Espessura - $H(\vec{\rho})$ e Volume

A partir da análise do contraste MD de hemácias em duas posições focais diferentes determinamos o mapa de espessura de hemácias sujeitas a soluções com diferentes osmolalidades [figura 5.1 (a - c)]. A partir deste mapa, a reconstrução tridimensional da espessura [figura 5.1 (d - f)] para cada célula também foi obtida. Como pode ser visto pela barra de cores (legenda abaixo da figura), cada célula possui uma distribuição de espessura particular. Já na figura 5.1(g - i) apresentamos o perfil radial médio de espessura para 25 hemácias para cada osmolalidade avaliada. Através destes resultados, fica evidente que osmolalidade do meio é capaz de induzir mudanças na forma da célula. Em meio hipotônico [figura 5.1(a)], as hemácias incham devido ao influxo de água e perdem a forma bicôncava característica do meio isotônico [figura 5.1(b)]. Em meio hipertônico [figura 5.1(c)], as hemácias sofrem um efluxo de água, de tal modo que as células adquirem um perfil bicôncavo mais pronunciado na região central. A partir do perfil de espessura, o volume de cada célula foi determinado. O volume médio encontrado para as 25 hemácias para cada osmolalidade avaliada está apresentado na tabela 5.1, os quais estão de acordo com os valores reportados por outras técnicas [20,29,73,74]. Os procedimentos para determinarmos estas quantidades foram descritos no

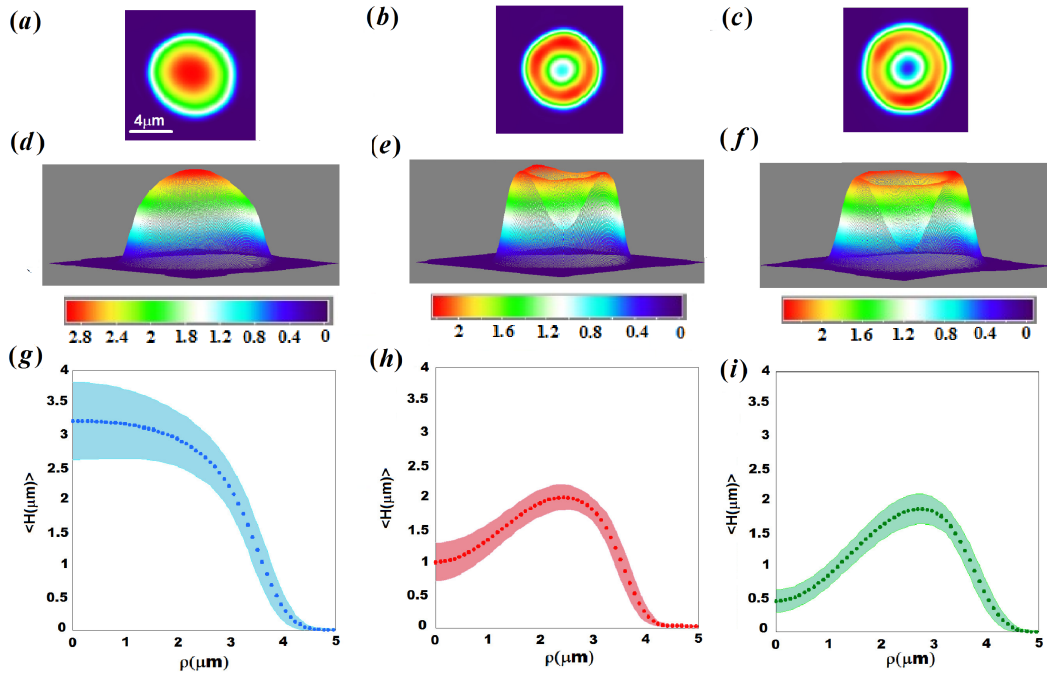


Figura 5.1: (a) Mapa de espessura de uma hemácia imersa em solução (a) hipotônica, (b) isotônica e (c) hipertônica, e suas respectivas reconstruções 3D de espessura (d - f). (g - i) Perfil radial médio de espessura para 25 hemácias analisadas em cada solução. A área sombreada representa a dispersão dos dados em relação ao valor médio.

capítulo 4 desta tese.

5.1.2 Perfil de Altura de Membranas de hemácias em solução isotônica, hipotônica e hipertônica via AG

O método computacional - AG foi empregado inicialmente por *Siman* [24,38], na análise do contraste e da flutuação do contraste MD de 42 hemácias normais. Um dos objetivos desta tese foi o de empregar o método AG na análise do contraste MD gerado por hemácias sob duas novas soluções: hipotônica e hipertônica. Isto nos permitiu determinar, inicialmente, o perfil radial de altura de cada membrana de hemácia (livre e em contato com o substrato) para estas duas novas soluções. Além disso, utilizamos os resultados obtidos desta análise para comparar com obtidos pelo novo método

Tabela 5.1: Volume médio (\bar{V}_m) obtido sobre a média de 25 hemácias sujeitas a soluções com diferentes osmolalidades.

Solução	$\bar{V}_m (\mu m^3)$
Hipotônica	129±15
Isotônica	94±8
Hipertônica	91±8

proposto nesta tese.

Os resultados retornados pelo algoritmo genético a partir da análise do contraste MD para hemácias em solução hipotônica, isotônica e hipertônica estão apresentados na figura 5.2. Na figura 5.2(a - c) apresentamos a média dos perfis radiais de altura para cada membrana h_1 e h_2 retornados pelo AG, onde h_1 é representado por pontos e h_2 por quadrados. Com o intuito de simplificarmos a notação, iremos definir $h_{1_{hipo}}$ e $h_{2_{hipo}}$ como os perfis em altura da membrana superior e inferior das hemácias em meio hipotônico, respectivamente, e $h_{1_{iso}}$ e $h_{2_{iso}}$ como os perfis em altura da membrana superior e inferior das hemácias em meio isotônico, respectivamente. Finalmente, $h_{1_{hiper}}$ e $h_{2_{hiper}}$ serão os perfis em altura da membrana superior e inferior das hemácias em meio hipertônico, respectivamente.

Analisando inicialmente $h_{1_{hipo}}$, vemos que a região central da célula exibiu uma variação absoluta em altura de $3.24 \mu m$ e de $3.00 \mu m$ no raio final, indicando um decréscimo em altura de $\sim 7\%$. Vemos também que $h_{1_{hipo}}$ diminui com o raio, assemelhando-se ao perfil radial de uma calota esférica. Já $h_{2_{hipo}}$, apresentou um perfil mais plano com variação máxima em altura de $0.01 \mu m$, provavelmente devido ao influxo de água na célula e à adesão ao substrato. Quando a hemácia recebe este tipo de choque osmótico, um volume maior de água entra pela membrana da hemácia, ocupando o citoplasma da mesma e realizando pressão de dentro para fora da célula. Isto faz com que a membrana livre ocupe a maior área possível para evitar que a hemácia estoure. Ao mesmo tempo, a membrana inferior por está próxima ao substrato adquire um formato mais plano e achatado já que ela também está recebendo pressão. Uma análise da curvatura local é apresentada em 5.2(b). O perfil radial da curvatura de $h_{1_{hipo}}$ inicia com um valor de $-0.17 \mu m^{-1}$ e

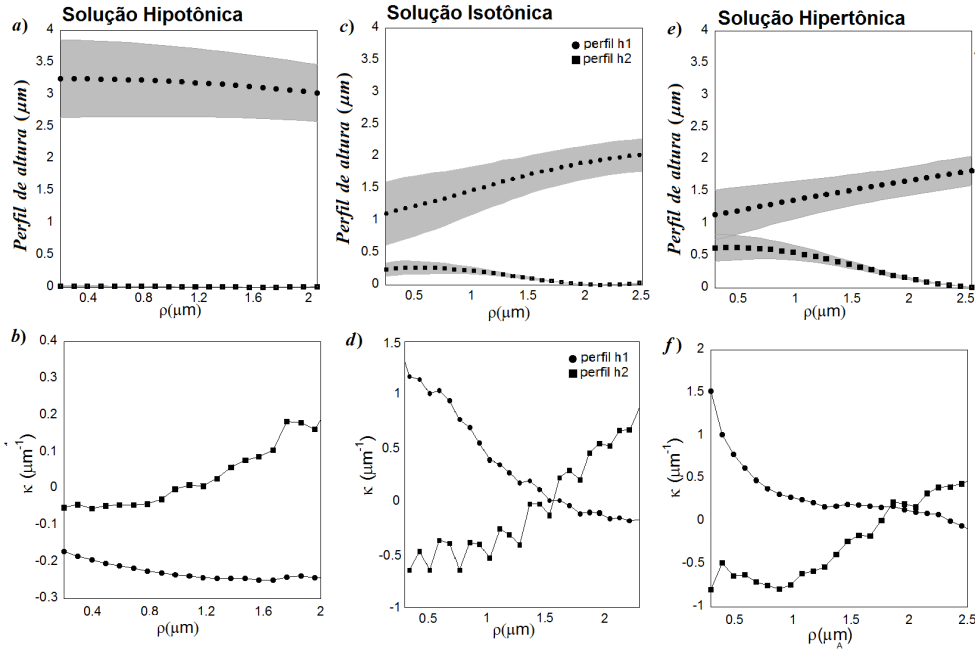


Figura 5.2: (a/c/e) temos o perfil radial de altura h_1 (pontos) e h_2 (quadrados) retornados pelo AG e a dispersão (área cinza). (b/d/f) as curvaturas locais κ_1 (pontos) e κ_2 (quadrados) para cada membrana. O gráfico (c-d) foi gentilmente cedido por Siman.

atinge uma curvatura final constante de $-0.24 \mu\text{m}^{-1}$. Já o perfil radial de curvatura para $h_{2_{hipo}}$ começa negativo em $-0.05 \mu\text{m}^{-1}$ e atinge uma curvatura final de $\sim 0.22 \mu\text{m}^{-1}$. Vemos também que $h_{2_{hipo}}$ apresenta uma inversão na curvatura no raio de $\rho = 1.00 \mu\text{m}$.

Os perfis de altura retornados pelo algoritmo para hemácias normais foram gentilmente cedidos por Siman [24] e estão apresentados na figura 5.2(c-d). Em (c), temos que a variação máxima em altura para $h_{1_{iso}}$ foi $\sim 1.00 \mu\text{m}$, enquanto que $h_{2_{iso}}$ exibe uma variação de $0.25 \mu\text{m}$. Adicionalmente, a membrana inferior $h_{2_{iso}}$ exibe um perfil de altura mais achatado, provavelmente devido a adesão celular. Por este gráfico, vemos que a região de contato da membrana ao substrato ocorre em $\sim 2.00 \mu\text{m}$. Uma análise da curvatura do perfil é apresentada em (d) e mostra que ambos perfis invertem sua curvatura próximo ao raio $\sim 1.60 \mu\text{m}$. No entanto, $h_{1_{iso}}$ começa com uma curvatura positiva de $1.5 \mu\text{m}^{-1}$ e atinge uma curvatura final constante de $-0.15 \mu\text{m}^{-1}$.

Ao contrário, $h_{2_{iso}}$ começa com uma curvatura negativa de $\sim 0.50 \mu m^{-1}$ e atinge uma curvatura final de $\sim 1.00 \mu m^{-1}$.

Os resultados dos perfis de altura médio $h_{1_{hiper}}$ e $h_{2_{hiper}}$ retornados pelo AG para hemácias imersas em solução hipertônica são apresentados na figura 5.2(e). Por este gráfico, vemos que $h_{1_{hiper}}$ exibe uma variação máxima em altura de $\sim 1.13 \mu m$, semelhante a $h_{1_{iso}}$, enquanto $h_{2_{hiper}}$ exibe uma variação de $\sim 0.62 \mu m$, ou seja, mais que o dobro exibido por $h_{2_{iso}}$. Como vemos, os perfis de altura na região central da célula estão mais próximos, exibindo uma distância média de $\sim 0.50 \mu m$ quando comparados à distância média central das hemácias normais, que foi de $\sim 0.75 \mu m$. Neste tipo de choque osmótico, devido ao efluxo de água na célula a pressão interna diminui e, na tentativa de compensar esse desequilíbrio osmótico as membranas se aproximam. Dependendo do aumento da concentração de sal no meio, a célula pode até murchar (equinócitos). Além disso, vemos que a região na qual a membrana inferior começa a entrar em contato com o substrato ocorre em $\rho \sim 2.40 \mu m$, indicando uma região maior de membrana inferior livre quando comparada a $h_{2_{iso}}$. Uma análise da curvatura do perfil é apresentada em 5.2(b) e mostra que os perfis $h_{1_{hiper}}$ e $h_{2_{hiper}}$ invertem sua curvatura próximo aos raios $\rho \sim 2.35 \mu m$ e $\rho \sim 1.30 \mu m$, respectivamente. Vemos que $h_{1_{hiper}}$ começa com uma curvatura positiva de $1.5 \mu m^{-1}$ e atinge uma curvatura final constante de $-0.06 \mu m^{-1}$. Ao contrário, $h_{2_{hiper}}$ começa com uma curvatura negativa de $\sim 0.8 \mu m^{-1}$ e atinge uma curvatura final de $\sim 0.45 \mu m^{-1}$.

Por estes resultados, fica evidente que mesmo em solução fisiológica (300 mOsm/kg), os perfis de altura e, conseqüentemente, as curvaturas locais das membranas são diferentes ao longo da extensão da célula, reforçando assim a existência de uma assimetria ligada à geometria da hemácia. A seguir apresentaremos um novo método que também nos permitiu obter os perfis de altura das membranas de hemácias e que leva em consideração esta assimetria da célula.

5.1.3 Perfil de Altura de Membranas de hemácias em solução isotônica, hipotônica e hipertônica via método de Assimetria

Usando o contraste MD de hemácias, apresentamos um novo método capaz de obter a imagem tridimensional (3D) total da célula, o qual consiste na inserção de uma assimetria (ζ) na expressão de contraste MD (equação 4.13). Por este método somos capazes de determinar por completo os perfis de altura das membranas superior e inferior das hemácias ($h_{1/2}$), separadamente. Ao utilizarmos a expressão por completo queremos dizer que todos os pontos da superfície da célula são acessados, de forma a obter uma imagem total da célula. Com o método apresentado na seção anterior somos capazes de determinar somente os perfis radiais de altura e limitados a uma certa posição radial. Com base nos resultados apresentados na seção anterior e pela análise do contraste em função da quantidade de desfocalização ao longo da extensão da célula (figura 4.2), vemos que a ideia de assimetria ligada à geometria da célula é bastante razoável.

Com a finalidade de otimizarmos os resultados que são gerados a partir da análise do contraste MD da imagem, desenvolvemos um único programa na linguagem Matlab que reúne as equações 4.9 e 4.15 e que nos permite obter tanto a espessura da célula quanto os perfis h_1 e h_2 , além de outros parâmetros que caracterizam a morfologia da célula. Os dados de entrada para este novo programa são os mesmos necessários para gerar o perfil de espessura, ou seja, duas imagens em posições focais diferentes. O programa transforma inicialmente o nível de cinza de cada pixel das imagens em contraste e calcula o raio da hemácia com base no critério da máxima derivada do contraste. Na tabela 5.2 encontra-se o raio médio relativo à média de 25 hemácias imersas em soluções hipotônica, isotônica e hipertônica.

Em seguida, o programa determina o parâmetro assimetria (equação 4.15) via método computacional. A partir deste parâmetro, executa-se as demais rotinas, as quais nos fornecem a imagem 3D total da hemácia, volume, área superficial, índice de esfericidade, perfil de espessura e os perfis de altura separadamente de cada membrana. Na figura 5.3 (a - f) é apresentada a imagem 3D total de uma hemácia em soluções hipotônica (a/d), isotônica

(b/e) e hipertônica (c/f). Como mostra a figura 5.3 (f), devido à resolução axial MD foi possível resolver distâncias de até 300 nm entre duas membranas, no centro da célula, o que confirma a estimativa feita no capítulo anterior. É importante mencionar que os três últimos pontos experimentais extremos da borda de cada interface representam médias entre seus vizinhos consecutivos, a fim de suavizar a borda da imagem.

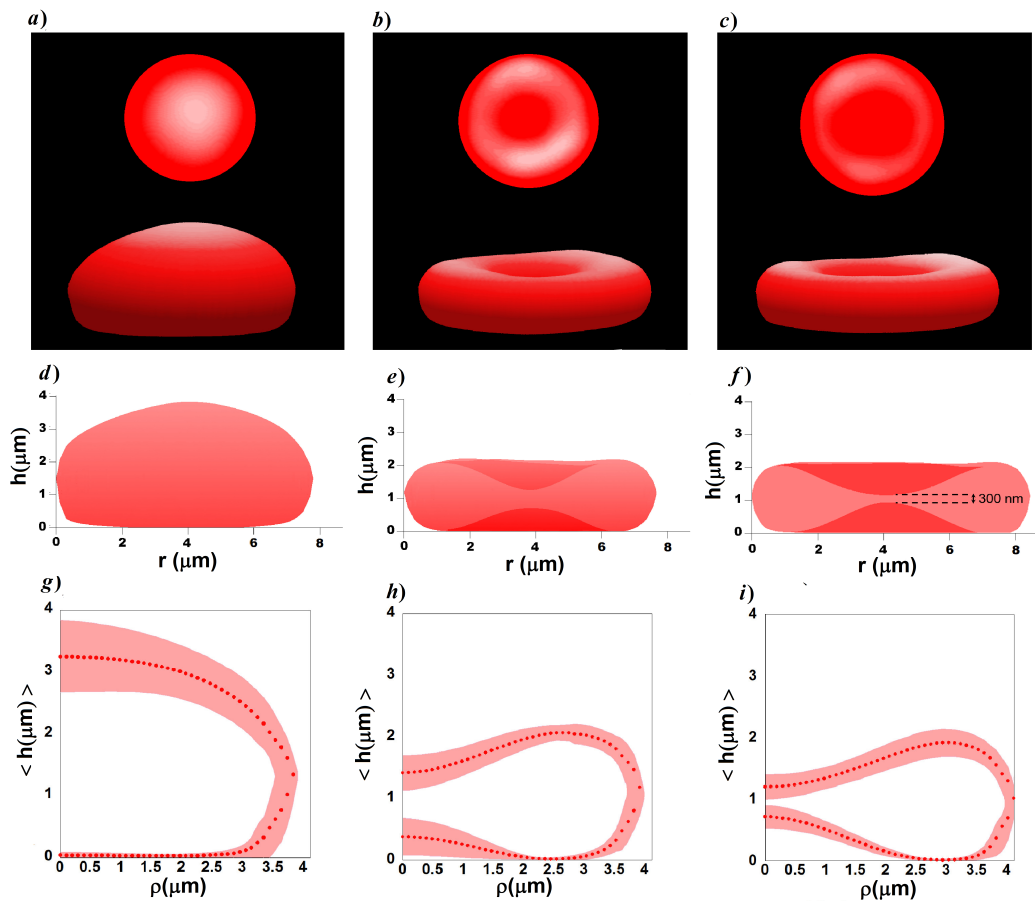


Figura 5.3: Imagem 3D total da hemácia em soluções (a/d) hipotônica, (b/e) isotônica e (c/f) hipertônica. (g-i) Perfil radial médio de altura sobre todas as células analisadas. A área sombreada representa o desvio em relação à média sobre 25 hemácias.

Os vídeos das imagens 3D totais das hemácias apresentadas na figura 5.3 (a-c) estão disponíveis em <https://www.dropbox.com/> - login: *tese.paula.fis@gmail.com* – senha : *paula29082014*.

Nas figuras 5.3(g - i) apresentamos o perfil radial médio de altura para cada grupo de hemácias sujeitas a diferentes osmolalidades. A partir destes, ficaram evidentes as diferenças entre os perfis de altura da membrana superior e inferior tanto devido às condições osmóticas do meio de imersão quanto devido à adesão da célula ao substrato. Além disso, a região de contato da membrana inferior com o substrato foi localizada. Para o caso isotônico deu-se em $\rho \simeq 2.5 \mu m$ e para o caso hipertônico em $\rho \simeq 3 \mu m$.

Desde que os perfis de altura $h_{1/2}$ sejam conhecidos, a área superficial da célula pode ser calculada como $A_{h_{1/2}} = \left[1 + \left(\frac{\partial h_{1/2}(\vec{\rho})}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial h_{1/2}(\vec{\rho})}{\partial y} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \times A_{pixel}$, onde A_{pixel} representa a área de cada pixel da imagem. A partir da área superficial e do volume, calculamos o índice de esfericidade (χ) [75], o qual nos fornece uma comparação entre o perfil da célula e de uma esfera. O índice de esfericidade é calculado como $\chi = 4.84 \frac{V^{2/3}}{A}$ e possui valores entre 0 e 1 (esfera). Na tabela 5.2, apresentamos o valor médio da área superficial e do índice de esfericidade para 25 hemácias sujeitas a diferentes soluções. Além disso, apresentamos na tabela 5.2 o valor médio do índice de refração com relação à média entre diferentes hemácias $\overline{n_{rbc}}$ ($\lambda = 610 nm$), para cada solução. Como esperado, devido ao influxo de água na célula, o $\overline{n_{rbc}}$ para as hemácias imersas em solução hipotônica apresentou-se menor do que nos outros casos avaliados. Estes resultados estão de acordo com os valores reportados por outras técnicas [20,73–76].

Tabela 5.2: Raio médio (\bar{R}_m), área superficial média (\bar{A}_m), índice de esfericidade médio ($\bar{\chi}_m$), índice de refração médio $\overline{n_{rbc}}$ obtidos a partir da análise do contraste MD de hemácias sujeitas a soluções com diferentes osmolalidades. O desvio-padrão foi determinado com relação ao valor médio de cada parâmetro.

Solução	(\bar{R}_M) (μm)	(\bar{A}_M) (μm^2)	$\bar{\chi}$ --	$\overline{n_{rbc}}$ $\lambda = 610 nm$
Hipotônica	3.85 ± 0.23	134 ± 11	0.92 ± 0.02	1.378 ± 0.003
Isotônica	3.92 ± 0.17	130 ± 9	0.77 ± 0.01	1.391 ± 0.003
Hipertônica	4.12 ± 0.20	139 ± 11	0.70 ± 0.01	1.400 ± 0.005

Após vários testes com o método de assimetria, chegamos à conclusão que independente da desfocalização Δf os perfis de altura retornados continuam

sendo os mesmos, como mostra a figura 5.4. Isto é um resultado importante da técnica MD e do método proposto, pois indica que os perfis de altura $h_{1/2}$ podem ser gerados a partir de qualquer posição focal, desde que esteja dentro do regime linear do contraste. Além disso, este resultado também indica que o método é consistente e robusto.

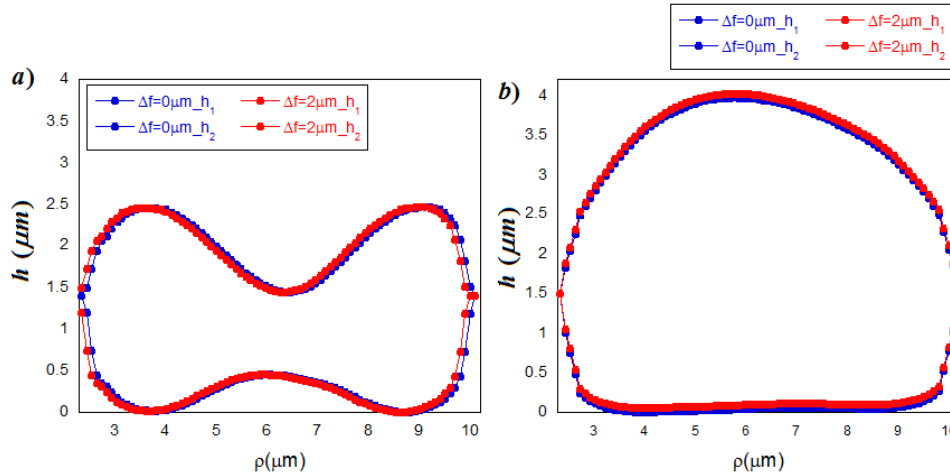


Figura 5.4: Distribuição dos perfis de altura $h_{1/2}$ para $\Delta f = 0/2 \mu\text{m}$, para uma hemácia sob condição osmótica isotônica (a) e hipotônica (b). Este resultado ilustra que independente da distância focal utilizada, o método é consistente, desde que a distância focal esteja dentro da faixa de regime linear do contraste (figura 4.2). Os perfis para $\Delta f = 2 \mu\text{m}$ foram levemente deslocados com relação à outra posição focal avaliada para uma melhor visualização do resultado.

Nas figuras 5.5 e 5.6 apresentamos um conjunto de resultados obtidos mediante à aplicação do método proposto na caracterização morfológica de hemácias na forma de alguns tipos de estomatócito e equinócito, conforme descritos por Bessis [42], respectivamente. Conforme discutido anteriormente, estas formas de hemácias são encontradas experimentalmente devido à ação de diversos tipos de estresses químicos e físicos. Os vídeos das imagens 3D totais das hemácias apresentadas nas figuras 5.5 e 5.6 estão disponíveis em www.dropbox.com - login: *tese.paula.fis@gmail.com* – senha : *paula29082014*.

A fim de compararmos os resultados obtidos por cada método (AG e Assimetria), apresentamos na figura 5.7(a-c) os resultados dos perfis radiais

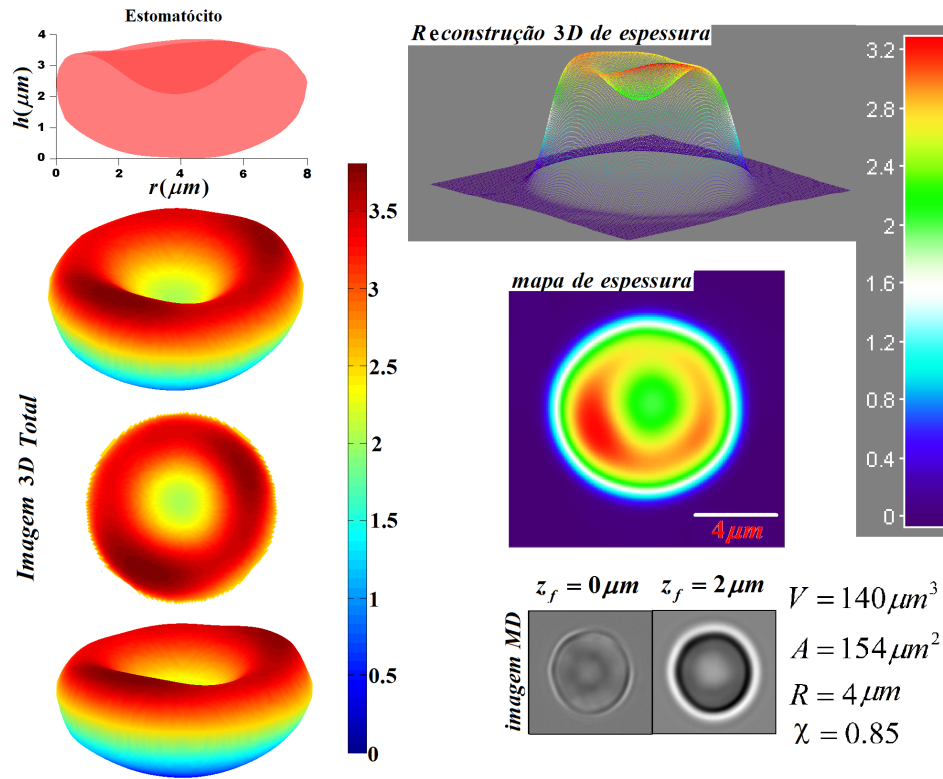


Figura 5.5: Caracterização dos parâmetros morfológicos de uma hemácia em forma de estomatócito obtidos a partir da análise do contraste MD utilizando o método Assimetria. A barra de cores representa a espessura da hemácia em μm .

em altura da membrana superior e da membrana inferior, retornados pelo método AG (pontos) e de assimetria (quadrados vazios). A área em cinza, representa a dispersão em relação à média sobre 25 hemácias, determinada através do método Assimetria, sob condição osmótica hipotônica (a), isotônica (b) e hipertônica (c). Com base nestes resultados, podemos concluir que os dois métodos são robustos para a obtenção dos perfis radiais de altura da hemácia sob todas as soluções avaliadas. Além disso, os métodos apresentam resultados bem próximos quando comparados sob as mesmas condições osmóticas sendo, portanto, validados entre si. Vale ressaltar que o método AG, além de utilizar médias radiais, faz uso também de derivadas (equação 4.10). Ao realizar estas derivadas nas regiões onde o efeito da difração começa a

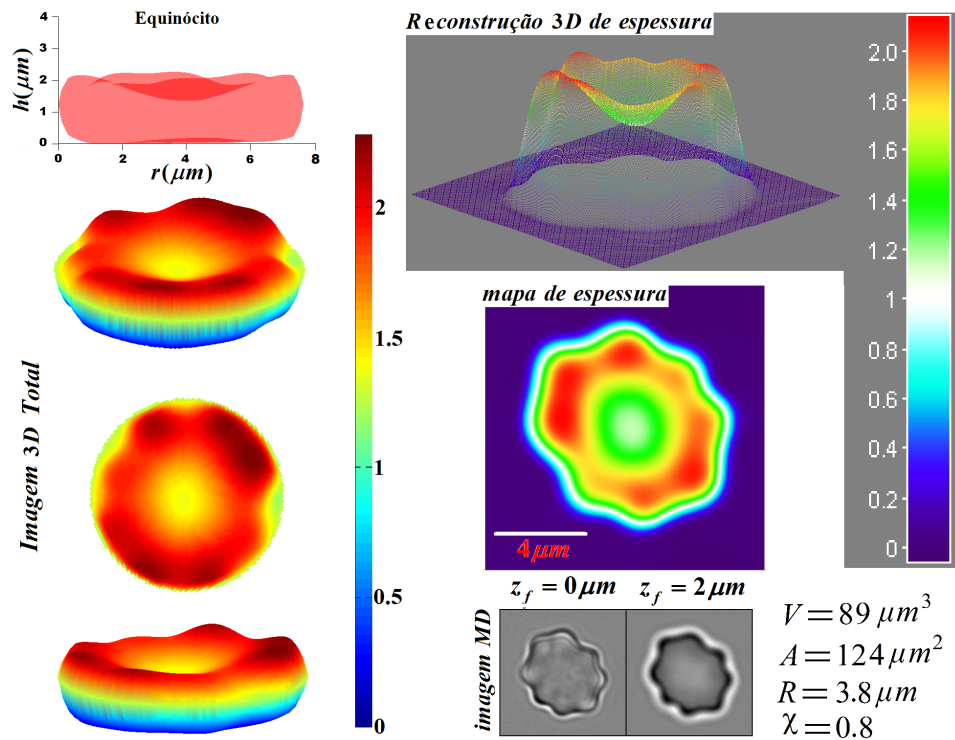


Figura 5.6: Caracterização dos parâmetros morfológicos de uma hemácia em forma de equinócito obtidos a partir da análise do contraste MD utilizando o método Assimetria. A barra de cores representa a espessura da hemácia em μm .

se mostrar mais evidente no dado experimental do contraste MD, como apresentado na figura 4.5(a-c), ocorrem erros de divergência tornando inviável a aplicação do método nestas regiões. Por isso, método AG delimita a extração dos perfis radiais em altura até $\rho = 2.5 \mu\text{m}$. Em contrapartida, o método de assimetria trabalha com integrais, evitando o problema nas regiões de difração.

Sendo assim, o método proposto nesta tese, o de obter os perfis de altura, separadamente, via Assimetria permite trabalharmos diretamente com toda a célula, sem a necessidade de realizarmos médias radiais nos dados do contraste MD e na espessura, quantidades estas essenciais para aplicação de ambos os métodos. Além disso, o método proposto independe do sistema de referência e fornece a imagem 3D total da hemácia, que pode ser acessada sob

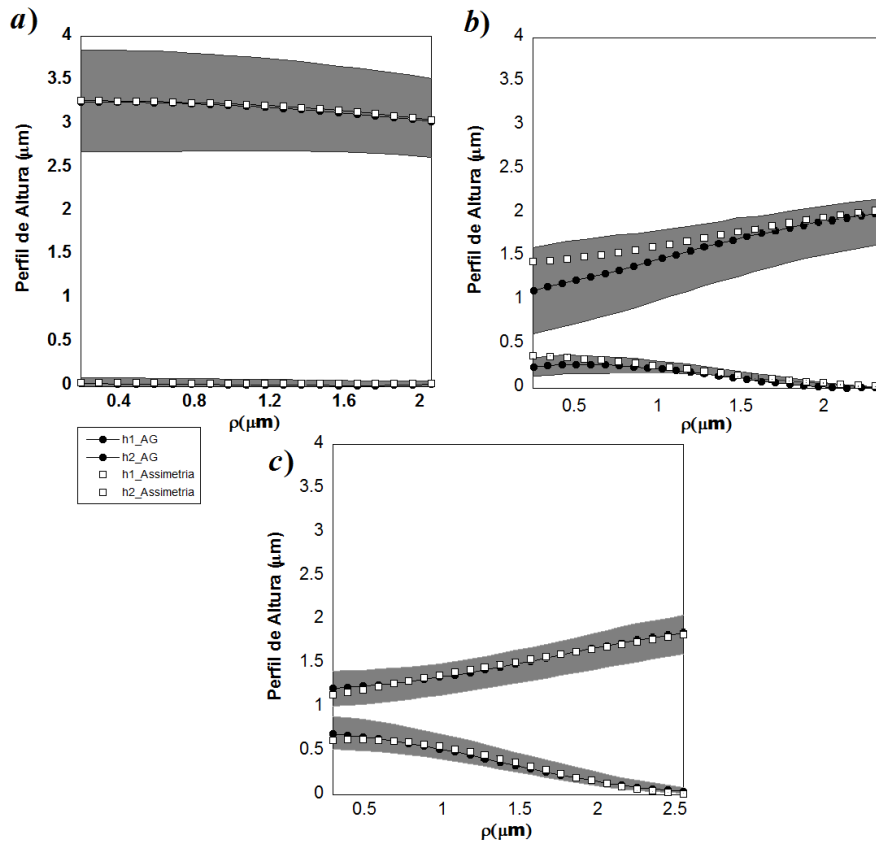


Figura 5.7: Representação dos perfis radiais médios de altura $h_{1/2}$ retornados pelos métodos AG (pontos) e Assimetria (quadrados vazios) e a dispersão (área cinza) relativa à média sobre as 25 hemácias, sujeitas a três diferentes soluções: (a) hipotônica, (b) isotônica e (c) hipertônica. A dispersão apresentada é referente ao método Assimetria.

diferentes ângulos. Este instrumento é valioso na caracterização de células. Somado a isto, temos acesso a outros parâmetros que refletem a forma da célula: raio, área superficial, volume, índice de esferecidade, índice de refração e o perfil de altura de cada membrana, separadamente. Adicionalmente, a partir do perfil de altura da membrana inferior, os pontos de adesão da célula ao substrato também podem ser aferidos.

5.2 Análise da Flutuação Quadrática Média do contraste MD $\langle \Delta C^2 \rangle$

Como visto no capítulo 4, as flutuações de altura de membranas da célula podem ser acessadas via medidas de $\langle \Delta C^2 \rangle$, supondo um espectro de potência $\langle |u(\vec{q})|^2 \rangle$ para a flutuação. Somado a isto, independentemente do espectro utilizado as flutuações em altura de cada membrana podem sempre ser acessadas, separadamente. Nesta tese utilizamos o espectro de potência mais geral da literatura [10] e com o uso de um algoritmo genético determinamos o perfil radial das flutuações em altura de cada membrana da célula. Ao acessarmos estas flutuações em altura, determinamos também os parâmetros elásticos que definem o espectro de potência proposto pelo modelo utilizado. Com base em nossos resultados, propomos também uma modelagem física com a inserção de novos termos para caracterizar a interação entre bicamada/citoesqueleto e membrana/substrato bem como, uma nova interpretação dos parâmetros. Até o presente momento, nenhuma outra técnica conseguiu avaliar esses parâmetros em função da extensão da célula.

5.2.1 Flutuação de altura das membranas

Na figura 5.8 (a - c) apresentamos o perfil radial médio da flutuação quadrática média do contraste MD relativo à média sobre 25 hemácias imersas em solução hipotônica, isotônica e hipertônica, respectivamente. A área cinza representa a dispersão em relação à média de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ sobre as hemácias avaliadas, e reflete a variabilidade natural das células. A fim de analisarmos somente a contribuição da flutuação do contraste das hemácias, os dados foram previamente subtraídos da flutuação $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ medida do *background*.

Na figura 5.8(a) apresentamos o gráfico do perfil radial médio de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ para hemácias imersas em solução hipotônica. Como pode ser visto, a flutuação é sempre decrescente ao longo do raio da célula, com valor inicial de $\sim 2.20 \times 10^{-5}$ e valor final de $\sim 1.5 \times 10^{-5}$ em $\rho = 2.30 \mu m$. Em contrapartida, o perfil radial médio de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ para hemácias imersas em solução isotônica (figura 5.8(b)), apresenta um máximo de $\sim 2 \times 10^{-4}$ em $\rho = 1.10 \mu m$ e um valor mínimo de $\sim 4 \times 10^{-4}$ em $\rho = 2.30 \mu m$. No

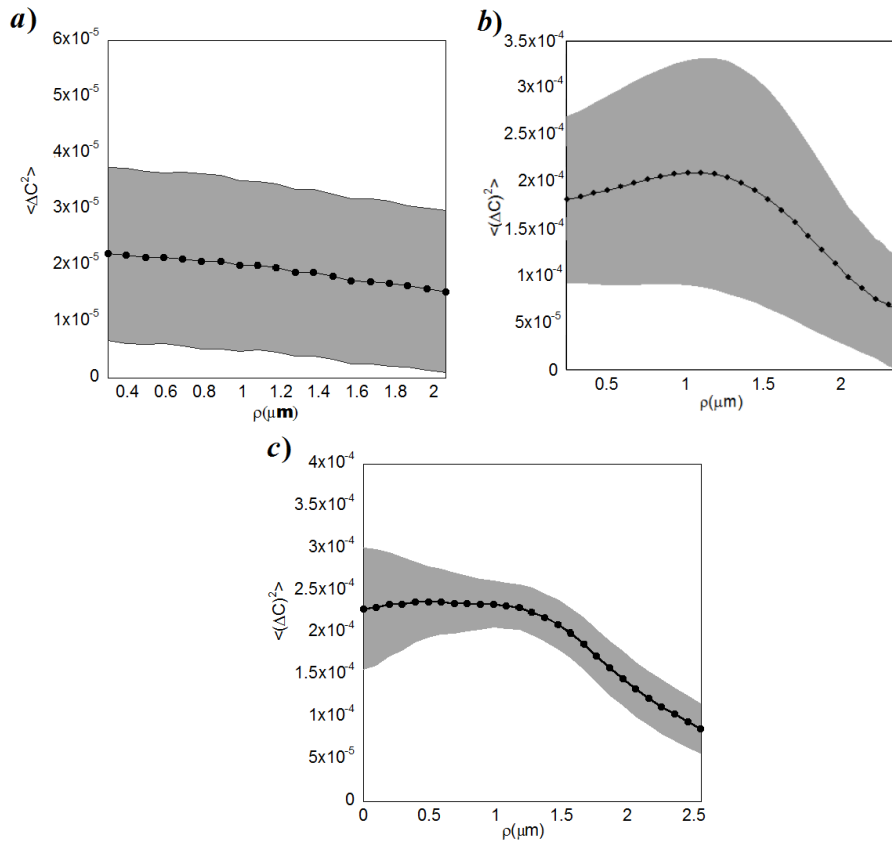


Figura 5.8: Em (a-c) representamos a média sobre todos os perfis de flutuação quadrática média das 25 hemácias em solução hipotônica, isotônica e hipertônica, respectivamente.

caso do perfil radial médio de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ para hemácias imersas em solução hipertônica (figura 5.8(c)), a flutuação possui um valor máximo $\sim 2.5 \times 10^{-4}$ em $\rho = 0.59 \mu\text{m}$ e um valor mínimo $\sim 9 \times 10^{-5}$ em $\rho = 2.50 \mu\text{m}$. Para pontos além destes raios, $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ aumenta rapidamente devido aos efeitos de difração na borda, como mostrado anteriormente para os dados de contraste. A partir destes resultados, percebe-se que hemácias com o formato mais próximo de uma esfera (solução hipotônica), em geral, apresentam uma flutuação menor ao longo de toda a sua extensão quando comparadas aos outros dois tipos de hemácias analisadas. Na figura 5.9 (a - c) apresentamos a média dos ajustes retornados pelo algoritmo genético. Os pontos representam o dado experimental e a linha contínua representa a média sobre os 10

ajustes finais.

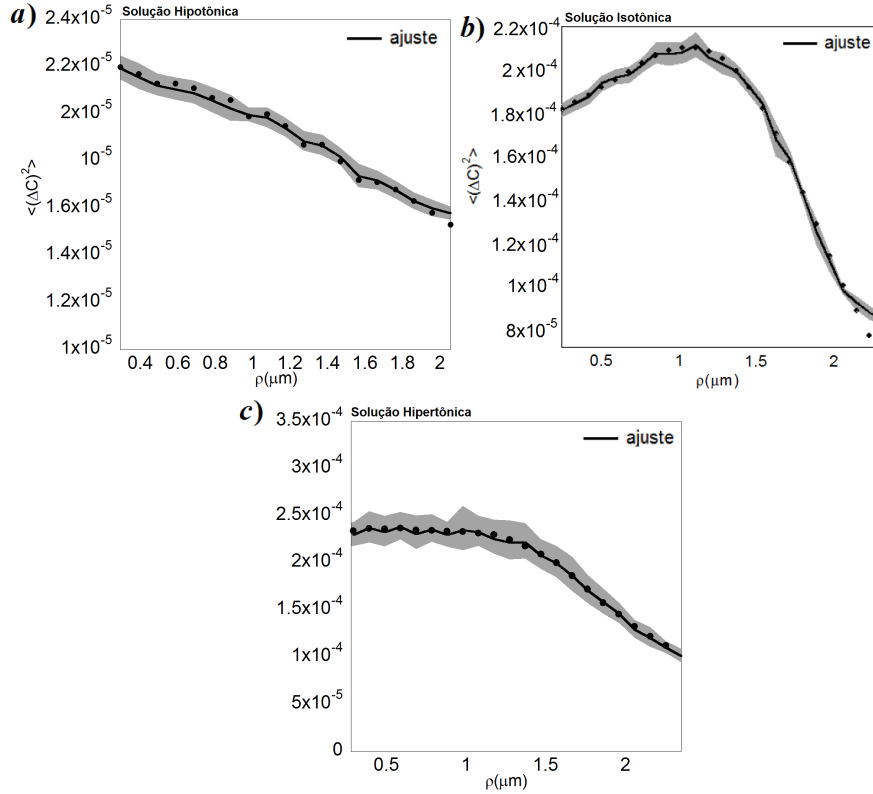


Figura 5.9: Em (a-c) apresentamos a média dos ajustes retornados pelo AG, onde os pontos representam o dado de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ e a linha contínua representa a média sobre os 10 ajustes finais. A área em cinza representa a dispersão em relação à média e reflete a variabilidade natural das células.

Na figura 5.10 (a - c) apresentamos os perfis radiais das flutuações em altura obtidos para cada membrana pelo AG. Iremos apresentar estas flutuações com valores referentes a $\sqrt{\langle |u_{1/2}(q)|^2 \rangle}$, ou seja, $u_{1/2rms}$, onde o termo *rms* vem do inglês *root mean square*. Os pontos em azul simbolizam a membrana superior das células e os quadrados em vermelho simbolizam a membrana inferior. Vemos que os valores $u_{1/2rms}$ variam de $[3 - 3.6] \text{ nm}$ (solução hipotônica), $[3 - 9] \text{ nm}$ (solução isotônica) e $[2.5 - 8] \text{ nm}$ (solução hipertônica). Como pode ser visto, as flutuações em altura para a membrana superior (pontos) são maiores do que as flutuações para a membrana inferior

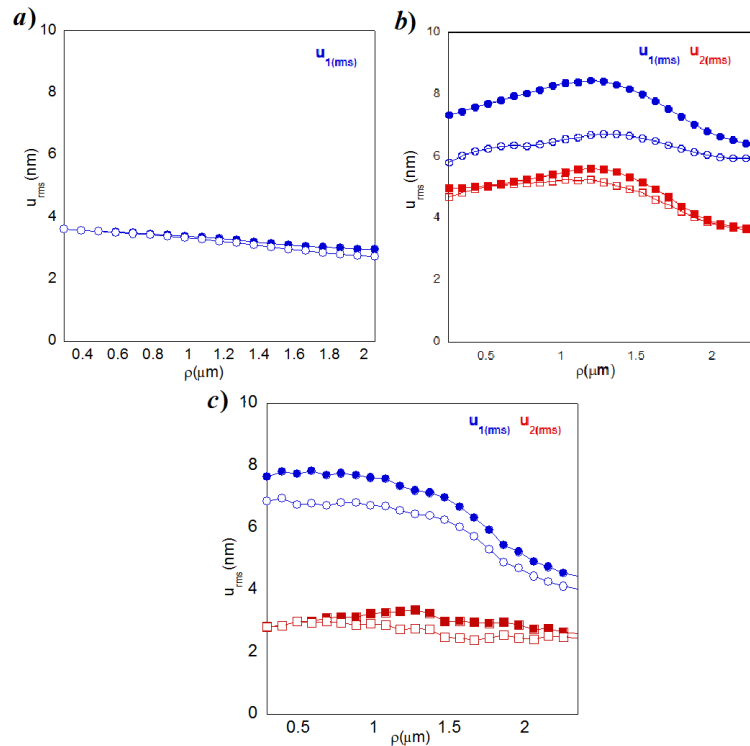


Figura 5.10: Perfis radiais das flutuações em altura em solução (a) hipotônica (b) isotônica e (c) hipertônica retornado pelo AG para cada membrana. Os pontos em azul representam a membrana superior das células e os quadrados em vermelho representam a membrana inferior. Os símbolos vazios representam as flutuações $u_{1_{rms}}$ e $u_{2_{rms}}$ corrigidas por um fator $\sqrt{4 - 3 \cos^2 \theta}$ devido ao movimento lateral da célula.

(quadrados), para todo ρ , para hemácias imersas em solução isotônica e hipertônica, mesmo na região central da célula onde a ação do substrato seria menos intensa. Acreditamos que estes resultados estejam ligados ao fato da membrana inferior estar em contato com o substrato e, ainda, nos indicam que os efeitos relativos à adesão ao substrato não são localizados e podem se estender por toda a membrana. Embora estes valores estejam abaixo das medidas reportadas por outras técnicas [7,21] para toda a célula, as flutuações em altura mostraram-se maiores em hemácias imersas em solução isotônica do que nas outras duas soluções avaliadas, resultado este também observado em [29]. Sendo assim, as medidas de flutuações da membrana podem auxiliar

na caracterização do estado fisiológico da célula.

Na figura 5.10 temos curvas representadas por pontos e quadrados vazios, que representam as flutuações $u_{1/2_{urms}}$ corrigidas pelo fator $\sqrt{4 - 3 \cos^2 \theta}$ devido ao movimento lateral da célula. Para explicarmos este fator, ilustramos na figura 5.11 as componentes da flutuação total $\langle u_{total} \rangle$ da membrana de hemácias. Estas componentes são: uma na direção da superfície da membrana, ou seja, tangencial à superfície, a qual denominaremos de u_T , e outra normal à superfície (u_N), que representa as flutuações em altura relacionadas ao espectro de potência $\langle |u(q)|^2 \rangle$. Em conjunto, temos representado o eixo z da montagem experimental, que é o eixo ao longo do qual medimos a flutuação u_z , que é a projeção em z da flutuação total u_{total} . Pela figura (b), retiramos a seguinte relação entre essas duas componentes,

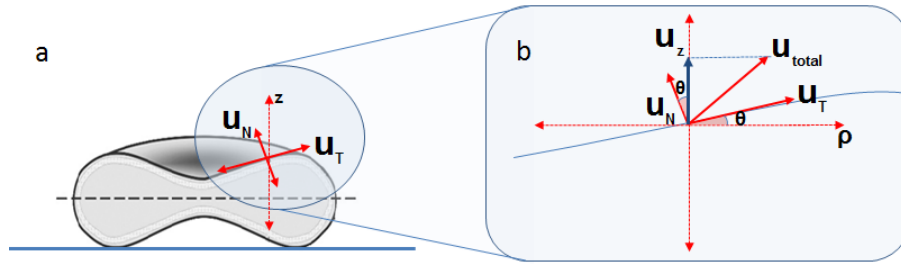


Figura 5.11: Representação das duas componentes da flutuação total u_{total} da membrana superior de uma hemácia: u_T na direção da superfície da membrana e u_N normal à superfície, que é a flutuação em altura. Na figura temos também representado o eixo z da nossa montagem experimental, que é o eixo ao longo do qual coletamos as flutuações. Na figura 5.10 as flutuações retornadas pelo AG, representam as flutuações u_z , que é a projeção em z da flutuação total.

$$\langle (u_z)^2 \rangle = \langle (u_T)^2 \rangle \cos^2 \theta + \langle (u_N)^2 \rangle \sin^2 \theta \quad (5.1)$$

ou

$$\langle (u_N)^2 \rangle = \frac{\langle (u_z)^2 \rangle - \langle (u_T)^2 \rangle \sin^2 \theta}{\cos^2 \theta}, \quad (5.2)$$

onde θ é o ângulo formado entre a flutuação medida u_z e a flutuação u_N . Projetando o ângulo θ , vemos que este é o mesmo ângulo que a superfície

da hemácia faz com a direção radial de ρ . Sendo assim, $\theta = \frac{dh}{d\rho}$, onde h é o perfil da hemácia. Na tentativa de estimarmos a magnitude dessas grandezas, podemos utilizar o valor de $u_{z(rms)}$ na região central da hemácia, onde $\theta = 0$. Nesta região $u_{T(rms)} = 0$ e, pela figura 5.10(b), vemos que $u_{N(rms)}$ é da ordem de $\sim 8 \text{ nm}$ para a membrana superior. Já no caso da flutuação tangencial a superfície da hemácia, iremos supor que esta flutuação é devido somente ao movimento de cisalhamento (movimento lateral) da célula e, se assim o for, a contribuição devido à esta flutuação pode ser aproximada por,

$$\langle (u_T)^2 \rangle \simeq \frac{k_B T}{\mu} \simeq 5 \times 10^{-16} m^2, \quad (5.3)$$

para um módulo de cisalhamento de $8 \times 10^{-6} N/m$, medido por *Popescu et al.* [29,53]. Sendo assim, o valor *rms* desta contribuição da flutuação é da ordem de 22 nm . A fim de validarmos este valor, avaliamos os vídeos de contraste obtidos via MD e fizemos uma estimativa da ordem de grandeza das flutuações de contraste nas bordas da célula. Como nesta região o movimento predominante é devido ao movimento lateral da célula, esta medida nos dá uma boa estimativa deste movimento. Para isso, aplicamos uma limiarização na imagem utilizando o comando *threshold* do ImageJ e avaliamos o deslocamento do centro de massa dos pixels nessa região. Os valores obtidos estão na faixa de 20 nm , indicando que a equação 5.3 descreve bem a flutuação tangencial à superfície da célula. Supondo que u_N e u_T não variam muito ao longo da superfície da hemácia, chegamos à conclusão que $u_T \simeq 2u_N$. Com esta relação, é possível reescrever a equação 5.2 como,

$$\langle (u_z)^2 \rangle = \langle (u_N)^2 \rangle (\cos^2 \theta + 4 \sin^2 \theta) = 4 - 3 \cos^2 \theta \quad (5.4)$$

e portanto,

$$\langle (u_N)^2 \rangle = \frac{\langle (u_z)^2 \rangle}{4 - 3 \cos^2 \theta}. \quad (5.5)$$

Sendo assim, para obtermos a contribuição somente de $\langle (u_N)^2 \rangle$, os dados de flutuação retornados pelo AG devem ser divididos pelo termo $\sqrt{4 - 3 \cos^2 \theta}$, onde o ângulo deve ser calculado a partir do perfil de cada membrana ($\theta = \frac{dh_{1/2}}{d\rho}$). No trabalho de Rappaz *et al.* [77], é proposto uma correção que leva em consideração apenas a contribuição em $\cos \theta$ da figura 5.11. Como a técnica

usada por Rappaz só é capaz de acessar informações sobre a espessura da célula (e não das superfícies individuais como a MD), o ângulo θ é calculado a partir da espessura total ($\theta = \frac{dH}{d\rho}$).

Ao aplicarmos a correção proposta no dado de flutuação u_{rms} da membrana superior (figura 5.10(a)), vemos que há uma pequena diminuição na amplitude da flutuação. Porém, o comportamento monotônico decrescente permanece. Como pode ser visto na figura 5.10(b), esta correção provoca uma pequena diminuição nas amplitudes das flutuações, suaviza os picos observados e indica que a amplitude de flutuação em altura para a membrana superior é quase constante ao longo do raio da hemácia. Para a membrana inferior, a amplitude da flutuação em altura continua a ser mínima nas regiões onde a membrana está aderida. No caso das hemácias em solução hipertônica (figura 5.10(c)) esta correção também provoca uma diminuição nas amplitudes de flutuação em ambas as membranas.

5.2.2 Parâmetros elásticos das membranas

Nesta seção apresentaremos os resultados dos perfis radiais dos parâmetros elásticos k_c , γ e σ para cada membrana de hemácias, retornados pelo AG, para as diferentes soluções avaliadas. Apresentamos inicialmente os resultados retornados para as hemácias normais (solução isotônica) e a modelagem física desenvolvida a partir do comportamento radial exibido por esses parâmetros [38]. Em seguida, tentamos aplicar esta mesma modelagem na discussão dos aspectos mecânicos da membrana de hemácias imersas em soluções hipotônica e hipertônica.

Análise de $k_{c_{1/2}}$

Os resultados para os módulos de curvatura são apresentados na figura 5.12, para a membrana superior e inferior, para as diferentes soluções: hipotônica (a), isotônica (b - c) e hipertônica (d - e). Como pode ser visto, os valores retornados estão dentro do intervalo de $[10 - 50]k_B T$, os quais estão em concordância com valores mensurados por outras técnicas [8,21,29], porém para a toda a hemácia.

De acordo com Gov *et al.* [10], o módulo de curvatura do citoesqueleto

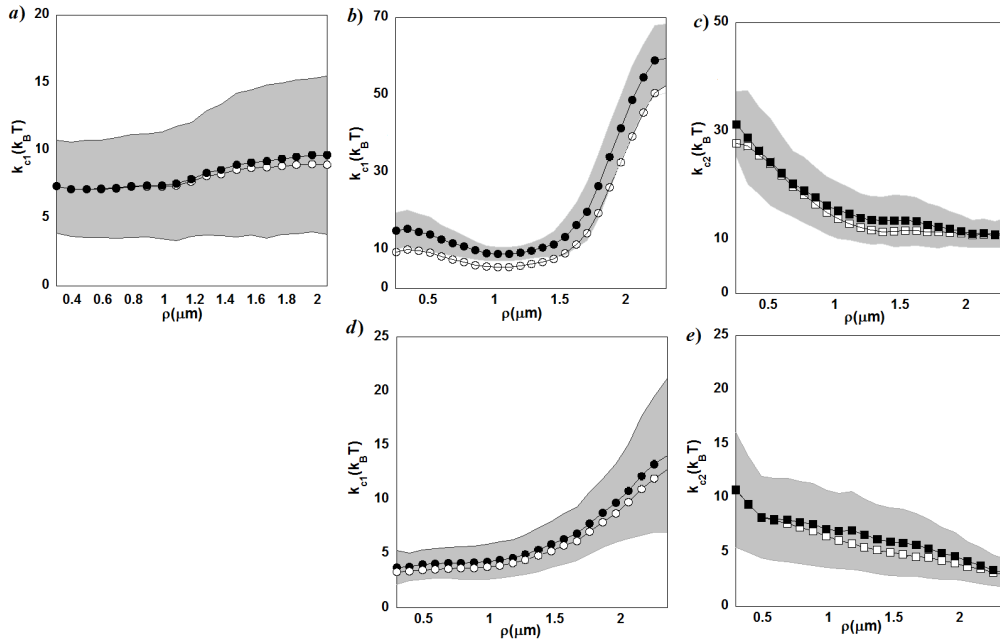


Figura 5.12: Perfil radial médio de $k_{c_{1/2}}$ para hemácias imersas em solução hipotônica (a), isotônica (b-c) e hipertônica (d-e), respectivamente. Os símbolos vazios representam o potencial sem correção e os símbolos cheios o potencial corrigido.

é negligenciável ($k_c \sim 0.6k_B T$) quando comparado ao módulo da bicamada ($k_c \sim 10k_B T$). Sendo assim, na modelagem descrita por Gov *et al.* [10], k_c é essencialmente devido à bicamada lipídica. Somado a isto, o autor considera que k_c não muda ao longo da extensão da célula, o que sugere que a composição lipídica da bicamada é a mesma em qualquer região da hemácia. Similarmente, Park *et al.* [53], utilizando uma modelagem esférica para a hemácia, verificou que o valor do módulo de curvatura independe da osmolalidade da solução no qual ela está imersa. Park *et al.* [53] obteve um valor de $k_c \approx 5k_B T$ para toda a hemácia. Surpreendente, os nossos resultados mostraram que os módulos $k_{c_{1/2}}$ variam ao longo das membranas da célula e enquanto k_{c_1} aumenta com o raio da célula, k_{c_2} diminui com o aumento do raio. Acreditamos que este efeito esteja ligado à variação da espessura d da membrana da hemácia ao longo da extensão da célula. A relação entre k_c e

a espessura d da membrana é descrita por [49],

$$k_c = \frac{K_A d^2}{\alpha}, \quad (5.6)$$

onde $\alpha = 12$ (placa uniforme), 24 (polímero *brush*) e 48 (placas deslizantes) e K_A representa o módulo de compressão. Fazendo $\alpha = 1$, temos o modelo proposto por Evans [78] para uma bicamada lipídica curvada.

Em nossa proposta, a membrana da hemácia é composta por duas superfícies finas (bicamada e citoesqueleto) localmente conectadas por proteínas específicas. Além disso, a distância total entre as superfícies d pode variar lentamente ao longo do raio da célula. Modelamos esta membrana como a estrutura representada na figura 5.13.

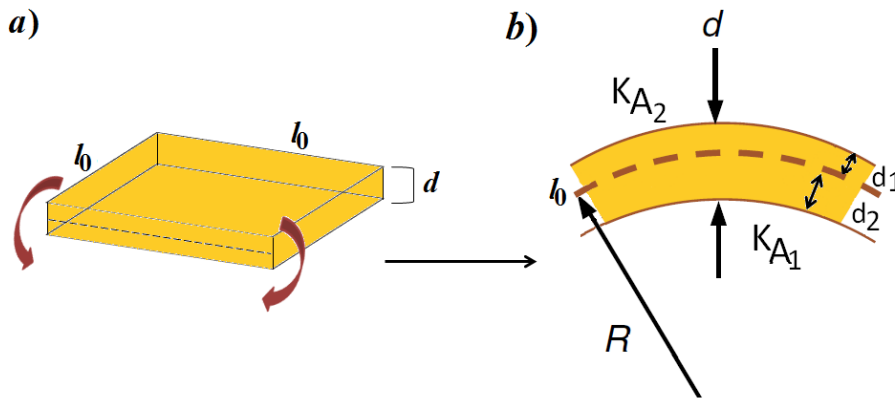


Figura 5.13: (a) Representação de uma membrana plana e quadrada, de lado l_0 e espessura d . (b) Ao curvarmos a membrana pelas extremidades resulta em uma expansão/compressão das duas superfícies. Com R o raio de curvatura definido até o plano neutro l_0 , K_{A_1} e K_{A_2} representam os módulos de expansão/compressão da superfície superior e inferior, respectivamente.

A membrana é inicialmente plana (figura 5.13 (a)), possui lado l_0 e espessura $d = d_1 + d_2$. Na figura 5.13 (b) a membrana é curvada em uma estrutura com raio de curvatura R e ângulo θ , de forma que a área superior da membrana sofre uma expansão de $\Delta A_1 = l_0 \times \Delta l_1$ e a área inferior sofre uma compressão de $\Delta A_2 = l_0 \times \Delta l_2$. Os índices 1 e 2 representam a superfície superior e inferior, respectivamente. A energia envolvida nessa

expansão/compressão [49,52] é,

$$f_t = \frac{K_{A_1}}{2} \left(\frac{\Delta A_1}{A_1} \right)^2 + \frac{K_{A_2}}{2} \left(\frac{\Delta A_2}{A_2} \right)^2. \quad (5.7)$$

Como a área inicial da membrana é $A = l_0^2$, temos que a deformação sofrida por cada área é dada por,

$$\frac{\Delta A_{1/2}}{A} = \frac{\Delta l_{1/2} \times l_0}{l_0^2}, \quad (5.8)$$

que pode ser obtida a partir da definição do ângulo θ . Da figura 5.13 (a) vemos que,

$$\theta = \frac{l_0}{R}, \quad (5.9)$$

que pode ser obtido a partir das dimensões das áreas superior e inferior,

$$\theta = \frac{l_0 + \Delta l_1}{R + d_1} = \frac{l_0 - \Delta l_2}{R - d_2}. \quad (5.10)$$

De modo que igualando os dois resultados para θ ,

$$\frac{\Delta l_1}{l_0} = \frac{d_1}{R} \quad e \quad \frac{\Delta l_2}{l_0} = \frac{d_2}{R}. \quad (5.11)$$

e a energia associada à compressão/expansão das áreas é,

$$f_t = \frac{1}{2R^2} (K_{A_1} d_1^2 + K_{A_2} d_2^2). \quad (5.12)$$

Sabendo que a expansão da superfície superior com relação à compressão da superfície inferior é inversamente proporcional aos seus respectivos módulos de expansão/compressão de área, temos,

$$d_1 = \frac{K_{A_1} d}{K_{A_1} + K_{A_2}} \quad d_2 = \frac{K_{A_2} d}{K_{A_1} + K_{A_2}}. \quad (5.13)$$

Desta forma podemos reescrever a equação 5.12 como

$$f_t = \frac{1}{2R^2} K_{A_{eff}} d^2, \quad (5.14)$$

com $K_{A_{eff}} = \frac{K_{A_1} K_{A_2}}{K_{A_1} + K_{A_2}}$. Sendo assim, o módulo K_A a ser determinado é na verdade, um módulo $K_{A_{eff}}$ efetivo, resultante do acoplamento dos módulos

de compressibilidade do citoesqueleto e da bicamada lipídica e não apenas da bicamada, como é o caso no modelo de Evans [78]. Fazendo a comparação com a energia envolvida na flexão de uma membrana,

$$f_c = \frac{k_c C^2}{2} = \frac{k_c}{2R^2}, \quad (5.15)$$

tal que a expressão para o módulo de curvatura será dada por,

$$k_c = K_{A_{eff}} d^2. \quad (5.16)$$

Um importante aspecto da equação 5.16 é o efeito das diferentes compressibilidades nas superfícies, em que a resistência de curvatura total é limitada pela superfície de menor módulo. Por este modelo, vemos que se K_{Ab} da bicamada for muito maior que K_{Ac} do citoesqueleto, o módulo de compressibilidade dominante é o do citoesqueleto. No caso contrário, $K_{Ab} < K_{Ac}$, o módulo de compressibilidade dominante é o da bicamada.

A seguir realizamos a análise do parâmetro $\gamma_{1/2}$, que nos permitiu determinar o $K_{A_{eff}}$ para cada membrana. Após conhecida esta quantidade, a espessura da membrana pôde ser obtida por meio da equação 5.16.

Análise de $\gamma_{1/2}$

Expomos na figura 5.14, os perfis radiais dos potenciais de confinamento de cada membrana de hemácias sujeitas a diferentes soluções: hipotônica (a), isotônica (b - c) e hipertônica (d - e). Como pode ser visto, estes valores estão dentro do intervalo de $[10 - 150] \times 10^3 k_B T / \mu m^4$ e possuem comportamentos radiais diferentes. Em contrapartida, para cada ponto ρ , $\gamma_2 > \gamma_1$, o que provavelmente deve estar relacionado ao fato da membrana inferior estar em contato com o substrato.

No modelo de membrana composta proposto por Auth *et al.* [13], a conexão entre a bicamada e o citoesqueleto é modelado via um potencial de confinamento. Este potencial está associado a uma força restauradora induzida ao longo de toda a bicamada lipídica devido à presença do citoesqueleto, tal que a bicamada permanece esparsamente ligada ao citoesqueleto por molas entrópicas com uma distância d fixa, e é dado por,

$$\gamma = 4\mu(2H^2 - K), \quad (5.17)$$

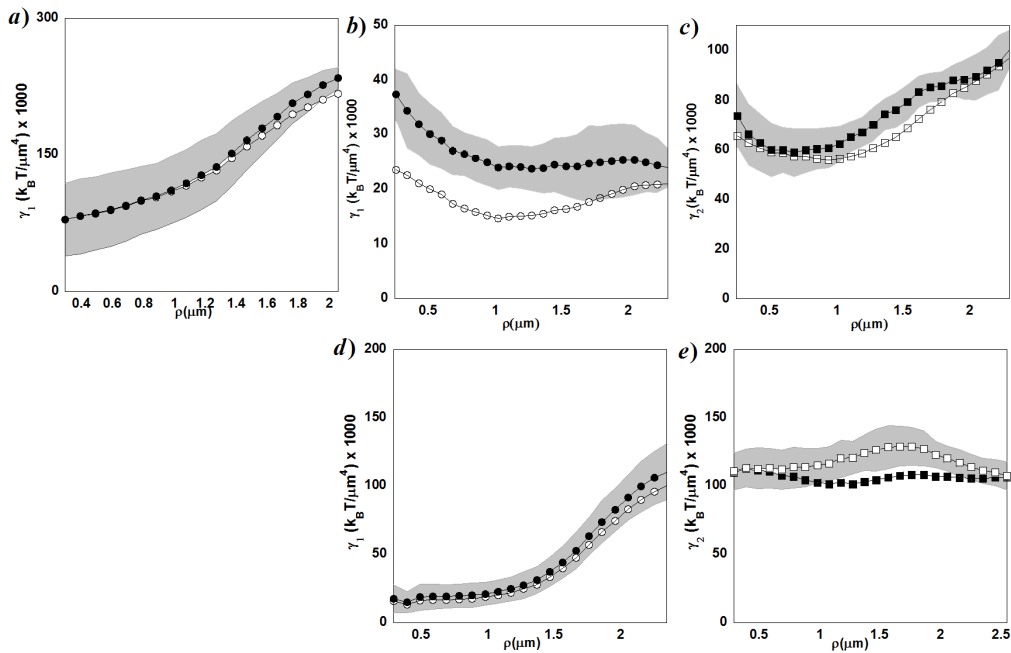


Figura 5.14: Perfil radial médio de $\gamma_{1/2}$ para hemácias imersas em solução hipotônica (a), isotônica (b - c) e hipertônica (d - e), respectivamente. Os símbolos vazios representam o potencial sem correção e os símbolos cheios o potencial corrigido.

onde μ é o módulo de cisalhamento do citoesqueleto, H representa a curvatura média da superfície e K a curvatura Gaussiana. Uma boa estimativa para μ é baseado nos resultados experimentais encontrados por Lenormand *et al.* [57] para os módulos elásticos μ e K_A do citoesqueleto de hemácias imersas em solução hipotônica de 25 mOsm/Kg. Segundo Lenormand *et al.* [57], $\mu \simeq K_A/2$. Este valor é compatível com o valor previsto por previsões teóricas e estudos computacionais realizados com redes hexagonais confinadas em duas dimensões [49]. Como pode ser visto nas figuras 5.15 (a) e 5.14 (b - c) quando o termo de curvatura $2H^2 - K$ decai à zero o mesmo não acontece para o potencial de confinamento, conforme previsto pela equação 5.17.

Uma outra proposta para o potencial de confinamento é descrito por Park *et al.* [53]. Diferentemente, no modelo proposto por Park *et al.* [53], a hemácia é modelada como um envelope esférico fechado, no qual leva-se em consideração o acoplamento linear entre o módulo de curvatura e de compres-

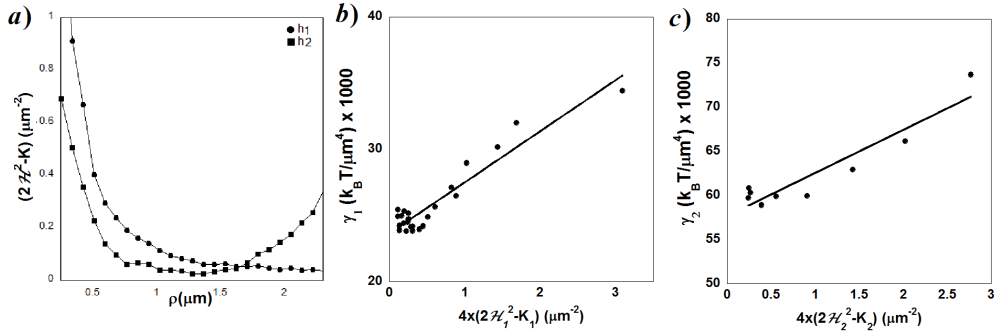


Figura 5.15: (a) Termo de curvatura $(2H_{1/2}^2 - K_{1/2})$ da membrana superior h_1 (pontos) e inferior h_2 (quadrados) em solução isotônica. (b) γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$ e (c) γ_2 versus $4(2H_2^2 - K_2)$ com ajuste linear $\gamma_{1/2} = K_{A_{1/2}} \times 4(2H_{1/2}^2 - K_{1/2}) + \gamma_{0_{1/2}}$ [38].

são da membrana esférica de raio R_0 . Além disso, os autores declaram que este modelo fornece uma melhor descrição da dinâmica da hemácia do que as teorias baseadas em membrana plana. Para determinar o espectro de flutuação deste tipo de envelope esférico (via teorema de flutuação-dissipação) é necessário saber a resposta da membrana quando sujeita a forças radiais. Segundo os autores, deslocamentos radiais espacialmente uniformes ($q = 0$, modo de respiração) geram uma força restauradora associada com as mudanças de curvatura e área. A resposta a estes deslocamentos radiais gera uma força restauradora que foi associada com o potencial de confinamento. Para calcularmos o potencial de confinamento resultante desta deformação, utilizamos a densidade superficial de energia dada por [49,52],

$$f_t = \frac{K_A}{2} \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2. \quad (5.18)$$

Se a esfera possui um raio de equilíbrio R_0 , o raio resultante de um deslocamento radial u retorna um novo raio $R = R_0 + u$, o que nos dá uma densidade de energia (desprezando o termo em u^4),

$$f_t = 2K_A \frac{u^2}{R_0^2} = 2K_A \frac{2}{R_0^2} \frac{u^2}{2} = \gamma \frac{u^2}{2}, \quad (5.19)$$

onde $\frac{1}{R_0}$ representa a curvatura da esfera. Para o caso geral de superfícies,

com curvaturas principais C_1 e C_2 ,

$$f_t = 2K_A \left(C_1^2 + C_2^2 \right) \frac{u^2}{2} = 4K_A (2\mathcal{H}^2 - K) \frac{u^2}{2}, \quad (5.20)$$

a qual define,

$$\gamma = 4K_A (2H^2 - K). \quad (5.21)$$

A equação 5.21 representa o potencial relacionado a curvatura local e é responsável também por restaurar a forma local da célula. Sendo assim, os modelos propostos tanto por Auth *et al.* [13] quanto por Park *et al.* [53] nos dizem que regiões da membrana que possuem curvatura nula não estão sujeitas a nenhum tipo de confinamento, o que não é condizente com os nossos resultados. Isto nos levou a questionar o que estaria mantendo a membrana da hemácia unida quando a curvatura é nula. Logo, é razoável pensar que além do potencial de confinamento local existe também um potencial global responsável por manter a forma da hemácia.

No artigo submetido recentemente pelo nosso grupo [38], no qual Paula Magda é co-autora, foram propostos dois tipos de potenciais de confinamento existentes, com base nas análises dos gráficos apresentados na figura 5.15 (b-c). O primeiro potencial de confinamento foi relacionado com a curvatura local da célula (modelo de envelope esférico fechado [53]) e o outro relacionado com a forma global da célula, os quais denominamos de potenciais local e global, respectivamente.

Como pode ser visto na figura 5.15(b-c), a equação linear $\gamma_{1/2} = K_{A_{1/2}} \times 4(2H_{1/2}^2 - K_{1/2}) + \gamma_{0_{1/2}}$ ajusta bem ambos os dados e retorna valores similares para módulo de compressão $K_{A_1} \sim (3.9 \pm 0.3) \times 10^3 k_B T / \mu m^2 \equiv 16 \mu N / m$ e $K_{A_2} \sim (4.9 \pm 0.7) \times 10^3 k_B T / \mu m^2 \equiv 20 \mu N / m$ (assumindo T como a temperatura do banho), valores estes, em concordância com o reportado por Park *et al.* [53] para toda a hemácia discóide. A partir do ajuste linear é evidente a existência de um termo de pontencial γ_0 , o qual propomos ser um potencial global responsável por manter toda a forma da célula. Através do ajuste, os valores de γ_0 encontrados para a membrana superior e inferior foram $\gamma_{0_1} \approx 24 \times 10^3 k_B T / \mu m^4$ e $\gamma_{0_2} \approx 58 \times 10^3 k_B T / \mu m^4$, respectivamente. É importante mencionar que para o ajuste da figura 5.15(d) toda a região da

hemácia para γ_{0_1} foi usada, enquanto somente a região central ($\rho \leq 1 \mu m$) da célula, longe da região de contato com o substrato, foi utilizada para γ_{0_2} .

A fim de modelarmos o potencial global para a membrana superior uma descrição mais realística do perfil da célula foi usado. Como ilustrado na figura 5.16, a célula é tratada como um envelope cilíndrico, que lembra a forma de um pneu e que possui duas curvaturas ($1/R_T$) e ($1/R_L$). Considerando estas duas curvaturas e a densidade energia da equação 5.20, o potencial relatado para este envelope cilíndrico pode ser escrito como,

$$\gamma_{0_1} = 2K_{A_1} \left(\frac{1}{R_L^2} + \frac{1}{R_T^2} \right). \quad (5.22)$$

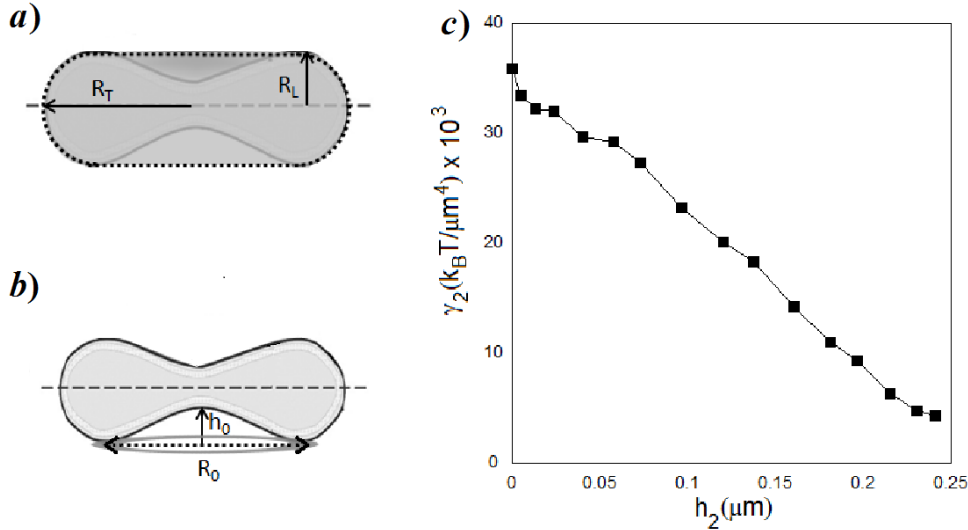


Figura 5.16: Em (a) representação do envelope cilíndrico. O envelope possui curvaturas principais $C_L = \frac{1}{R_L}$ e $C_T = \frac{1}{R_T}$. (b) Ilustração da área da membrana da hemácia delimitada por uma circunferência de raio $R \sim 2 \mu m$. (c) Residual γ_R versus a distância da membrana inferior ao substrato (h_2). O potencial alcança um valor máximo quando $h_2 = 0$, que é a região em que a célula toca o substrato [38].

Considerando R_T como o raio da hemácia medido experimentalmente $R_h \sim 4 \mu m$, tal que $1/R_h \sim 0.25 \mu m^{-1}$, e usando o valor de K_{A_1} previamente obtido, obtemos $\gamma_{0_1} \approx 24 \times 10^3 k_B T / \mu m^4$ que coincide com a equação 5.22 se $R_L \simeq 0.6 \mu m$. Observando o envelope cilíndrico da figura 5.16 vemos

que uma boa aproximação para o raio lateral R_L é dado pela metade do valor da espessura máxima da célula $H_{max}/2 \sim 1 \mu m$. Considerando que o citoesqueleto é o principal responsável por este confinamento global, a espessura da membrana deve ser subtraída a partir de $H_{max}/2$ para uma estimativa mais real de R_L . Como será mostrado mais adiante, a espessura da membrana superior na região da borda é $\sim 0.13 \mu m$ e como o valor experimental obtido para H_{max} foi de $\sim 2 \mu m$, então a estimativa teórica para o raio lateral da casca cilíndrica foi de $R_L \sim H_{max}/2 - 0.13 \mu m \sim 0.9 \mu m$, comparado ao valor estimado de $R_L \simeq 0.6 \mu m$. Isto reforça a proposta de um potencial relacionado à forma global da célula, relativamente bem descrito por um envelope cilíndrico. É importante mencionar que a principal contribuição para γ_1 vem deste envelope cilíndrico e não do termo de curvatura para a membrana superior, indicando que a maior contribuição na restrição da flutuação é devido à este envelope, e não devido ao termo de curvatura para a membrana superior $2H^2 - K$, como proposto por Gov *et al.* [10].

Na modelagem proposta para o potencial global γ_2 , a membrana inferior foi tratada como uma calota esférica de raio R_0 e altura h_0 capaz de sofrer deformações apenas em altura e não em raio. Esta suposição leva em conta que a membrana inferior está ligada ao substrato, e portanto, fixada em uma circunferência de raio R , como mostra a figura 5.16(b). Sendo a área de uma calota esférica dada por $A_0 = 2\pi R_0 h_0$, a deformação em u em altura retorna uma nova área de $A = 2\pi R_0(h_0 + u)$, tal que $\frac{\Delta A}{A_0} = \frac{u}{h_0}$. Usando a equação 5.18, a energia envolvida numa deformação deste tipo pode ser estimada por:

$$f_t = \frac{K_A}{2} \left(\frac{\Delta A}{A} \right)^2 = \frac{K_A}{2} \frac{u^2}{h_0^2} \equiv \gamma_2 \frac{u^2}{2}, \quad (5.23)$$

a qual define o potencial de confinamento global,

$$\gamma_{02} \equiv \frac{K_A}{h_0^2}. \quad (5.24)$$

Usando os valores experimentais $K_{A_2} = 4.9 \times 10^3 k_B T / \mu m^2$ and $\gamma_{02} \sim 58 \times 10^3 k_B T / \mu m^4$, obtém-se que a equação 5.24 é satisfeita para $h_0 = 0.29 \mu m$. Observando o perfil radial de altura retornando pelos métodos AG e Assimetria (figura 5.7(b)), é visto que $h_0 = 0.27 \mu m$, valor este, que está bem

próximo ao valor teórico estimado, reforçando o potencial global proposto para a membrana inferior. Como mencionado acima, o potencial linear $\gamma_2 = K_{A_2} \times 4(2H_2^2 - K_2) + \gamma_{0_2}$ é uma boa aproximação para a região central da célula $\rho \leq 1\mu\text{m}$, longe dos pontos de adesão da membrana ao substrato. Se este potencial linear é subtraído do potencial total γ_2 , um potencial residual γ_R é obtido. Sugere-se que este potencial residual esteja relacionado com a presença de substrato, sendo máximo na região de adesão membrana. Na figura 5.16, o gráfico de γ_R versus a distância da membrana inferior ao substrato (h_2) é apresentado. Como predito, o potencial é máximo em $h_2 = 0$, que é a região em que a célula toca o substrato. Apesar disso, ainda existem muitas perguntas sobre este potencial e mais experimentos que levem em consideração a adesão da membrana ao substrato são necessários para a proposta de um modelo final.

Dando continuidade às análises, iremos agora avaliar o comportamento radial de $\gamma_{1/2}$ exibido por hemácias em solução hipotônica utilizando a modelagem descrita acima. Na figura 5.17 (a-b) apresentamos o termo de curvatura ($2H_1^2 - K_1$) e o gráfico de γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$ para membrana superior (h_1), respectivamente.

Como pode ser visto na figura 5.17 (c), a equação linear $\gamma_1 = K_{A_1} \times 4(2H_1^2 - K_1) + \gamma_{0_1}$, ajusta razoavelmente bem os dados até o raio de $\rho \leq 1\mu\text{m}$. O valor de K_{A_1} retornado do ajuste foi de $K_{A_1} \sim (15.6 \pm 0.1) \times 10^5 k_B T / \mu\text{m}^2 \equiv 6\text{ mN/m}$, com $\gamma_0 \sim 22 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^4$. Por esta modelagem, vemos que o valor encontrado para K_A é três ordens de grandeza maior do que aquele obtido por medidas de flutuações da membrana $[1 - 50] \mu\text{N/m}$, utilizando outras técnicas [29,53]. Estes valores são consistentes com a medida de K_A reportada para a rede de espectrina de hemácias sujeitas à osmolalidade de 25 mOsm/Kg, em que $K_A \sim 5 \mu\text{N/m}$ [57]. Em contrapartida, os valores para K_A para hemácias imersas em solução hipotônica reportado por medidas de pinças ópticas [79] são da ordem de $[300-500] \text{mN/m}$, consistentes com a medida de K_A somente para a bicamada lipídica $K_A = [200-270] \text{mN/m}$ [54]. Sendo assim, o valor de K_A obtido encontra-se dentro do intervalo obtido tanto para o citoesqueleto quanto para a bicamada.

Por fim, analisou-se o potencial de confinamento $\gamma_{1/2}$ retornado pelo AG para hemácias em solução hipertônica. Na figura 5.18 (a) apresentamos o

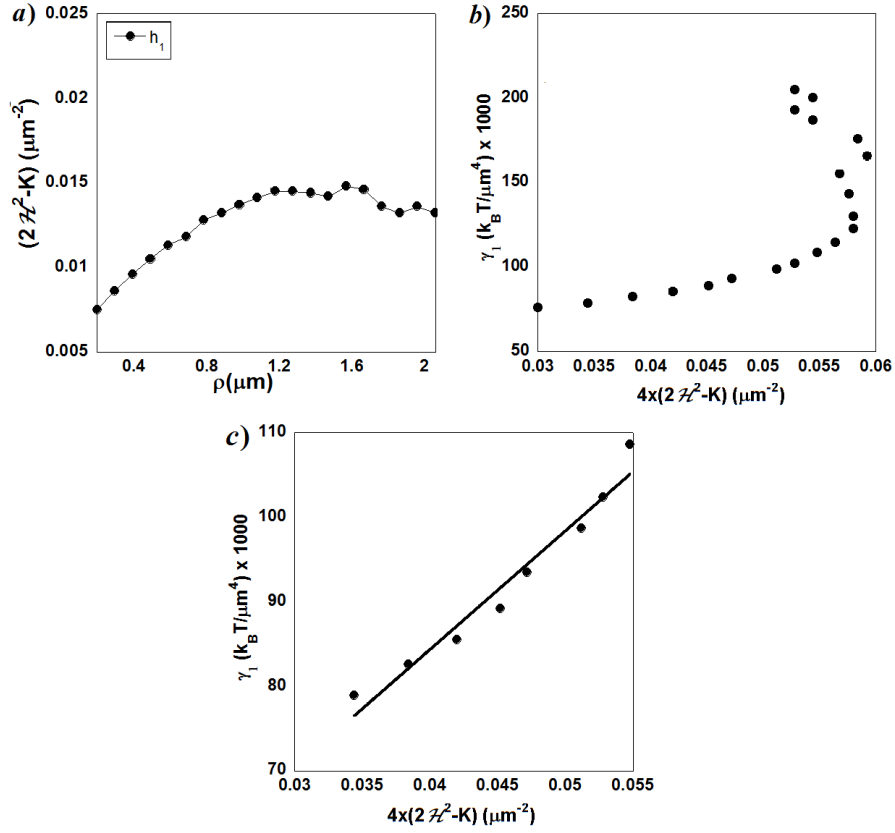


Figura 5.17: (a) Termo de curvatura $(2H_1^2 - K_1)$ da membrana superior h_1 (pontos) em solução hipotônica. (b) γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$. (c) ajuste linear $\gamma_1 = K_{A_1} \times 4(2H_1^2 - K_1) + \gamma_{0_1}$ até $\rho \leq 1 \mu\text{m}$.

termo de curvatura $(2H_{1/2}^2 - K_{1/2})$ da membrana superior (pontos) e inferior (quadrados). E na figura 5.18 (b-c), o gráfico de γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$ para membrana superior (h_1) e γ_2 versus $4(2H_2^2 - K_2)$ para membrana inferior (h_2), respectivamente.

Como pode ser visto na figura 5.18 (b), a relação entre γ_1 não é linear com o $4(2H_1^2 - K_1)$. No entanto, para a região central da hemácia ($\rho \leq 1 \mu\text{m}$), vê-se que γ_1 é praticamente constante, com valor $\sim 19 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$, como mostra o gráfico na figura 5.18 (d). Usando a equação 5.22, com $\gamma_{0_1} = 19 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2$ e com os valores experimentais de $R_L \sim H_{max}/2 \sim 0.95 \mu\text{m}$ e $R_T \sim 4.12 \mu\text{m}$, obtemos um $K_{A_1} \sim 8 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^2 \equiv 32 \mu\text{N}/\text{m}$. Já o

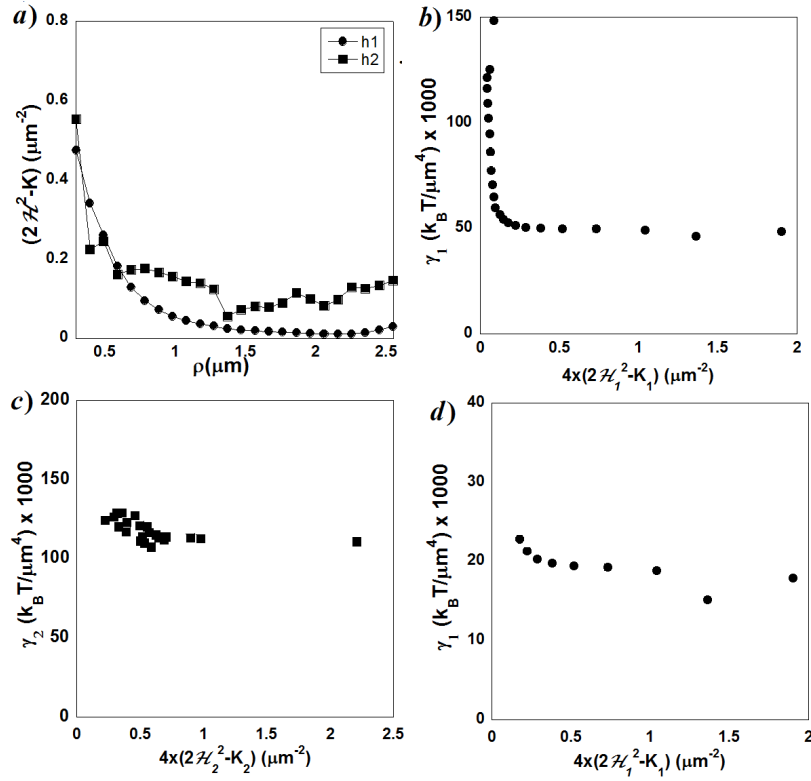


Figura 5.18: (a) Termo de curvatura $(2H_{1/2}^2 - K_{1/2})$ da membrana superior h_1 (pontos) e inferior h_2 (quadrados) em solução hipertônica. (b) γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$ e (c) γ_2 versus $4(2H_2^2 - K_2)$. Em (d) temos o gráfico de γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$ até $\rho \leq 1 \mu\text{m}$.

parâmetro γ_2 apresentou valor constante de $\sim 118 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^4$ para toda a região analisada, como mostra a figura 5.18 (c). Sendo assim, utilizando a equação 5.24, com $\gamma_{02} = 118 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^4$ e o valor experimental $h_0 = 0.62 \mu\text{m}$, obtemos um $K_{A_2} \sim 45 \times 10^3 k_B T / \mu\text{m}^4 \equiv 180 \mu\text{N}/\text{m}$. Os valores obtidos para K_A , usando o modelo proposto são em média da mesma ordem de grandeza para a membrana superior e uma ordem de grandeza maior para a membrana inferior do que aqueles reportado por Park *et al.* [53], para toda a hemácia em solução de 400 mOsm/kg.

Espessura d das membranas

Usando os valores para K_A obtidos na análise do $\gamma_{1/2}$ em conjunto com os valores de $k_{c_{1/2}}$ retornados pelo AG determinamos as espessuras das membranas (bicamada+citoesqueleto) das hemácias analisadas. Na figura 5.19(a - c) apresentamos a espessura obtida usando a modelagem física abordada acima para hemácias imersas em solução hipotônica (a), isotônica (b) e hipertônica (c). Como pode ser visto na figura 5.19(a), os valores de espessura da membrana superior para hemácias imersas em meio hipotônico exibem um valor constante de $\sim 0.002 \mu m$, que é aproximadamente duas vezes menor que a espessura da bicamada [5]. Isto indica que o modelo utilizado na determinação da espessura deste tipo de hemácia ainda precisa de mais investigação. No caso das hemácias imersas em solução isotônica, figura 5.19(b), os valores de espessura encontraram-se dentro do intervalo de $[0.05 - 0.13] \mu m$. Analisando o perfil de espessura da membrana superior, pode ser visto que d_1 aumenta significativamente para raios superiores a $1.50 \mu m$. Além disso, o perfil de espessura da membrana inferior indica que a membrana tem aproximadamente a mesma espessura na região central da célula do que a membrana superior, e decresce à medida que a membrana se aproxima do substrato.

Por último, temos o gráfico das espessuras (figura 5.19(c)), de hemácias imersas em solução hipertônica, o qual apresenta valores de espessura dentro do intervalo de $[0.005 - 0.04] \mu m$. Para esta nova forma de hemácia, as espessuras das membranas mostraram-se ser bem menores do que as espessuras obtidas para hemácias normais. No entanto, d_1 só aumentou com o raio enquanto d_2 só decresceu à medida que se aproximou do substrato. Nossa hipótese é que a interação membrana + substrato pode induzir uma compressão da membrana inferior. Os valores de espessuras das membranas de hemácias em solução isotônica e hipertônica estão de acordo com valores reportados por medidas experimentais e simulações computacionais [48,49,80]. Além disso, estes comportamentos foram previstos por Y. Fung e P. Tong [81], reforçando a interpretação dos nossos resultados.

Análise de $\sigma_{1/2}$

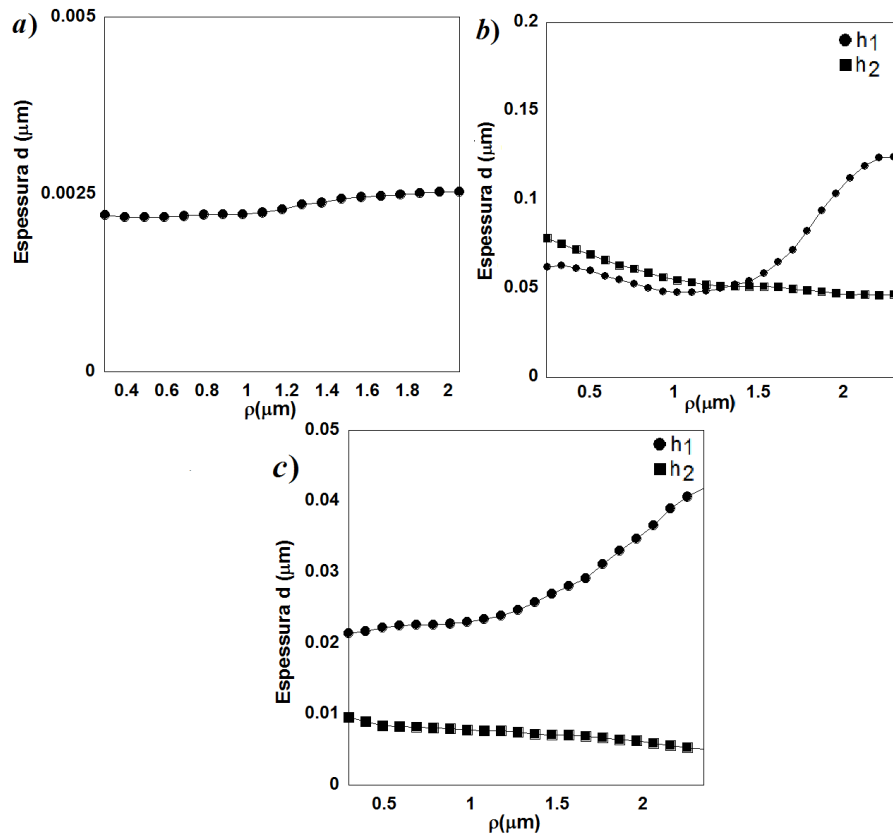


Figura 5.19: Perfil radial de espessura da membrana da célula (bicamada + citoesqueleto) em (a) solução hipotônica, (b) solução isotônica e em (c) solução hipertônica.

Por último, analisamos os comportamentos radiais das tensões superficiais $\sigma_{1/2}$. Na figura 5.20 os perfis radiais das tensões superficiais para cada membrana ($h_{1/2}$) e para cada solução: hipotônica (a), isotônica (b - c) e hipertônica (d - e) levando em conta o fator de correção devido ao movimento lateral da hemácia e à inclinação são apresentados.

Observando os gráficos (a-b/d), vê-se que σ_1 exibe um comportamento aproximadamente constante e σ_2 exibe um perfil crescente, com valores maiores que σ_1 em toda a extensão da célula. Como pode ser visto por estes resultados, há um comportamento global para $\sigma_{1/2}$ que independe da osmolaridade da solução. O intervalo apresentado por $\sigma_{1/2}$ foi de $[20 - 200] \mu N/m$, que é aproximadamente uma ordem de grandeza maior do que reportado por

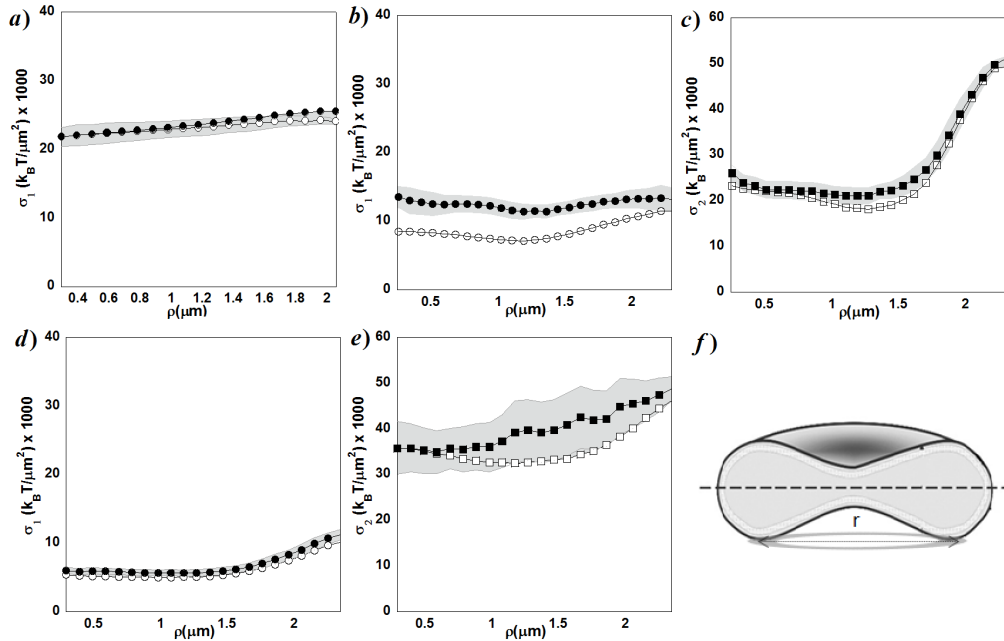


Figura 5.20: Perfil radial médio de $\sigma_{1/2}$ para hemácias imersas em solução hipotônica (a), isotônica (b-c) e hipertônica (d-e), respectivamente. Os símbolos vazios representam o potencial sem correção e os símbolos cheios o potencial corrigido. Em (f) temos ilustrado a área da circunferência de raio r definida pela região de adesão/contato da membrana inferior ao substrato

outros autores [21]. Uma possível explicação para esta discrepância é que os valores obtidos com nossa técnica são na verdade uma tensão mecânica introduzida pela presença do substrato e não uma tensão superficial como proposto por Gov *et al.* [10,14]. Esta hipótese é fundamentada na proposta descrita por Farago [82], sobre as diferenças existentes entre estas duas quantidades. Segundo Farago, há um engano sobre a origem do significado físico para a tensão superficial, a qual foi originalmente definida para uma interface separada por dois meios diferentes, por exemplo, água e óleo. Mas quando este conceito é introduzido na teoria de membranas, o mesmo é distorcido devido às diferenças entre membranas e interfaces.

1) No caso de interfaces, as superfícies são planas. Enquanto que as membranas biológicas são tratadas como superfícies com flutuações em altura

com respostas elásticas influenciadas pela entropia associada às flutuações térmicas.

2) As mudanças em área de ambos os sistemas surgem de efeitos bastante diferentes. No caso da interface óleo-água, as mudanças em área são resultantes da transferência de moléculas entre os meios. Neste caso, a tensão superficial é essencialmente um potencial químico. No caso das membranas, raramente há transferência de lipídios, e as mudanças de área observadas são produzidas por deformações elásticas (compressão/expansão) da membrana, que modificam a densidade molecular de lipídios [82]. A tensão superficial da membrana nos fornece a resposta a esta deformação elástica.

De acordo com Farago [82], a tensão superficial é na verdade uma tensão mecânica que é definida como a força lateral por unidade de comprimento, exercida nos limites de uma membrana quando esta é presa por um aro. De forma diferente, a tensão utilizada no espectro de potência de Gov [10,14] (equação 4.19), o qual é baseado no modelo de interfaces planas, é na verdade uma tensão superficial intrínseca, definida pela derivada da energia elástica necessária para aumentar/diminuir a área da membrana por uma unidade de área, em relação a área total da membrana. Dessa forma, a tensão superficial que medimos é de origem mecânica. E, se assim for, a ordem de grandeza desta tensão mecânica será da ordem da força pelo qual a membrana está sendo puxada em direção ao substrato, dividida pelo comprimento da circunferência que define a região de aderência ao substrato, a qual denominaremos de F_a , ou seja: $\sigma \sim \frac{F_a}{2\pi r}$, onde r é o raio da circunferência, representando o aro referido por Farago. De posse desta expressão, estimamos, para hemácias normais, uma força de adesão para $\sigma_1 \sim 700 \text{ pN}$ e para $\sigma_2 \sim 1400 \text{ pN}$, onde a área da membrana em contato com o substrato é delimitada por uma circunferência de raio $r \cong 2 \text{ }\mu\text{m}$ [38].

Estendendo a análise de tensão mecânica aos outros dois tipos de hemácias, temos que:

(1) Considerando o valor de $\sigma_1 = 23 \times 10^3 k_B T / \mu m^2 \equiv 92 \text{ }\mu\text{N}/m$ observado no gráfico da figura 5.20 (a) (hipotônica), a força de adesão para a membrana superior é de $\sim 2225 \text{ pN}$, onde a área da membrana em contato com o substrato foi delimitada por uma circunferência de raio $r \cong 3.85 \text{ }\mu\text{m}$ (figura 5.3 (g)).

(2) Considerando o valor de $\sigma_1 = 7 \times 10^3 k_B T / \mu m^2 \equiv 28 \mu N/m$ observado no gráfico da figura 5.20 (d) (hipertônica), a força de adesão para a membrana superior é de $\sim 530 pN$, com a área da membrana em contato com o substrato delimitada por uma circunferência de raio $r \cong 3 \mu m$ (figura 5.3 (i)). Para σ_2 , a força estimada é aproximadamente sete vezes maior do que esta última, ou seja, $\sim 3500 pN$.

Estes valores estão de acordo com valores da força de adesão de hemácias em vidro comum $500 pN$ a $1600 pN$ e em vidro hidrofóbico $1000 pN$ a $3000 pN$, obtidos com micropipetas [83]. Estes resultados reforçam a interpretação que o σ mensurado é na verdade uma tensão mecânica, devido o contato da célula com o substrato.

Capítulo 6

Considerações Finais

A tese "Caracterização de parâmetros biomecânicos de hemácias via Microscopia de Desfocalização: Imagem tridimensional total e elasticidade da membrana" baseou-se no desenvolvimento de métodos em microscopia óptica, utilizando a técnica de Microscopia de Desfocalização. Estes métodos incluíram aspectos experimentais e computacionais, que ao serem empregados na análise do contraste e flutuação do contraste MD nos permitiram obter parâmetros que caracterizam tanto a forma quanto a elasticidade da membrana de hemácias. No intuito de validarmos os métodos propostos, utilizamos amostras de hemácias sujeitas a diferentes soluções: isotônica - 300 mOs/kg, hipotônica - 200 mOsm/kg e hipertônica - 400 mOsm/kg.

De forma resumida, os principais resultados da tese foram:

Contraste MD

Os perfis de altura da membrana (bicamada + citoesqueleto) superior e inferior de hemácias foram obtidos por dois métodos: o método AG, no qual escrevemos a equação do contraste MD apenas em termos de parâmetros conhecidos e, deixando apenas o perfil radial de altura h_1 para ser determinado através de métodos computacionais, que no presente caso foi o Algoritmo Genético - AG. O outro método, o de Assimetria, consistiu em inserirmos uma assimetria na expressão do contraste MD, a qual nos permitiu acessar o perfil de altura de cada membrana ao longo da extensão da hemácia, sem a necessidade de médias radiais. Como foi visto, os resultados dos perfis de altura retornados por ambos os métodos foram bastante similares sendo, portanto,

consistentes entre si. Além disso, evidenciaram a robustez dos resultados obtidos para $h_{1/2}$ usando a técnica MD.

Utilizando o método de Assimetria, conseguimos obter a imagem 3D total de hemácias usando um microscópio óptico desfocalizado operando em campo claro. Surpreendentemente, os resultados mostram que a resolução axial MD para hemácias pode ser maior do que 300 nm, permitindo uma imagem nítida de ambas as membranas da hemácia. Adicionalmente, os parâmetros que caracterizam a morfologia da hemácia também foram determinados, sendo estes: raio, área superficial, volume, índice de esfericidade, índice de refração perfil de espessura e perfil de altura de cada membrana, separadamente, ao longo da extensão da célula. Além disso, a região de contato da membrana inferior com o substrato foi localizada. Como extensão da aplicação do método, utilizamos hemácias na forma de estomátocitos e equinócitos.

Flutuação MD

A partir das medidas de flutuação quadrática média do contraste MD e modelando o espectro de flutuação da membrana da hemácia como dependente de um módulo de curvatura (k_c), uma tensão superficial (σ) e um potencial de confinamento (γ) [10], os quais foram permitidos a variar ao longo da célula, em conjunto com o método computacional do AG, foi possível a determinação das flutuações em altura de cada membrana, separadamente. Somado a isto, os comportamentos radiais destes parâmetros elásticos foram obtidos para cada membrana, permitindo uma discussão dos aspectos físicos da membrana e uma nova interpretação para estes parâmetros. Esta metodologia foi empregada na análise da flutuação MD de 25 hemácias imersas em solução hipotônica (200 mOsm/kg) e hipertônica (400 mOsm/kg). Adicionalmente, apresentamos o comportamento radial exibido por essas quantidades para 42 hemácias imersas em solução isotônica (300 mOsm/kg) [38]. Vale enfatizar que estes resultados são inéditos na literatura. Com base nos resultados que foram expostos referentes às análises da flutuação MD, podemos destacar os seguintes resultados:

- 1) Através das análises dos perfis radiais de $\gamma_{1/2}$ de hemácias em solução isotônica foi proposto a existência de dois tipos de potenciais de confinamento: um relacionado à curvatura local da hemácia e o outro responsável

por manter a forma da célula, o qual denominamos de potencial global. A fim de modelarmos estas duas contribuições utilizamos os seguintes tipos de envelopes:

(1.1) Envelope esférico fechado, aplicado às análises do potencial relacionado à curvatura da célula, com $\gamma_{1/2} = 4K_{A_{1/2}}(2H_{1/2}^2 - K_{1/2})$. Ao plotarmos o gráfico de $\gamma_{1/2}$ versus $4K_{A_{1/2}}(2H_{1/2}^2 - K_{1/2})$ para cada membrana de hemácias normais, uma simples equação linear foi capaz de ajustar os dados e retornou valores de K_A similares para ambas as membranas, conforme apresentados na tabela 6.1. Os valores são compatíveis com os valores reportados na literatura [53]. A partir dos ajustes, ficou evidente a presença de um potencial extra para a célula inteira, o qual denominamos de potencial global e que foi modelado para cada membrana.

(1.1.1) Envelope cilíndrico para o potencial de confinamento global da membrana superior γ_{0_1} , com curvaturas principais $1/R_L$ (curvatura lateral) e $1/R_T$ (curvatura transversal), $\gamma_{0_1} = 2K_{A_1} \left(\frac{1}{R_L^2} + \frac{1}{R_T^2} \right)$.

(1.1.2) Envelope do tipo calota esférica para o potencial de confinamento global da membrana inferior γ_{0_2} , capaz de sofrer deformações em altura e não em raio devido o contato com o substrato, $\gamma_{0_2} \equiv \frac{K_{A_2}}{h_0^2}$.

Como foi visto na tese, ao utilizarmos estas modelagens para $\gamma_{0_{1/2}}$, foram obtidos valores teóricos para as quantidades R_L e h_0 próximos aos valores experimentais. Sendo assim, nos baseamos nas modelagens descritas acima para analisarmos os parâmetros $\gamma_{1/2}$ retornados pelo AG a fim de obtermos os módulos $K_{A_{1/2}}$ para hemácias em solução hipotônica e hipertônica.

2) Através dos gráficos de $\gamma_{1/2}$ versus $4K_{A_{1/2}}(2H_{1/2}^2 - K_{1/2})$ para hemácias em solução hipotônica e hipertônica, vê-se que existe uma região linear (região central da hemácia) onde a modelagem proposta pôde ser aplicada. Isto possibilitou a determinação do módulo de compressão (K_A) para cada membrana, conforme apresentado na tabela 6.1. No entanto, para uma melhor descrição destes módulos de compressão, efeitos não-lineares ligados à elasticidade da membrana devem ser levados em consideração no modelo. Para isso, iremos realizar experimentos com intervalos de osmolalidade menores (por exemplo, de 25 mOsm/kg) com o intuito de avaliarmos como pequenas mudanças na osmolalidade alteram os comportamentos radiais dos parâmetros elásticos da membrana. A partir destes, será possível a formulação de

Tabela 6.1: Valores para os módulos de compressão de cada membrana de hemácias obtidos usando a modelagem descrita na tese, para soluções hipotônica, isotônica e hipertônica.

Solução	$K_{A_1} (\mu N/m)$	$K_{A_2} (\mu N/m)$
Hipotônica	6×10^3	–
Isotônica	16	20
Hipertônica	32	180

um modelo global ou restrito à um certo intervalo de osmolalidade.

3) Os resultados mostraram que os módulos $k_{c_{1/2}}$ não são constantes ao longo da extensão da célula, que segundo a nossa modelagem, está ligado ao fato da espessura de cada membrana variar ao longo da célula e não devido às alterações na composição lipídica da membrana. A fim de quantificarmos e avaliarmos o comportamento destas espessuras (d), propomos uma relação entre k_c e K_A , em que $d_{1/2} = \sqrt{(k_{c_{1/2}}/K_{A_{1/2}})}$. Os valores de espessuras das membranas de hemácias imersas em solução isotônica e hipertônica foram compatíveis com os valores reportados por medidas experimentais e simulações computacionais [48,49,80]. No caso da espessura de membrana de hemácias imersas em solução hipotônica, o modelo não retornou um resultado satisfatório, necessitando assim, de mais investigação.

4) A partir das análises dos perfis radiais de $\sigma_{1/2}$, verificamos que as nossas medidas de tensão superficial, são na verdade uma medida da tensão mecânica devido à interação da hemácia com o substrato. Esta tensão é definida como a força pelo qual a membrana está sendo puxada em direção ao substrato, dividida pelo comprimento da circunferência que define a região de aderência ao substrato. Os valores de força de adesão obtidos por esta modelagem também estão de acordo com valores reportados na literatura [83].

Com o intuito de caracterizarmos o real efeito do substrato sobre os parâmetros biomecânicos das hemácias e validarmos as análises apresentadas, faz-se necessário realizarmos experimentos com substâncias que promovam a adesão da célula ao substrato, por exemplo polilisina, em concentrações que não modifiquem a forma de equilíbrio da hemácia.

Em suma, os resultados obtidos nesta tese evidenciaram que a técnica MD pode ser usada para caracterizar, avaliar e monitorar problemas mais complexos, como é o caso da ação de fármacos, doenças e outros agentes. Somado a isto, por ser uma técnica não-invasiva, não necessitar de marcadores como agentes de contraste, fácil de ser implementada e manuseada e, os métodos desenvolvidos serem de fácil manipulação, tornam a MD bastante atraente para ser utilizada como uma ferramenta eficaz no estudo de objetos de fase por especialistas de outras áreas.

Como perspectiva futura, pretendemos desenvolver um novo método experimental da MD em conjunto com uma plataforma computacional capaz de executar o processamento de dados de forma rápida, com a finalidade de obter imagens 3D totais de células em tempo real. O novo método possibilitará a caracterização 3D de eventos dinâmicos e, foi submetida pela doutoranda como projeto de pós doutorado.

O novo método experimental irá evitar o deslocamento da objetiva para duas posições focais, as quais são necessários para obter os parâmetros biomecânicos, dentre os quais temos a imagem 3D total da célula. Para isso, podemos utilizar um divisor de feixes (semi-espelho) para dividir as imagens e usar duas câmeras em posições focais diferentes. A relação entre a desfocalização da objetiva (Z_{obj}) e a desfocalização da câmera (Z_c) é $Z_{obj} = M^2 Z_c$, onde M é a magnificação da objetiva. Para a objetiva que temos utilizado de $M = 100\times$, se deslocarmos a objetiva de $2 \mu m$, o mesmo efeito de desfocalização é obtido pelo deslocamento da câmera de $2 cm$. Portanto, nós podemos manter as câmeras separadas com a diferença de caminho óptico de $2 cm$ (o qual pode ser conseguido com um simples extensor ao longo de um dos caminhos óptico), de tal forma que as imagens coletadas por cada câmera irão corresponder aos contrastes C_1 e C_2 , com $\Delta f_1 - \Delta f_2 = 2 \mu m$. Deste jeito, a imagem 3-D total em eventos dinâmicos pode ser obtida. O método proposto é bastante inovador por vários motivos, dentre estes podemos destacar a sua aplicabilidade: 1) Devido o método experimental independe do sistema de referência de origem, o mesmo pode ser aplicado em obter imagens 3D totais de hemácias fluindo através de um capilar de vidro ou de um equipamento de microfluídica. 2) No campo da microscopia óptica, a MD tem-se mostrado capaz de acessar as informações dos perfis de altura de forma individual,

isto é, da membrana superior (livre) e inferior (em contato com o substrato), o que nos permitiu obter imagens 3D totais de células. Esta vantagem da MD, possibilita o estudo de células com alta motilidade e a determinação das informações sobre a membrana superior e a membrana inferior em contato com o substrato durante o movimento. A partir desse novo método, seremos capazes de avaliar estes eventos dinâmicos em tempo real.

Os métodos propostos na tese nos permitiram extrair várias informações ligadas à biomecânica da hemácia, os quais estão envolvidos diretamente na deformabilidade da célula. E portanto, servem como indicadores do estado fisiológico da célula. E é dentro deste contexto, que propomos como aplicação do novo método experimental o de caracterizar os efeitos do sequestro do colesterol da membrana de hemácias humanas saudáveis na morfologia e biomecânica deste tipo de célula em tempo real. Para isso, iremos utilizar ciclodextrinas, as quais são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, cosméticos, medicamentos e produtos químicos para aumentar a solubilidade em água e a estabilidade e reduzir ou eliminar o gosto desagradável e odor de muitos produtos [84,85].

Dentro da família das ciclodextrinas, a β -ciclodextrina é a que possui a menor solubilidade em água, é que tem a maior afinidade para a inclusão de colesterol sendo assim a ciclodextrina mais eficiente na extração de colesterol de eritrócitos e membranas-modelo [86]. Dentro desta classe, a ciclodextrina metil- β -ciclodextrina ($M\beta CD$) é a mais utilizada como agente de complexação do colesterol [86,87] e, por isso, foi escolhida para ser estudada.

Como se sabe pouco sobre os efeitos da $M\beta CD$ na biomecânica de hemácias humanas, e a sua utilização em outros tipos celulares é relativamente extensa [87], isso nos motivou a aplicar o novo método experimental na caracterização das mudanças morfológicas e mecânicas induzidas pela ação da $M\beta CD$ em hemácias ao longo do tempo, uma vez que a MD traz resultados bastante satisfatórios sobretudo quando aplicada ao estudo de hemácias. Este sub-projeto tem a finalidade de determinar a ação de concentrações pré-hemolíticas de $M\beta CD$ no processo de remoção do colesterol da membrana plasmática de hemácias humanas de doadores saudáveis. Em conjunto, usaremos a ciclodextrina $H\gamma CD$ (2-hidroxiopropil-gama ciclodextrina) que é uma ciclodextrina com menor afinidade pelo colesterol. Dessa forma, utili-

zando este controle experimental interno poderemos afirmar que as mudanças que veremos nas propriedades morfológicas e elásticas são de fato devido a retirada do colesterol e não devido a um outro efeito inespecífico da ciclodextrina. Além disso, pretendemos estudar e caracterizar a ação das duas ciclodextrinas sob diferentes concentrações e temperaturas.

Apêndice A

Microscopia de Desfocalização

Devido à sua constituição básica de hemoglobina e ser desprovida de núcleo e organelas e sua membrana ser composta por proteínas e lipídeos [5] tornam a hemácia um objeto transparente quando observada na faixa do vermelho. Somado a isto, o fato de que o seu índice de refração é muito próximo à solução em que está imersa, podemos considerar a hemácia como sendo um objeto de fase interessante para a aplicação da nossa técnica de microscopia. Objetos de fase mudam a fase da luz, mas não a sua amplitude e portanto são transparentes, já que não geram diferenças de intensidade luminosa na imagem. A visualização deste tipo de objeto usualmente requer o uso de técnicas de microscopia óptica mais apuradas como a técnica de contraste de fase e DIC (Differential Contrast Microscopy, ou microscopia de contraste diferencial) [17–19,68], isto porque torna-se inviável a visualização da membrana das células usando-se somente um microscópio óptico convencional operando em campo claro devido à pouca absorção da luz visível pelas membranas das células. No entanto, essas técnicas necessitam de algum aparato acoplado ao microscópio para que possam ser utilizadas, como é o caso da técnica de contraste de fase, em que insere-se uma placa de fase no caminho óptico para que o objeto seja visualizado no plano imagem. Em contrapartida, a técnica de Microscopia de Desfocalização não necessita de placas de fase, prismas, polarizadores ou outros componentes ópticos para que o objeto seja visualizado. Como veremos neste apêndice, ao inserirmos uma pequena desfocalização em um microscópio óptico, estes objetos podem

se tornar visíveis.

A partir do contraste MD gerado por objetos de fase somos capazes extrair informações sobre a curvatura e não-homogeneidades estática e dinâmica de cada superfície (aderida ao substrato e livre), separadamente, no contraste da imagem. Sob esses aspectos, a técnica de Microscopia de Desfocalização configura-se em uma técnica eficaz e promissora no estudo de objetos transparentes biológicos, como é o caso das hemácias e membrana de macrófagos [23,24,31–38].

A.1 Modelo do microscópio óptico invertido

Os componentes ópticos fundamentais que constituem um microscópio óptico invertido operando em campo claro são ilustrados na figura A.1. Nossos microscópios ópticos invertidos possuem a óptica corrigida no infinito, ou seja, a imagem é conjugada no infinito pela objetiva, sendo assim, precisamos de uma outra lente além da ocular para poder conjugar a imagem da objetiva no plano imagem. Essa outra lente, é chamada lente de tubo. Em nossa montagem, conjugamos a imagem da lente de tubo diretamente no detector (câmeras) sem a necessidade de passarmos pela ocular.

Para que o objeto seja visualizado no plano imagem I, o contraste do objeto deve ser não nulo. Definimos o contraste da intensidade luminosa como,

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

onde $E(\vec{\rho})$ é o campo elétrico no plano imagem e E_0 é o campo incidente (fonte do microscópio). Nas seções a seguir será mostrado que um objeto de fase observado por um microscópio óptico possui contraste nulo, a não ser que ele esteja desfocalizado. A desfocalização pode ser feita movendo-se a objetiva, senão movendo-se a própria amostra, utilizando o nanodeslocador acoplado ao estágio do microscópio, ou movendo-se a câmera utilizando um micrômetro, acoplada à uma das saídas do microscópio. Para isso, iremos utilizar as ferramentas matemáticas desenvolvidas em Óptica de Fourier [70]

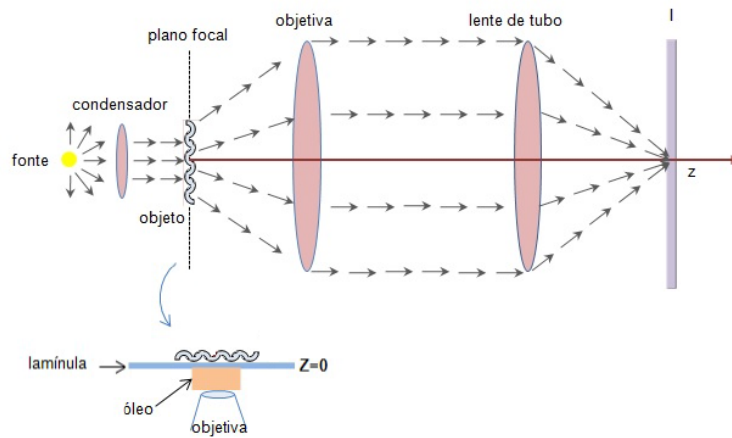


Figura A.1: Esquema de um objeto observado por um microscópio óptico invertido com a óptica corrigida no infinito. O objeto é posicionado no plano focal da objetiva e é iluminado por feixe de raios paralelos. Ao passar pelo objeto a luz transmitida e difratada pelo objeto são coletadas pela objetiva que conjuga a sua imagem no infinito. Ao utilizarmos uma lente de tubo, a imagem passa a ser conjugada no plano imagem.

para encontrar inicialmente a expressão para o espectro angular do campo elétrico da luz e , em seguida veremos como é a propagação desse espectro através de um meio livre, através de uma lente delgada e também ao passar por um objeto de fase, de forma a encontrar o campo final no plano imagem. A partir deste resultado, pode-se então determinar o contraste MD do objeto de fase visualizado através de um microscópio óptico desfocalizado. Ao utilizarmos a Óptica de Fourier simplificamos as contas ao propagarmos o espectro angular do campo, ao invés do campo em si, como veremos a seguir. Em toda dedução, os campos elétricos considerados serão campos escalares que se propagam em uma direção próxima à direção do eixo z . Além disso, iremos assumir a origem do nosso sistema de referência na lamínula, como ilustrado na figura A.1, com o eixo óptico dado pelo o eixo z .

A.2 Propagação do Espectro Angular pelos Elementos de um Microscópio

A.2.1 Propagação Livre do Espectro Angular

Com base na figura A.1, vemos que a primeira região que devemos propagar o espectro angular é a região livre. A fim de deduzi-la, deve-se primeiro determinar o campo elétrico que se propaga em uma região livre. A equação de onda para um meio homogêneo, linear e livre de cargas é obtida por manipulações das equações de Maxwell [88] é dada por,

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

onde \vec{E} é o campo elétrico, ϵ é a permissividade elétrica do meio e μ é a permeabilidade magnética do meio.

Para o caso de um campo elétrico monocromático de frequência ω e dependência temporal $e^{i\omega t}$, propagando na direção do vetor de onda \vec{k} ,

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}(\vec{r}) e^{i\omega t}. \quad (\text{A.3})$$

A equação de onda é,

$$\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + \omega^2 \epsilon\mu \vec{E}(\vec{r}) = 0. \quad (\text{A.4})$$

Utilizando a relação,

$$k = \frac{\omega}{v} = \omega \sqrt{\epsilon\mu}. \quad (\text{A.5})$$

A equação de onda fica da seguinte forma,

$$\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}) + k^2 \vec{E}(\vec{r}) = 0, \quad (\text{A.6})$$

que representa a equação de Helmholtz.

Usando o formalismo do espectro angular na propagação do campo elétrico \vec{E} [70] e assumindo uma polarização fixa, podemos representar as transformadas de Fourier no plano bidimensional (x, y) como sendo

$$E(\vec{\rho}, z) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int \int_{-\infty}^{+\infty} A(\vec{q}, z) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q}. \quad (\text{A.7})$$

E o espectro angular dado pela transformada inversa,

$$A(\vec{q}, z) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} E(\vec{\rho}, z) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} dx dy. \quad (\text{A.8})$$

Onde $\vec{\rho}$ é o vetor posição e \vec{q} o vetor de onda ambos representados no plano (x, y) , com a luz se propagando ao longo de z . Na figura A.2 temos a representação do sistema de coordenadas que será usado como referência da propagação da luz ao longo do eixo z .

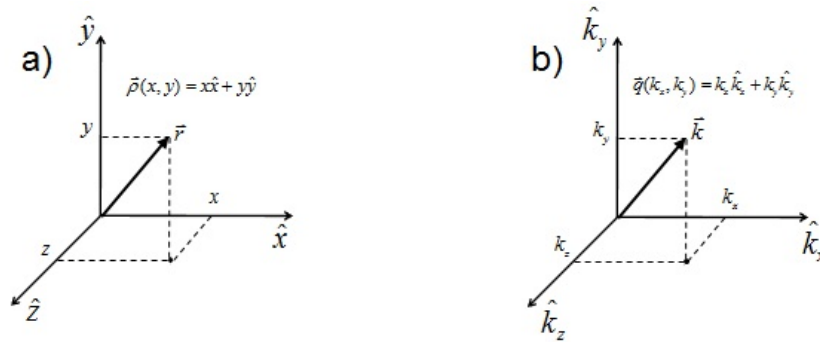


Figura A.2: Coordenadas do sistema de referência: (a) no espaço real e (b) no espaço de Fourier dos vetores de ondas.

Substituindo a equação A.7 na equação de Helmholtz, e separando o operador nabla em coordenadas ρ e z tem-se:

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

$$\int \left\{ \left[-q^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k^2 \right] A(\vec{q}, z) \right\} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} d\vec{q} = 0. \quad (\text{A.9})$$

Para que esta equação seja válida, o integrando deverá ser nulo,

$$\left[-q^2 + \frac{\partial^2}{\partial z^2} + k^2 \right] A(\vec{q}, z) = 0, \quad (\text{A.10})$$

mas

$$\vec{k} = k_x \hat{i} + k_y \hat{j} + k_z \hat{k} \iff k_z^2 = k^2 - q^2, \quad (\text{A.11})$$

então a equação A.10 torna-se,

$$\frac{\partial^2 A(\vec{q}, z)}{\partial z^2} + k_z^2 A(\vec{q}, z) = 0, \quad (\text{A.12})$$

que tem como solução,

$$\begin{aligned} A(\vec{q}, z) &= A(\vec{q}, 0) e^{\pm i k_z z} \\ &= A(\vec{q}, 0) e^{\pm i k z \sqrt{1 - \frac{q^2}{k^2}}}. \end{aligned} \quad (\text{A.13})$$

Chegamos então a forma do espectro angular que se propaga em uma região livre. Vê-se que a propagação do espectro é caracterizada pela adição de uma fase $e^{\pm i k_z z}$. A partir de agora iremos considerar apenas o sinal positivo do expoente, que indica propagação 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 $q < k$. O primeiro caso é caracterizado por ondas evanescentes e o segundo caso por ondas propagantes ao longo do eixo z . Como o campo em interesse é um campo escalar que se propaga em uma direção próxima à direção do eixo z ($\vec{k} \sim \vec{k}_z$), limitamos a região de observação somente à região próxima a este eixo. Sendo assim pode-se utilizar a aproximação de Fresnel [70] (aproximação paraxial) na qual $q \ll k$. Dessa forma,

$$k_z = \sqrt{k^2 - q^2} \simeq k - \frac{q^2}{2k}. \quad (\text{A.14})$$

Assim, a equação para a propagação livre do espectro A.13 torna-se,

$$A(\vec{q}, z) = A(\vec{q}, 0) e^{i k z} e^{-i \frac{q^2}{2k} z}, \quad (\text{A.15})$$

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

A.2.2 Propagação do Espectro Angular através de uma Lente Delgada

Como queremos desenvolver uma expressão para um objeto de fase visualizado através de um microscópio desfocalizado, precisamos saber como a luz se propaga ao passar por uma lente. Nesta seção será abordado resumidamente o cálculo da propagação do espectro angular ao atravessar uma lente delgada, exposto no capítulo 5 do Goodman [70].

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

$$E_\ell(\vec{\rho}) = t_\ell(\vec{\rho})E_0(\vec{\rho}), \quad (\text{A.16})$$

onde $E_0(\vec{\rho})$ é o campo elétrico incidente e $t_\ell(\vec{\rho})$ é a transmissividade da lente. A dedução da equação para a transmissividade pode ser encontrado na referência [70].

A transmissividade da lente é dada por,

$$t_\ell(\vec{\rho}) = e^{-i\frac{k}{2f}\rho^2}, \quad (\text{A.17})$$

onde f é a distância focal da lente e k é o módulo do vetor de onda da luz no meio. Sendo assim,

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

Calculando o espectro angular correspondente a este campo, tem-se,

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

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 temos,

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

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 $T_\ell(\vec{q})$ também não será apresentado aqui e pode ser visto em [70]. Sendo assim, o espectro angular após atravessar uma lente é dado por,

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

A.2.3 Propagação do Espectro Angular através de um Objeto de Fase

Analisaremos nesta seção o comportamento do espectro angular ao atravessar um objeto de fase fino e plano (espessura objeto \ll espessura da lamínula), contendo uma única interface, similar a uma rede de difração, conforme ilustrado na figura A.3.

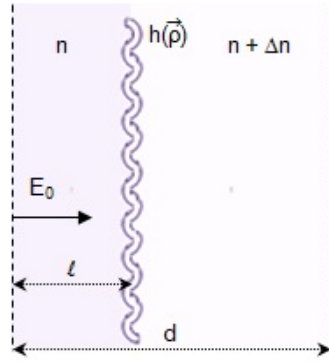


Figura A.3: Esboço de um objeto de fase. \vec{E}_0 é o campo elétrico incidente; $h(\vec{\rho})$ é a amplitude do objeto; n e $n + \Delta n$ são os índices de refração do meio por onde o campo elétrico se propaga; $\vec{\rho}$ é o vetor posição no plano (x, y) perpendicular à direção z de propagação do campo elétrico

Caso não houvesse a interface, a variação de fase do campo elétrico no espaço livre propagando a uma distância d em um meio com índice de refração n seria dada por,

$$\varphi_1 = nk_0d. \quad (\text{A.22})$$

Considerando agora a interface representada na figura A.3. Neste caso, o campo elétrico inicial E_0 propaga-se por uma distância $l + h(\vec{\rho})$ no meio com índice de refração n . Em seguida 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 . Portanto, a variação total de fase neste caso é,

$$\Delta\varphi(\vec{\rho}) = \varphi_1 + \varphi_2 = nk_0(l + h(\vec{\rho})) + (n + \Delta n)k_0(d - (l + h(\vec{\rho}))) = -\Delta nk_0h(\vec{\rho}). \quad (\text{A.23})$$

Sendo assim, podemos escrever o campo elétrico da seguinte forma,

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

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

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

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

$$h(\vec{\rho}) = \frac{1}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}), \quad (\text{A.26})$$

onde $h(\vec{q}')$ representa a amplitude do modo \vec{q}' da ondulação da interface e S é a área do objeto de fase. Considerando essas mudanças, tem-se que:

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

Esta equação corresponde ao campo elétrico ao atravessar um objeto de fase fino e plano. A partir disto, pode-se calcular o espectro angular correspondente,

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

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

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

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

$$A_0(\vec{q}) = (2\pi)^2 E_0 \left[\delta(\vec{q}) + \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \delta(\vec{q} + \vec{q}') - \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \delta(\vec{q} - \vec{q}') \right]. \quad (\text{A.30})$$

A.3 Propagação do Espectro Angular pelos Elementos de um Microscópio Desfocalizado

Utilizando as equações A.15, A.21 e A.30 pode-se determinar a propagação do espectro angular através de um microscópio óptico desfocalizado, conforme ilustrado na figura A.4. Por esta figura, o objeto de fase é o primeiro elemento a ser atravessado pelo campo elétrico incidente e portanto, o espectro da equação A.30 será o espectro inicial $A_0(\vec{q}, 0)$. Sendo assim, o caminho óptico a ser seguido será composto pelos seguintes passos:

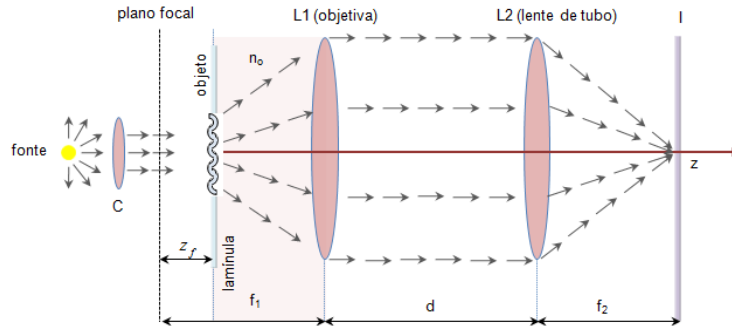


Figura A.4: Esquema do microscópio desfocalizado. O objeto está desfocalizado de uma pequena distância z_f em relação ao plano focal da objetiva representado por f_1 ; as lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano I.

O primeiro passo consiste em calcular a propagação livre do espectro angular através da distância $f_1 - z_f$ entre objeto e a lente L_1 . Para o caso de uma objetiva de imersão à óleo, o meio de propagação possui índice de refração $n_o = 1.51$ e portanto, $k = n_o k_0$, onde k_0 é o vetor de onda da luz no vácuo,

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

$$(A.31)$$

Este representará o espectro angular inicial do segundo passo, que consiste em propagar o espectro através da lente L_1 . Utilizando a equação A.21 tem-se,

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

Substituindo a equação A.31 na equação A.32, obtém-se a equação para o espectro angular após atravessar a lente L_1 ,

$$A_2(\vec{q}, z_f) = \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{ik(f_1-\Delta f)} e^{i\frac{f_1}{2k}q^2} \quad (A.33)$$

$$\times \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k}(z_f)} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q}-\vec{q}')^2} d\vec{q}'. \quad (A.34)$$

O terceiro passo consiste na propagação livre, no ar, do espectro A_2 por uma distância d ,

$$A_3(\vec{q}, z_f) = A_2(\vec{q}, z_f) e^{ik_0 d} e^{-i\frac{q^2}{2k_0}d}. \quad (A.35)$$

Substituindo a expressão de $A_2(\vec{q}, z_f)$ na equação A.35,

$$A_3(\vec{q}, z_f) = \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_1}{ik}} e^{i[k(f_1-z_f)+k_0 d]} e^{i\frac{q^2}{2}[\frac{f_1}{k}-\frac{d}{k_0}]} D(\vec{q}), \quad (A.36)$$

onde $D(\vec{q})$ é dado por,

$$D(\vec{q}) = \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k}(z_f)} e^{-i\frac{f_1}{k}(\vec{q}-\vec{q}')^2} d\vec{q}'. \quad (A.37)$$

Da mesma forma que anteriormente, o espectro angular que atravessa a lente L_2 será,

$$A_4(\vec{q}, z_f) = \frac{1}{(2\pi)^2} \sqrt{\frac{2\pi f_2}{ik_0}} \int A_3(\vec{q}', z_f) e^{i\frac{f_2}{2k}(\vec{q}-\vec{q}')^2} d\vec{q}' \quad (A.38)$$

Substituindo a expressão de $A_3(\vec{q}, z_f)$, tem-se,

$$A_4(\vec{q}, z_f) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 f_2}{kk_0}} e^{i[k(f_1-z_f)+k_0 d]} e^{i\frac{f_2}{2k_0}q^2} \quad (A.39)$$

$$\int e^{i\frac{q'^2}{2}[\frac{f_1}{k}-\frac{d}{k_0}+\frac{f_2}{k_0}]} D(\vec{q}') e^{-i\frac{f_2}{k_0}(\vec{q}-\vec{q}')^2} d\vec{q}'. \quad (A.40)$$

Resta agora calcularmos a propagação livre (no ar) deste espectro até o anteparo, localizado a uma distância f_2 .

$$A_5(\vec{q}, z_f) = A_4(\vec{q}, z_f) e^{ik_0 f_2} e^{-i \frac{q^2}{2k_0} f_2}. \quad (\text{A.41})$$

Substituindo a expressão de $A_4(\vec{q}, z_f)$ obtém-se,

$$A_5(\vec{q}, z_f) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 f_2}{k k_0}} e^{i[k(f_1 - z_f) + k_0 d + k_0 f_2]} \quad (\text{A.42})$$

$$\int e^{\frac{i q'^2}{2} \left[\frac{f_1}{k} - \frac{d}{k_0} + \frac{f_2}{k_0} \right]} D(\vec{q}') e^{-i \frac{f_2}{k_0} (\vec{q} \cdot \vec{q}')} d\vec{q}'. \quad (\text{A.43})$$

A equação acima representa o espectro angular através do microscópio desfocalizado. Realizando as mudanças de variáveis $\vec{q}'' = \frac{f_2}{k_0} \vec{q}'$, $d\vec{q}' = \frac{k_0}{f_2} d\vec{q}''$, $q'^2 = \frac{k_0^2}{f_2^2} q''^2$ e definindo,

$$\alpha = \frac{k_0^2}{2f_2^2} \left(\frac{f_1}{k} - \frac{d}{k_0} + \frac{f_2}{k_0} \right) \quad (\text{A.44})$$

e

$$\beta = k(f_1 - z_f) + k_0 d + k_0 f_2. \quad (\text{A.45})$$

Obtém-se o espectro angular final para um microscópio desfocalizado,

$$A_5(\vec{q}, f_2) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{f_1 k_0}{f_2 k}} e^{i\beta} \int e^{i\alpha q''^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}''\right) e^{-i(\vec{q}'' \cdot \vec{q})} d\vec{q}'' . \quad (\text{A.46})$$

A partir desta equação e utilizando as definições A.7 e A.1 pode-se determinar o campo elétrico final e o contraste para um microscópio desfocalizado.

A.4 Campo Elétrico para um Microscópio Desfocalizado

Nesta seção iremos calcular o campo elétrico da luz difratado por uma interface fina e plana após propagar pelo microscópio desfocalizado usando

a equação A.46, de modo que $A(\vec{q}, z) \equiv A_5(\vec{q}, z_f)$, na equação A.7.

$$E(\vec{\rho}) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int A_5(\vec{q}, z_f) e^{i(\vec{q} \cdot \vec{\rho})} d\vec{q} \quad (\text{A.47})$$

que pode ser reescrita como,

$$E(\vec{\rho}) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k F_2}} e^{i\beta} \int \left[\frac{1}{(2\pi)^2} \int e^{i\vec{q} \cdot (\vec{\rho} - \vec{q}')} d\vec{q}' \right] e^{i\alpha q'^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}'\right) d\vec{q}'. \quad (\text{A.48})$$

Utilizando a definição da função delta, obtém-se,

$$E(\vec{\rho}) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{i\beta} \int e^{i\alpha q'^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{q}'\right) \delta(\vec{\rho} - \vec{q}') d\vec{q}' \quad (\text{A.49})$$

que tem como resultado,

$$E(\vec{\rho}) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k F_2}} e^{i\beta} e^{i\alpha \rho^2} D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{\rho}\right). \quad (\text{A.50})$$

Substituindo a expressão de $D\left(\frac{k_0}{f_2} \vec{\rho}\right)$ encontra-se,

$$E(\vec{\rho}) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{i\beta} e^{i\alpha \rho^2} \int A_0(\vec{q}', 0) e^{i\frac{q'^2}{2k} z_f} e^{-i\frac{f_1 k_0}{f_2 k} (\vec{\rho} \cdot \vec{q}')} d\vec{q}' \quad (\text{A.51})$$

e realizando a troca de variáveis,

$$\vec{\rho} = -\frac{k_0 f_1}{k f_2} \vec{q}', \quad (\text{A.52})$$

e

$$\vec{q}' = \vec{q}, \quad (\text{A.53})$$

onde $\vec{\rho}$ e \vec{q} são as coordenadas no plano imagem e no plano objeto respectivamente, a equação A.51 torna-se,

$$E(\vec{\rho}) = \frac{1}{i} \frac{1}{(2\pi)^3} \sqrt{\frac{k_0 f_1}{k f_2}} e^{i\beta} e^{i\alpha \frac{f_2^2 k^2}{f_1^2 k_0^2} \rho^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{q^2}{2k} z_f} e^{i(\vec{\rho} \cdot \vec{q})} d\vec{q}. \quad (\text{A.54})$$

Nesta equação o termo $\frac{k_0 f_1}{k f_2}$ é fator de magnificação do microscópio e o sinal negativo 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,

$$E(\vec{\rho}) = C \frac{e^{i\beta(\vec{\rho})}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{z_f}{2k} q^2} e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (\text{A.55})$$

que corresponde ao campo elétrico final (obtido no plano imagem) para o microscópio desfocalizado. Quando o objeto de fase está desfocalizado, surge uma fase extra proporcional à desfocalização z_f e, quando posicionamos o objeto de fase no plano focal da objetiva ele torna-se invisível, de modo que, a fase extra desaparece, $z_f = 0$. Portanto, a desfocalização introduz uma diferença de fase entre a luz difratada pelo objeto e a transmitida, que ao se recombinarem no plano imagem e através do fenômeno de interferência torna o objeto de fase visível. Outro aspecto importante 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 vácuo. Isto vem do fato que ao desfocalizar o sistema move 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.

A partir da equação para o campo elétrico final pode-se então obter o contraste para o objeto de fase observado por um microscópio desfocalizado. Para isso, deve-se substituir $A_0(\vec{q}, 0)$, que representa o espectro de angular após atravessar o objeto de fase. Nas seções a seguir será mostrado o contraste final para o caso de objetos de fase fino e planos, e objetos de fase curvos e espessos.

A.5 Contraste de objetos de fase em um microscópio desfocalizado

A.5.1 Contraste de objeto de fase fino e plano

A fim de determinarmos o contraste de um objeto de fase composto por uma única interface fina e plana, iremos substituir o espectro de angular

$A_0(\vec{q}, 0)$ na equação A.55. O que resulta em,

$$\begin{aligned}
 E(\vec{\rho}) &= C \frac{e^{i\beta(\vec{\rho})}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{z_f}{2k}q^2} e^{i(\vec{\rho}\cdot\vec{q})} d\vec{q} \\
 &= C e^{i\beta(\vec{\rho})} E_0 \left\{ \int \left[\delta(\vec{q}) - \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left(\delta(\vec{q} + \vec{q}') - \delta(\vec{q} - \vec{q}') \right) \right] e^{i\frac{\Delta f}{2k}q^2} e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \right\} d\vec{q} \\
 &= C e^{i\beta(\vec{\rho})} E_0 \left\{ 1 - \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \left[\sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') e^{i\frac{z_f}{2k}q'^2} e^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} - \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') e^{i\frac{z_f}{2k}q'^2} e^{-i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} \right] \right\} \\
 &= C e^{i\beta(\vec{\rho})} E_0 \left\{ 1 - \frac{\Delta n k_0}{2\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \left[e^{i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} - e^{-i\vec{q}'\cdot\vec{\rho}} \right] e^{i\frac{z_f}{2k}q'^2} \right\} \\
 &= C e^{i\beta(\vec{\rho})} E_0 \left\{ 1 - \frac{i\Delta n k_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}'} h(\vec{q}') \text{sen}(\vec{q}' \cdot \vec{\rho}) e^{i\frac{z_f}{2k}q'^2} \right\}. \tag{A.56}
 \end{aligned}$$

Fazendo a troca de variável $\vec{q}' \rightarrow \vec{q}$ e definindo-se $I_0 = |C|^2 |E_0|^2$, temos que a intensidade da luz observada, mantendo a expansão até a primeira ordem em h será,

$$I(\vec{\rho}) = I_0 \left\{ 1 + \frac{2\Delta n k_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{z_f}{2k}q^2\right) \right] \right\} \tag{A.57}$$

e usando a definição do contraste temos que,

$$C(\vec{\rho}) = 2\Delta n k_0 \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen}\left(\frac{z_f}{2k}q^2\right) \right]. \tag{A.58}$$

Por esta equação temos que o contraste comporta-se como uma função oscilatória de frequência $\frac{q^2}{2k}$. Confirmando novamente que o objeto de fase somente será visível no plano imagem se o mesmo estiver desfocalizado.

No limite de pequenos vetores de onda e pequenas desfocalizações, temos que $\sin x \sim x$ e o contraste torna-se,

$$C(\vec{\rho}) = \Delta n k_0 \frac{z_f}{k} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) q^2 \right]. \tag{A.59}$$

Levando em conta a equação A.26, que é a representação do perfil de altura $h(\vec{\rho})$ em série de Fourier, tem-se que,

$$C(\vec{\rho}) = -z_f \frac{\Delta n}{n_o} \nabla^2 h(\vec{\rho}) = z_f \frac{\Delta n}{n_o} \kappa(\vec{\rho}) \tag{A.60}$$

com n_o o índice de refração do óleo de imersão da objetiva, $n_o = 1.51$. Se tivermos $\nabla h(\vec{\rho}) \ll 1$, podemos aproximar o Laplaciano da espessura pela curvatura, ou seja, $\kappa(\vec{\rho}) \simeq -\nabla^2 h(\vec{\rho})$, onde $\kappa(\vec{\rho})$ é a curvatura local do objeto de fase, então, o contraste também será proporcional à curvatura. Sendo assim, a partir do contraste MD somos capazes de retirar informações da geometria do objeto de fase analisado. Este fato possibilita o estudo de não-homogeneidades ou rugosidades da superfície de células planas, que podem ser aproximadas por objetos de fase compostos por duas interfaces planas e finas com perfis de altura distintos p_1 e p_2 . Para simular este tipo de célula, seja o objeto de fase ilustrado na figura A.5. Na figura A.5 esquematizamos o perfil no caso de células finas e planas visto através de um microscópio desfocalizado.

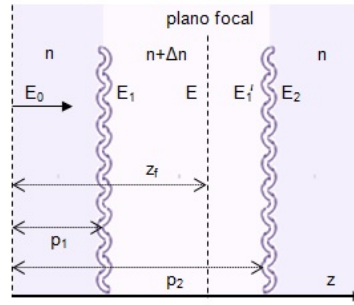


Figura A.5: Propagação do campo elétrico em um microscópio desfocalizado para observação de uma célula plana: a lamínula está localizada a uma pequena distância z_f em relação ao plano focal da objetiva e as interfaces são localizadas por p_1 e p_2 . Sendo assim, a interface 1 está localizada a uma distância $z_f - p_1$ do plano focal enquanto a interface 2 está localizada a uma distância $z_f - p_2$ do mesmo plano. Na região entre as interfaces p_1 e p_2 o índice de refração $n + \Delta n$ e o meio n são considerados homogêneos e isotrópicos.

Para um objeto composto por duas interfaces planas p_1 e p_2 , podemos com base na equação A.58, escrever o contraste MD gerado por este objeto como,

$$C(\vec{\rho}) = 2\Delta n k_0 \sum_{\vec{q}} \left[h_1(\vec{q}) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_1}{2k} q^2 \right) - h_2(\vec{q}) \text{sen} \left(\frac{z_f - p_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \quad (\text{A.61})$$

Novamente, no limite de pequenos vetores de onda e pequenas desfocalizações $(z_f - p_{1/2})q^2/2k \ll 1$ o contraste se torna,

$$C(\vec{\rho}) = \frac{\Delta n}{n_o} \left((z_f - p_1) \sum_{\vec{q}} [h_1(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) q^2] - (z_f - p_2) \sum_{\vec{q}} [h_2(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) q^2] \right). \quad (\text{A.62})$$

Utilizando a equação A.26, temos,

$$C(\vec{\rho}) = \frac{\Delta n}{n_o} \left((z_f - p_1) \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) - (z_f - p_2) \nabla^2 h_2(\vec{\rho}) \right) \quad (\text{A.63})$$

que é a equação final para o contraste gerado por duas interfaces planas.

Contraste para objetos curvos e espessos

Iremos agora obter o contraste MD gerado por um objeto de fase com uma espessura considerável e curvo quando observado através de um microscópio desfocalizado, conforme ilustrado na figura A.6. Neste caso, cada ponto $\vec{\rho}$ do perfil $h(\vec{\rho})$ terá uma distância específica relação ao plano focal. Sendo assim, o campo elétrico final será da seguinte forma,

$$E(\vec{\rho}, f_2) = C \frac{e^{i\beta(\vec{\rho})}}{(2\pi)^2} \int A_0(\vec{q}, 0) e^{i\frac{z_f - h(\vec{\rho})}{2k} q^2} e^{i\vec{q} \cdot \vec{\rho}} d\vec{q}, \quad (\text{A.64})$$

onde o termo de fase extra leva em consideração a forma do objeto. Fazendo uma analogia com o contraste obtido para uma interface plana, tem-se que,

$$C(\vec{\rho}) = \frac{2\Delta n k_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \text{sen} \left(\frac{z_f - h(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) \right], \quad (\text{A.65})$$

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,

$$C(\vec{\rho}) = \Delta n k_0 \frac{(z_f - h(\vec{\rho}))}{k} \sum_{\vec{q}} \left[h(\vec{q}) \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) q^2 \right]. \quad (\text{A.66})$$

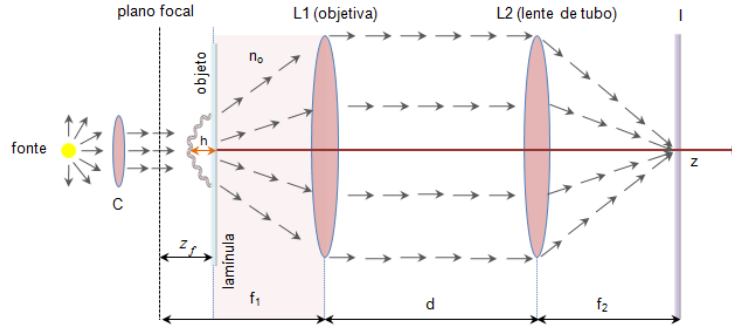


Figura A.6: Propagação do campo elétrico em um microscópio desfocalizado para observação de um objeto de fase curvo: objeto está desfocalizado de uma pequena distância z_f . As lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano I. A distância f_1 localiza o plano focal da objetiva. No entanto, cada ponto no plano xy está a uma distância $z_f - h(\vec{\rho})$ do plano focal.

Utilizando a representação do perfil de altura em série de Fourier, tem-se que,

$$C(\vec{\rho}) = -(z_f - h(\vec{\rho})) \frac{\Delta n}{n_o} \nabla^2 h(\vec{\rho}) = (z_f - h(\vec{\rho})) \frac{\Delta n}{n_o} \kappa(\vec{\rho}). \quad (\text{A.67})$$

Portanto, o contraste gerado por um objeto de fase curvo em um microscópio desfocalizado é também proporcional à desfocalização e à curvatura local do objeto de fase. Este fato possibilita o estudo da geometria de células curvas, que podem ser aproximadas por objetos de fase compostos por duas interfaces curvas com perfis de altura distintos h_1 e h_2 . Para esta situação, a equação para o contraste seria novamente a equação A.63, levando em conta que p_1 e p_2 seriam substituídos por h_1 e h_2 . Sendo assim, o contraste teria a forma,

$$C(\vec{\rho}) = \frac{\Delta n}{n_o} \left((z_f - h_1) \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) - (z_f - h_2) \nabla^2 h_2(\vec{\rho}) \right), \quad (\text{A.68})$$

onde $\nabla^2 h_1$ e $\nabla^2 h_2$ são as curvaturas locais da membrana h_1 e h_2 , respectivamente. A equação A.68 nos dá informação que ambas as membranas contribuem para um contraste final e, que dependendo da posição focal uma membrana poderá contribuir mais do que a outra. É este tipo de contraste MD que é gerado por hemácias quando observadas em microscópio óptico

desfocalizado, em que h_1 e h_2 representam a membrana superior e inferior, respectivamente. A partir da análise do contraste MD foi possível a determinação da forma de equilíbrio da hemácia. Uma demonstração completa dos cálculos pode ser vista nas teses de Glionna e Siman [24,36].

Na seção a seguir, iremos determinar a expressão teórica para a flutuação quadrática média do contraste MD, a partir da qual fomos capazes de obter informações das flutuações de altura de cada membrana de hemácias.

A.6 Flutuação Quadrática Média do Contraste

$$\langle \Delta C^2(\vec{\rho}) \rangle$$

Para estudar a flutuação do contraste via MD, o perfil de altura das interfaces deve ser reformulado, levando em conta a sua dependência temporal,

$$H(\vec{\rho}, t) = h(\vec{\rho}) + u(\vec{\rho}, t), \quad (\text{A.69})$$

com a seguinte correspondência no espaço de Fourier,

$$H(\vec{q}, t) = h(\vec{q}) + u(\vec{q}, t). \quad (\text{A.70})$$

onde h representa a parte independente do tempo e u a parte que flutua no tempo.

A flutuação do contraste é definida como,

$$\Delta C = C(\vec{\rho}, t) - \langle C(\vec{\rho}, t) \rangle. \quad (\text{A.71})$$

Utilizando a equação A.61, para a qual nenhuma aproximação é feita e considerado $h_{1/2}$ no lugar de $p_{1/2}$, pode-se escrever que o contraste para uma hemácia será dado por,

$$C(\vec{\rho}, t) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \left[H_1(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - h_1}{2k} q^2 \right) - H_2(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - h_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \quad (\text{A.72})$$

com a média temporal dada por,

$$\langle C(\vec{\rho}) \rangle = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \left[h_1(\vec{q}) \text{sen} \left(\frac{z_f - h_1}{2k} q^2 \right) - h_2(\vec{q}) \text{sen} \left(\frac{z_f - h_2}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \quad (\text{A.73})$$

onde $\langle H(\vec{\rho}, t) \rangle = \langle h(\vec{\rho}) \rangle + \langle u(\vec{\rho}, t) \rangle = h_{1/2}(\vec{\rho})$, pois $h_{1/2}$ 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 A.72 da equação A.73, temos,

$$\Delta C(\vec{\rho}, t) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[\left(H_1(\vec{q}, t) - h_1(\vec{q}) \right) \sin \left(\frac{(z_f - h_1)q^2}{2k} \right) - \left(H_2(\vec{q}, t) - h_2(\vec{q}) \right) \sin \left(\frac{(z_f - h_2)q^2}{2k} \right) \right] \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\} \quad (\text{A.74})$$

Como $H(\vec{q}, t) - h(\vec{q}) = u(\vec{q}, t)$ então,

$$\Delta C(\vec{\rho}, t) = \frac{2\Delta nk_0}{\sqrt{S}} \sum_{\vec{q}} \left[u_1(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - h_1(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) + \right. \quad (\text{A.75})$$

$$\left. u_2(\vec{q}, t) \text{sen} \left(\frac{z_f - h_2(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) \right] \text{sen}(\vec{q} \cdot \vec{\rho}). \quad (\text{A.76})$$

A fim de obtermos a flutuação quadrática média devemos elevar ao quadrado da função acima e realizar a média temporal. Iremos considerar as flutuações de altura das interfaces $u_{1/2}$ como variáveis estatisticamente independentes, de modo que os produtos cruzados entre u_1 e u_2 serão nulos e, portanto,

$$\langle \Delta C^2(\vec{\rho}, t) \rangle = \frac{(2\Delta nk_0)^2}{S} \sum_{\vec{q}} \left[|u_1(\vec{q})|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - h_1(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) + \right. \quad (\text{A.77})$$

$$\left. |u_2(\vec{q})|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - h_2(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) \right] \langle \text{sen}^2(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \rangle \quad (\text{A.78})$$

onde $|u^2(\vec{q})| = \langle u(\vec{q}, t)u^*(\vec{q}, t) \rangle$ representa o espectro de potência das flutuações de altura. Passando para o limite contínuo, tem-se,

$$\sum_{\vec{q}} \longrightarrow \frac{S}{(2\pi)^2} \int_{\vec{q}} d\vec{q} \quad (\text{A.79})$$

A integração da equação A.77 não será demonstrada aqui e pode ser vista em [36]. 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, $\vec{q} = q$. Após a integração chega-se ao resultado,

$$\langle \Delta C^2(\vec{\rho}, z_f) \rangle = \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_q q dq \left[|u_1(\vec{q})|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - h_1(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) + |u_2(\vec{q})|^2 \text{sen}^2 \left(\frac{z_f - h_2(\vec{\rho})}{2k} q^2 \right) \right]. \quad (\text{A.80})$$

A partir daqui, para não carregar muito a equação A.80, a variável tempo será omitida e a flutuação quadrática média será representada como uma função dependente explicitamente de z_f .

Total three-dimensional imaging of phase objects using defocusing microscopy: Application to red blood cells

P. M. S. Roma,¹ L. Siman,¹ F. T. Amaral,² U. Agero,¹ and O. N. Mesquita^{1,a)}

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

²*Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil*

(Received 20 February 2014; accepted 3 June 2014; published online 24 June 2014)

We introduce Defocusing Microscopy (DM), a bright-field optical microscopy technique able to perform total three-dimensional (3D) imaging of transparent objects. By total 3D imaging, we mean the determination of the actual shapes of the upper and lower surfaces of a phase object. We propose a methodology using DM and apply it to red blood cells subject to different osmolality conditions: hypotonic, isotonic, and hypertonic solutions. For each situation, the shapes of the upper and lower cell surface-membranes (lipid bilayer/cytoskeleton) are completely recovered, displaying the deformation of red blood cell (RBC) surfaces due to adhesion on the glass-substrate. The axial resolution of our technique allowed us to image surface-membranes separated by distances as small as 300 nm. Finally, we determine the volume, surface area, sphericity index, and RBC refractive index for each osmotic condition. © 2014 AIP Publishing LLC. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4884420>]

Standard optical microscopy imaging of phase objects is generally obtained with microscopes operating in Phase Contrast or Nomarsky configurations.^{1,2} However, even for objects with uniform refractive index, these techniques present difficulties for obtaining accurate full-field thickness profiles. Recently, new approaches known as quantitative phase microscopy techniques³⁻⁸ have adequately obtained full-field height profiles of phase objects with successful application in living cells. Despite this, in the case of red blood cells, these techniques are only able to provide the thickness profile and thickness amplitude fluctuations, such that height profile information of each particular cell surface-membrane (lipid bilayer/cytoskeleton) is not accessed.

Defocusing microscopy (DM) allows us to obtain a complete three-dimensional (3D) image of an red blood cell (RBC), and so to determine separately the shapes of the upper and lower cell membranes. New procedures to retrieve RBC volume, surface area, sphericity index, and refractive index using DM are also presented. All developed methods are applied to data on 25 RBCs immersed in three different solutions: hypotonic (200 mOsm/kg), isotonic (300 mOsm/kg), and hypertonic (400 mOsm/kg), and the differences in the lower membranes adhesion to the glass substrate are shown. For assessment of bio-mechanical properties over the RBCs surfaces, nanometer height fluctuations for each interface can be obtained separately, such that the effect of adhesion to the substrate can also be evaluated.^{9,10} A defocusing technique has been recently applied to 3D imaging of cells using a phase contrast microscope under white-light illumination, with transverse resolution of 350 nm and axial resolution of 900 nm.¹¹ This technique cannot resolve surface-membranes separated by an axial distance smaller than 900 nm, which is the case of most RBCs. Strikingly, our Defocusing Microscopy technique, using a bright-field defocused microscope and our

theoretical framework, can resolve surface-membranes of RBCs separated by axial distances down to 300 nm.

Transparent objects that would be invisible in a standard bright-field optical microscope can turn visible by defocusing the microscope, since the act of defocusing introduces a phase difference between the diffracted orders and the non-diffracted transmitted order (i.e., zero order). From contrast intensity measurements of images in two focal positions, one can obtain information about the phase of the optical electric field and reconstruct the height profiles of the phase object. The formalism of intensity equation has been used for this purpose,^{4,12} but in its present form there are no explicit phase terms taking into account the distance between the objective focal plane and the diffracting surfaces, such that the total 3D imaging is not feasible. In our approach, Fresnel diffraction theory and the formalism of propagation of the angular spectrum^{13,14} are used to propagate the light electric field throughout our defocused microscope. We treat the electric field as a scalar quantity and neglect polarization effects. As a result, the defocused electric field is represented by an integral over the diffracted wave-vectors (\vec{q}), where the positions of the objective focal plane (z_f) and the phase object surfaces appear explicitly, allowing us to obtain total 3D imaging of phase objects. Our model works for pure phase objects, such that in the case of RBCs the illumination light should be red filtered. For the total 3D imaging using DM, coherence of the illumination light is not an important issue. More details on the experimental set up are given in the supplementary material.¹⁵

In the model presented, all parameters associated to optical elements that are displaced to produce image defocusing are known.¹⁰ In our derivation below, defocusing is caused by the displacement of the microscope objective, which can be related to the displacement of other elements, as will be shown later. The results obtained are independent of the origin of the reference frame along z , adopted here as the plane where the RBC contrast has a minimum value, that

^{a)}E-mail: mesquita@fisica.ufmg.br

corresponds to cell largest diameter plane. The defocused light electric field that passes through a red blood cell, as shown in Figure 1(a), can be written as^{9,10,16-19}

$$E(\vec{\rho}, z_f) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_{-\infty}^{+\infty} \left[A_1(\vec{q}) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} e^{i\left(\frac{z_f - h_1(\vec{\rho})}{2k}\right)q^2} + A_2(\vec{q}) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} e^{i\left(\frac{z_f - h_2(\vec{\rho})}{2k}\right)q^2} \right] d\vec{q} - E_0, \quad (1)$$

where $h_1(\vec{\rho})$, $h_2(\vec{\rho})$ are the coordinates for the upper and lower RBC surface-membranes, respectively, E_0 is the amplitude of incident light electric field, $k = n_{ob}k_0$ is the light wavenumber, with n_{ob} being the objective immersion medium index of refraction and k_0 being the wavenumber in vacuum. The terms

$$A_1(\vec{q}) = \int_{-\infty}^{+\infty} E_0 e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} e^{i\Delta n k_0 h_1(\vec{\rho})} d\vec{\rho} \quad (2)$$

$$A_2(\vec{q}) = \int_{-\infty}^{+\infty} E_0 e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} e^{-i\Delta n k_0 h_2(\vec{\rho})} d\vec{\rho}$$

are the angular spectra of the electric field diffracted by the surface-membranes. Additionally, Δn is the refractive index difference between the RBC and its surrounding medium (uniform inside the RBC), and $h_{1/2}(\vec{\rho}, t) = h_{1/2}(\vec{\rho}) + u(\vec{\rho}, t)$, such that the time average $\langle h_{1/2}(\vec{\rho}, t) \rangle = h_{1/2}(\vec{\rho})$ and $u(\vec{\rho}, t)$

is the out-of-plane height fluctuation in the nanometer range. Since we are interested in equilibrium shapes of RBCs, Eqs. (1) and (2) are time averaged quantities. The second order cross terms $A_1(\vec{q})A_2(\vec{q})$ are neglected (in the worst case $(\Delta n k_0)^2 h_1 h_2 < 1$), which means that the incident light is diffracted by only one interface and the chance of being diffracted by the two interfaces is small. Naturally, higher order terms can be added if they become necessary for a better quality 3D image.

Defining the image contrast as $C(\vec{\rho}) = \frac{I(\vec{\rho}) - I_0}{I_0}$, where $I(\vec{\rho})$ is the intensity of the object image and I_0 is the background intensity, for first-order diffraction, the DM contrast for a RBC decomposed in spatial Fourier components \vec{q} is

$$C(\vec{\rho}, z_f) = \frac{2\Delta n k_0}{\sqrt{A}} \left\{ \sum_{\vec{q}} \left[h_2(\vec{q}) \sin\left(\frac{(z_f - h_2(\vec{\rho}))q^2}{2k}\right) - h_1(\vec{q}) \sin\left(\frac{(z_f - h_1(\vec{\rho}))q^2}{2k}\right) \right] \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) \right\}, \quad (3)$$

where A is the RBC surface area and $h(\vec{\rho}) = \frac{1}{\sqrt{A}} \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho})$. For the chosen reference frame, $h_1(\vec{\rho}) > 0$ and $h_2(\vec{\rho}) < 0$, but for convenience we will use positive quantities, such that $h_2 = -|h_2|$. For small defocusing distances the approximation $\sin((z_f - h)q^2/2n_{ob}k_0) \simeq (z_f - h)q^2/2n_{ob}k_0$ can be used, resulting in the DM contrast,

$$C(\vec{\rho}, z_f) = \frac{\Delta n}{n_{ob}} \left[(z_f - h_1(\vec{\rho})) \nabla^2 h_1(\vec{\rho}) + (z_f + |h_2(\vec{\rho})|) \nabla^2 |h_2(\vec{\rho})| \right], \quad (4)$$

with $\frac{1}{\sqrt{A}} \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) \sin(\vec{q} \cdot \vec{\rho}) q^2 = -\nabla^2 h(\vec{\rho})$. From this expression, we note that DM contrast is proportional to the object's local curvature ($\nabla^2 h \equiv \kappa$). Therefore, the flat glass-substrate is not visualized with DM. The limit of validity of Eq. (4) can be checked by measuring the linear region of $C \times z_f$. For a RBC this limit is $z = \pm 2 \mu\text{m}$ in relation to the middle plane (minimum contrast plane). Since the roughness of the interface $u(\vec{\rho}, t)$ can have large spatial wavenumbers q , Eq. (3) must be used to analyze height fluctuations of the RBC surface-membranes.^{9,10}

It is important to stress that the introduction of the surface-membrane height coordinates, $h_1(\vec{\rho})$ and $h_2(\vec{\rho})$, into the phase factors ($(z_f - h_{1/2})q^2/2k$) in Eq. (1), is what allows us to achieve total 3D imaging. None of the previous approaches using defocusing techniques considered this important factor before. The coupling between $h(\vec{\rho})$ and $\nabla^2 h(\vec{\rho})$, as shown in Eq. (4), is responsible for the high axial resolution achieved by defocusing microscopy, as will be shown later.

To obtain the RBC thickness profile and volume, we need to measure the time-averaged cell contrast at two different defocus distances: $\langle C_1 \rangle$ (at z_{f_1}) and $\langle C_2 \rangle$ (at z_{f_2}). Subtracting, pixel by pixel, the contrast image $\langle C_2 \rangle$ from $\langle C_1 \rangle$, we have

$$\langle C_2 \rangle - \langle C_1 \rangle = \frac{\Delta n}{n_{ob}} (z_{f_2} - z_{f_1}) \nabla^2 H, \quad (5)$$

where $H(\vec{\rho}) = h_1(\vec{\rho}) + |h_2(\vec{\rho})|$ is the cell thickness. Performing a Fourier transform of Eq. 5, the Laplacian term

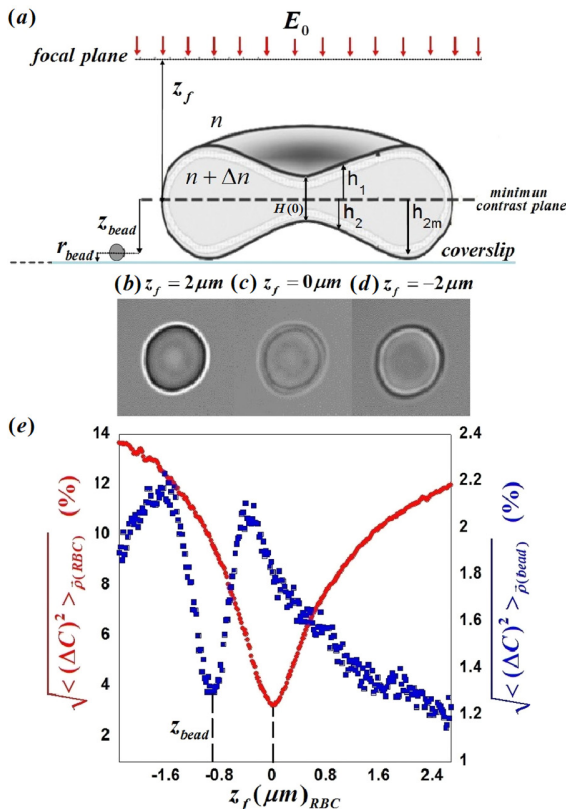


FIG. 1. (a) RBC model with the reference frame origin at the cell minimum contrast plane, defining $h_1 > 0$ and $h_2 < 0$ as the coordinates of the upper and lower surface-membranes, respectively. (b)–(d) Contrast images of a RBC at different defocusing distances z_f . (e) Contrast standard deviation profile as a function of defocusing distance z_f for a RBC and the bead. The minimum values for both profiles are clearly determined, and the distance between them is $|z_{bead}|$, such that $|h_{2m}| = |z_{bead}| + |r_{bead}| = |z_{bead}| + 0.099 \mu\text{m}$.

TABLE I. Data on RBC osmolality, volume, surface area, sphericity index $\bar{\chi}$, and RBC refractive index obtained from the full 3D imaging.

Osmolality (mOsm/Kg)	Radius (\bar{R}_M) (μm)	Volume (\bar{V}_M) (μm^3)	Surface area (\bar{A}_M) (μm^2)	$\bar{\chi}$	$n_{rbc} \lambda = 610 \text{ nm}$
200 ± 2	3.85 ± 0.23	129 ± 15	134 ± 11	0.92 ± 0.02	1.378 ± 0.003
300 ± 2	3.92 ± 0.17	94 ± 8	130 ± 9	0.77 ± 0.01	1.391 ± 0.003
400 ± 2	4.12 ± 0.20	91 ± 8	139 ± 11	0.70 ± 0.01	1.400 ± 0.005

gives rise to a $(-q^2)(h_1(\vec{q}) + |h_2|(\vec{q}))$ term, which divided by $-q^2$ and performing an inverse Fourier Transform, yields

$$H = \frac{n_{ob}}{\Delta n(z_{f_1} - z_{f_2})} \mathcal{F}^{-1} \left(\frac{\mathcal{F}\{\langle C_2 \rangle - \langle C_1 \rangle\}}{-q^2} \right). \quad (6)$$

If the values of z_f , n_{ob} , and Δn are known, the thickness profile map of the observed cell is obtained. In addition, if the pixel area value is known, the cell volume $V = A_{pixel} \times H(\vec{\rho})$ can be calculated. The mean thickness profiles for the 25 analyzed cells in hypotonic, isotonic, and hypertonic media are shown in the supplemental material,¹⁵ and the mean volume values are shown in Table I; these are in accordance with those reported by other techniques.^{6,20–22}

Using the thickness profile $H(\vec{\rho})$ and defining $\delta(\vec{\rho}) = h_1 - |h_2|$ as the asymmetry between the RBC surface-membranes, we have

$$h_1(\vec{\rho}) = \frac{H(\vec{\rho}) + \delta(\vec{\rho})}{2}, \quad h_2(\vec{\rho}) = \frac{-H(\vec{\rho}) + \delta(\vec{\rho})}{2}. \quad (7)$$

For $z_f = 0$, Eq. (4) can be rewritten as

$$\nabla^2 \delta + \frac{\nabla^2 H}{H} \delta = -\frac{2n_{ob}}{\Delta n H} C(\vec{\rho}, 0), \quad (8)$$

which is a non-homogeneous Helmholtz equation with variable coefficients, that can be solved numerically for $\delta(\vec{\rho})$ with the initial condition $\delta(\vec{\rho}) = 0$. Since $\frac{\nabla^2 H(\vec{\rho})}{H(\vec{\rho})}$ is a well-behaved function, the convergence of the fitting procedure is very robust. We define the phase object radius as the maximum contrast gradient position. In Table I, we show the radius results for all analyzed cells. From the returned $\delta(\vec{\rho})$ the total 3D imaging is obtained, as shown in Figures 2(a)–2(f). The three extreme experimental points on the border of each

interface are averaged between their consecutive neighbours in order to smooth the image of the border.

In Figures 2(g)–2(i), the average angular profiles for each group of RBCs subject to different osmotic pressures are displayed and the differences between the upper and lower membranes are evidenced. For hypotonic solution [200 mOsm/Kg; Figure 2(g)], the upper membrane is inflated due to water entrance and the lower membrane remains attached to the glass-substrate. In the isotonic case [300 mOsm/Kg; Figure 2(h)], it is seen that due to cell adhesion the lower membrane has a flatter height profile than the upper membrane. For the hypertonic case [400 mOsm/Kg; Figure 2(i)], the separation distance between the lower and the upper membrane decreases, and the cells exhibit a more pronounced dimple in the center region. For all cases, the adhesion contact region between the lower membrane and the glass-substrate is located, as shown in Figures 2(g)–2(i). For isotonic case the occurs in $\rho \simeq 2.5 \mu\text{m}$ and for hypertonic case $\rho \simeq 3 \mu\text{m}$. Since the height profile and the pixel area are known, the cell surface area can be calculated as $A = \int \sqrt{1 + \left(\frac{\partial h_{1/2}}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial h_{1/2}}{\partial y}\right)^2} dx dy$. From the surface area and volume, we calculate the sphericity index (χ).²³ All values are shown in Table I and are in accordance with those reported in previous studies using other techniques.^{21,24}

The DM 3D imaging method is independent of the chosen reference system, and thus, can be efficiently used to image red blood cells which are flowing through a glass capillary or a microfluidic device. To avoid moving the objective, one can use a beam-splitter to split the images and use two cameras focused in different positions to collect them. The relation between objective defocusing (Z_o) and camera defocusing (Z_c) is $Z_c = M^2 Z_o$, where M is the magnification of the objective. For a $M = 100X$ objective, the defocusing effect of an objective displacement of $1 \mu\text{m}$ is obtained by

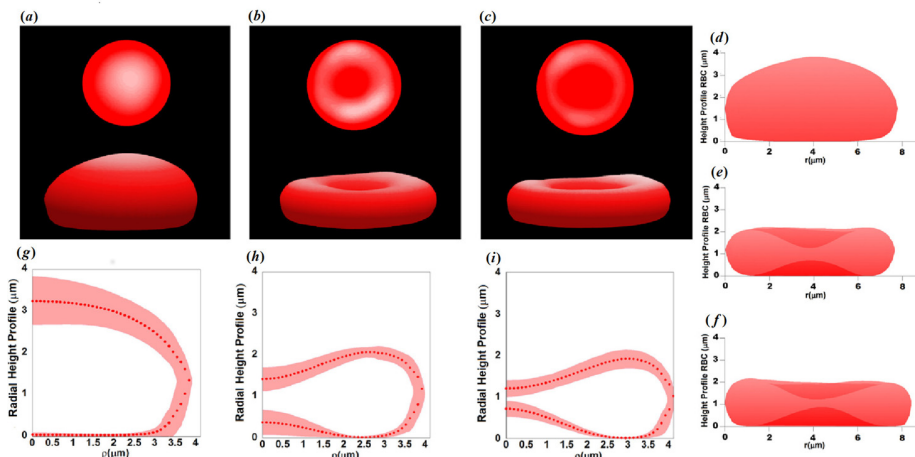


FIG. 2. Total 3D Imaging of red blood cells in (a) and (d) hypotonic (200 mOsm/Kg), (b) and (e) isotonic (300 mOsm/Kg) and (c) and (f) hypertonic (400 mOsm/Kg) solutions. (g)–(i) Radial height profiles averaged over all analyzed cells. The shaded areas represent the standard deviations of the average over the 25 RBCs. (Multimedia view) [URL: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4884420.1>][URL: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4884420.2>][URL: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4884420.3>]

displacing the camera by 1 cm. Therefore, by using two cameras with an optical path difference of 1 cm, the images recorded by each camera will correspond to the contrasts C_1 and C_2 of Eq. (5), where $z_{f1} - z_{f2} = 1 \mu\text{m}$. The DM technique can also be used for total 3D imaging of high motility cells and to obtain information about the upper and lower membranes, the latter in dynamical contact with the substrate.

The axial resolution of DM depends on the sensitivity of the image contrast measurement, optical contrast of the phase object, and mean curvature of the surfaces considered. To estimate the axial resolution, let us determine the difference in contrast (Eq. (4)) between the two surfaces at $\vec{\rho} = 0$, where the surface-membrane distance is minimum for RBCs immersed in isotonic (300 mOsm/Kg) and hypertonic (400 mOsm/Kg) solutions

$$\Delta C(0,0) = \frac{\Delta n}{n_{ob}} H(0) \nabla^2 H(0). \quad (9)$$

Here, $H(0) = h_1(0) + |h_2(0)|$ is the axial distance between the two surface-membranes in the RBC center, as shown in Figure 1(a). The minimum axial distance $H(0)_{min}$ is thus given by

$$H(0)_{min} = \frac{n_{ob} \Delta C_{min}}{\Delta n \nabla^2 H(0)}. \quad (10)$$

Using $\Delta C_{min} = 10^{-2}$ as the contrast sensitivity, an oil immersion objective ($n_{ob} = 1.5$) and the typical values for isotonic RBCs were $\Delta n = 0.06$, and $\nabla^2 H(0) = 1.7 \mu\text{m}^{-1} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$, the minimum axial distance is approximately 150 nm, sufficient to resolve the axial separation between the two RBC surface-membranes, for all solution osmolalities studied. In Figure 3 a total 3D image of a RBC in a hypertonic solution is showing that we are able to resolve the distance between the two membrane surfaces at the cell center, which is 300 nm and therefore confirms the estimates above.

In order to obtain $H(\vec{\rho})$ we need the value of Δn , which is basically defined by the RBC hemoglobin concentration. A good assessment of the red cell refractive index (n_{rbc}) can be obtained by measuring the distance between the minimum contrast plane to the glass coverslip plane, which is $|h_{2m}|$ in the RBC rim position. The layout of the refractive index experiment is seen in Figure 1(a), where polystyrene beads of diameter $d = 0.198 \mu\text{m}$ are deposited on the glass

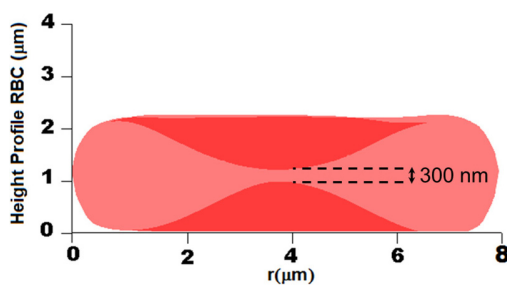


FIG. 3. Total 3D image of a RBC in a hypertonic solution (400 mOsm/Kg). The surface-membranes are clearly imaged, indicating that the axial resolution in this case is better than 300 nm. (Multimedia view) [URL: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4884420.4>]

coverslip, such that the location of the glass slide is determined from a z-scan through the defocused image of the bead. The minimum bead contrast occurs when the objective focal plane coincides with its diameter. We then move the objective from this position up to the RBC minimum contrast plane, which corresponds to the cell largest diameter plane. To be more quantitative, one can select images around the bead and around the RBC as the objective focal plane is scanned. The recorded images must contain the bead and the RBC completely, as shown in Figures 1(b)–1(d). Since there is no light absorption, the spatial average intensity of the complete image is equal to the background intensity, $\langle I \rangle_{\vec{\rho}} = I_0 = (1/N_p) \sum_i I_i$, where N_p is the total number of pixels of the image and I_i is the intensity of each pixel. In order to define the minimum contrast position, we calculate the standard deviation of the spatially averaged intensity I for each frame and divide it by I_0 , which corresponds to $\sqrt{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2} / \langle I \rangle = \sqrt{\langle \Delta C^2 \rangle_{\vec{\rho}}}$, with $\langle I^2 \rangle = (1/N_p) \sum_i (I_i)^2$.

In Figure 1(e), the behavior of $\sqrt{\langle \Delta C^2 \rangle_{\vec{\rho}}}$ as a function of z_f is shown, from which the minimum values of $\sqrt{\langle \Delta C^2 \rangle_{\vec{\rho}}}$ for a RBC ($z_f = 0$) and of the polystyrene bead ($z_f = z_{bead}$) are clearly determined. Hence, $|h_{2m}| = |z_{bead}| + |r_{bead}| = |z_{bead}| + 0.099 \mu\text{m}$. The obtained values for the RBC refractive index ($\lambda = 0.610 \mu\text{m}$) are shown in Table I, in agreement with results obtained using different techniques.^{6,22,25} As expected, due to water entrance into the cell, for the hypotonic solution n_{rbc} is lower than in the other cases.

In conclusion, in this paper we present a methodology to obtain total 3D imaging of phase objects using a defocused bright-field optical microscope. We apply the method to RBCs subject to different solution osmolalities and determine the cell's shapes and surface-membranes deformation due to adhesion to the glass-substrate. Strikingly, our results show that the defocusing microscopy axial resolution for RBCs can be smaller than 300 nm, allowing clear imaging of both surface-membranes. In addition, we obtain the cell average refractive index, surface area, volume, and sphericity index over a group of 25 red blood cells under different osmotic conditions, showing that DM can be used for monitoring certain pathologies. Since DM does not require the use of any extra optical element, the technique could be easily adopted by non-specialists.

We would like to acknowledge the financial support from the Brazilian Agencies CNPq, FAPEMIG, PRONEX-FACEPE, Instituto Nacional de Fluidos Complexos e Aplicações (INFCx), and FAPEAM. The authors also thank Michael O'Carroll for useful discussions and to Ronald Dickman for English revision.

¹F. Zernike, *Physica* **9**, 686 (1942).

²G. Nomarski, *J. Phys. Radium* **16**, S88 (1955).

³T. E. Gureyev and K. A. Nugent, *Opt. Commun.* **133**, 339–346 (1997).

⁴D. Paganin and K. A. Nugent, *Phys. Rev. Lett.* **80**, 2586 (1998).

⁵E. D. Barone-Nugent, A. Barty, and K. A. Nugent, *J. Microsc.* **206**, 194 (2002).

⁶B. Rappaz, A. Barbul, Y. Emery, R. Korenstein, C. Depeursinge, P. J. Magistretti, and P. Marquet, *Cytometry* **73A**, 895 (2008).

⁷G. Popescu, Y. Park, W. Choia, R. R. Dasaria, M. S. Feld, and K. Badizadegana, *Blood Cells Mol. Dis.* **41**, 10 (2008).

- ⁸V. L. Kononenko, *Advanced Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses*, edited by V. V. Tuchin (Wiley-VCH Verlag GmbH Co.), pp. 155–210.
- ⁹G. Glionna, C. K. Oliveira, L. G. Siman, H. W. Moyses, D. M. U. Prado, C. H. Monken, and O. N. Mesquita, *Appl. Phys. Lett.* **94**, 193701 (2009).
- ¹⁰L. Siman, P. M. S. Roma, F. T. Amaral, U. Agero, and O. N. Mesquita, “Shape Reconstruction and Height Fluctuation of Red Blood Cells using Defocusing Microscopy” (unpublished).
- ¹¹T. Kim, R. Zhou, M. Mir, S. D. Babacan, P. S. Carney, L. L. Goddard, and G. Popescu, *Nat. Photonics* **8**, 256–263 (2014).
- ¹²M. R. Teague, *J. Opt. Soc. Am.* **73**, 1434 (1983).
- ¹³M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics* (Cambridge University Press, New York, 1999).
- ¹⁴J. W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics* (McGraw-Hill Co., Inc., 2002).
- ¹⁵See supplementary material at <http://dx.doi.org/10.1063/1.4884420> for thickness profile results, as well as information on the experimental set up, materials and procedures.
- ¹⁶L. G. Mesquita, U. Agero, and O. N. Mesquita, *Appl. Phys. Lett.* **88**, 133901 (2006).
- ¹⁷U. Agero, C. H. Monken, C. Ropert, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita, *Phys. Rev. E* **67**, 051904 (2003).
- ¹⁸J. C. Neto, U. Agero, D. C. Oliveira, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita, *Exp. Cell Res.* **303**(2), 207 (2005).
- ¹⁹J. C. Neto, U. Agero, R. T. Gazzinelli, and O. N. Mesquita, *Biophys. J.* **91**, 1108 (2006).
- ²⁰Y. Park, C. A. Best, T. Kuriabova, M. L. Henle, M. S. Feld, A. J. Levine, and G. Popescu, *Phys. Rev. E* **83**, 051925 (2011).
- ²¹E. Evans and Y. C. Fung, *Microvasc. Res.* **4**, 335 (1972).
- ²²A. I. Yusipovich, E. Yu. Parshina, N. Yu. Brysgalova, A. R. Brazhe, N. A. Brazhe, A. G. Lomakin, G. G. Levin, and G. V. Maksimov, *J. Appl. Phys.* **105**, 102037 (2009).
- ²³P. B. Canham and A. C. Burton, *Circ. Res.* **22**, 405 (1968).
- ²⁴P. B. Canham, *J. Theor. Biol.* **26**, 61 (1970).
- ²⁵B. Rappaz, A. Barbul, A. Hoffmann, D. Boss, R. Korenstein, C. Depeursinge, P. J. Magistretti, and P. Marquet, *Blood Cell Mol. Dis.* **42**, 228 (2009).

Friday, April 25, 2014

Counterintuitive Defocusing Technique Produces 3-D Microscope Images

By defocusing a microscope, biologists have developed a simple technique that produces three-dimensional images of red blood cells.

The Physics arXiv Blog

One of the great inventions in history was the development of the microscope. The ability to see the enormous variety of life and patterns on such a tiny scale changed our understanding of the world and our relationship to it.

Since then microscopists have dramatically improved their instruments so that they record not only with visible light but other wavelengths and even with other recording media entirely such as electrons and neutrons and so on.

One of the most difficult challenges, however, is determining the three-dimensional structure of small objects. Healthy red blood cells, for example, have a famous doughnut-shaped structure and changes to this structure are an important indicator of various diseases and conditions.

These shapes are straightforward to see but determining their entire 3-D structure with a resolution of a few hundred nanometers is tricky; not least because red blood cells are largely transparent and difficult to see with ordinary bright field microscopy.

Today, Paula Roma and pals at the Federal University of Minas Gerais in Brazil reveal a new and relatively simple technique for determining the entire 3-D structure of red blood cells based on the counterintuitive technique of defocusing.

Biologists have long recognized the limitations of bright field microscopy with biological samples because many are largely transparent. (Bright field microscopy is the ordinary microscope technique that most people come across in high school.)

Light shines onto or through the sample revealing anything that strongly absorbs or scatters light.

The trouble is that anything that is transparent is more or less invisible because light passes straight through it. And unfortunately, many biological samples fall into this category—including red blood cells which are largely transparent.

One way round this is to defocus the image slightly. Since the red blood cells have a refractive index, they bend the light that passes through it. This bending introduces a phase change in the light.

This phase change makes it easier to separate this light from light that has not passed through cell. And by doing this, the red blood cells become darker and easier to see.

That allows more detailed analysis of the cells. By measuring the changes in intensity that this process introduces, it is possible to work out the shape of the surface generating the phase changes. So that gives a three dimensional image of the upper surface of the cell.

Now Roma and co say it's possible to go further. They show that by taking two images of the cell, both defocused by different amounts, it is possible to work out the shape of the cell's bottom surface as well. In other words, this weird kind of defocused stereo image gives you the 3-D shape of the entire cell.

The results are impressive. The technique works with ordinary white light, although this has to be filtered to remove the red wavelengths that red blood cells might absorb.

To get two images of the same cell, Roma and co use a beam splitter to send light to two cameras that are both defocused by different amounts. The results can then be processed using a straightforward algorithm to produce 3-D images of the cells

To test the idea, Roma and co placed red blood cells in various concentrations of salt solutions to make them swell. They recorded images of 25 cells and processed the results, which are shown above.

They say the images have a resolution of within 300 nanometers, significantly better than is possible with similar techniques. In particular, they show how the cells adhere to the surface they are attached to.

The setup is also relatively straightforward. "The technique could be easily adopted by nonspecialists," they say.

That's an interesting result that shows how fascinating low cost advances can still be made in microscopy.

Ref: <http://arxiv.org/abs/1404.2968> : Total 3D Imaging Of Phase Objects Using Defocusing Microscopy: Application o Red Blood Cells

Lista de Figuras

- 2.1 Imagem obtida por microscopia eletrônica. Em condições normais, uma hemácia possui o formato de disco bicôncavo e tem como principal função o transporte de oxigênio através do corpo. Foto: Dave McCarthy and Annie Cavanagh/Wellcome Trust. 8
- 2.2 Comparação lado-a-lado de imagens experimentais e perfis correspondentes obtidos por métodos computacionais de hemácias na forma de estomatócitos III, II e I (a - c), discóide (d) e equinócitos I, II e III (e - g). Figura retirada de [43]. 10
- 2.3 Efeitos na forma de hemácias devido às diferenças na concentração de solutos em lados opostos da membrana da célula. Partindo da esquerda para a direita, retrata-se a forma das hemácias quando imersas em solução hipotônica, isotônica e hipertônica, respectivamente. Figura retirada de [46]. 11
- 2.4 (a) Morfologia da célula sanguínea saudável, forma geométrica discóide. (b) rede de espectrina obtida por microscópio eletrônico. (c) Esquema da membrana das hemácias e as suas proteínas. Figura retirada de [30,45]. 12
- 2.5 Representação dos três modos de deformação da membrana. Em (a) expansão/compressão, (b) curvatura e em (c) cisalhamento da membrana. Figura retirada de [30]. 14
- 2.6 (a) Modelo de acoplamento entre citoesqueleto e bicamada lipídica. (b) Esquema ilustrando flutuações fortemente acopladas. Em (c-d) esquema ilustrando a relação entre a flutuação e a curvatura. 19

-
- 3.1 Foto dos microscópios do Laboratório de Física Biológica da UFMG/ICEX: Nikon TE300 e Nikon Ti-E. 22
- 3.2 Correção do nível de cinza na imagem. 25
- 3.3 Nível de cinza (NC) versus intensidade luminosa (I) para as câmeras Uniq (a) e CMOS (b). A linha em vermelho representa o ajuste linear, com $NC_{Uniq} = -57.9 + 1447I$ e $NC_{CMOS} = -9.89 + 26I$, evidenciando a linearidade das câmeras. 26
- 3.4 Gráfico da calibração da taxa de captura da câmera CMOS para experimentos com hemácias. Em (a) temos o contraste normalizado pelo valor máximo do contraste observado em função da taxa de captura. Em (b) temos a flutuação quadrática média do contraste normalizada pelo valor máximo da flutuação observada em função da taxa de captura. A partir de 333 fps temos uma saturação nas amplitudes, indicando que a partir desta taxa, conseguimos medir flutuações das membranas de hemácias com todos os q 's observáveis em nosso sistema ($q \sim 12 \mu m^{-1}$). 28
- 4.1 (a) Representação da hemácia com o referencial no plano médio da célula (z_{rbc}): Δf representa a distância entre o plano médio da célula z_{rbc} e o plano focal da objetiva e h_1 e h_2 são as distâncias entre z_{rbc} e a membrana superior e inferior, respectivamente. Em (b) temos a imagem do contraste acima ($\Delta f = 2 \mu m$), (d) abaixo ($\Delta f = -2 \mu m$) e sobre o (c) plano médio da célula ($\Delta f = 0 \mu m$). 31
- 4.2 Comportamento de $\langle C(\vec{\rho}) \rangle$ em função da desfocalização Δf . O perfil radial do contraste médio foi determinado em anéis com espessura de 3 *pixels*, gerados desde a região central ($0.29 \mu m$) até a região próxima à espessura máxima ($2.35 \mu m$). Este resultado nos diz que o contraste não é homogêneo ao longo do perfil da hemácia, ou seja, que há uma assimetria ligada à geometria da célula. Além disso, a linearidade de $\langle C \rangle \times \Delta f$ valida a equação 4.2. 33
-

-
- 4.3 Em (a) temos o mapa de espessura de uma única hemácia imersa em solução isotônica. Em (b) temos a reconstrução 3D desse mapa, em (c) o perfil de espessura da seção reta e em (d) o perfil radial de espessura desta hemácia, obtido por uma média angular sobre o mapa de espessura. 36
- 4.4 Métodos utilizados na determinação do raio da hemácia (r_{rbc}). Em (a) representação de uma hemácia em $\Delta f = 2\mu\text{m}$. Em (b) temos o perfil radial do contraste (pontos em vermelho) e de sua derivada $\frac{d\langle C \rangle}{d\rho}$ (pontos em azul). As setas indicam o raio da hemácia pelos dois critérios. 37
- 4.5 Perfil radial completo do contraste médio sobre 25 células analisadas em solução (a) hipotônica e (c) hipertônica. Em (b) sobre 42 células em solução isotônica [24]. O círculo em cinza indica a região do efeito de difração que deve ser evitada. . . . 41
- 4.6 Em (a) temos o perfil radial médio da assimetria de uma hemácia normal e, a área em cinza representa a dispersão relativa à média sobre 20 condições iniciais diferentes para ζ . As condições iniciais consistiram em matrizes de 128×128 de zeros, uns e de números aleatórios. Em (b) temos a imagem 3D da assimetria retornada pelo ajuste da equação 4.15 usando a função *lsqcurvefit* para uma hemácia em condição isotônica e em (c) sua respectiva imagem 3D total. 44
- 4.7 Imagem 3D total de uma hemácia em solução isotônica visualizada sob diferentes ângulos. A barra de cores representa a espessura da hemácia em μm 46
-

- 4.8 (a) Representação do sistema experimental utilizado na determinação do índice de refração com o sistema de referência no plano de contraste mínimo da hemácia z_{rbc} . Com z_b representando o plano médio da bolinha, Δf a distância entre o z_{rbc} e o plano focal da objetiva e h_1 e h_2 são as coordenadas da membranas superior e inferior, com relação plano z_{rbc} , respectivamente. Em (b) Temos o perfil do desvio padrão do contraste em função de Δf da hemácia e da bolinha. O perfil de ambos os valores são claramente determinados, e a distância entre eles é $|d|$, tal que $|h_{2m}| = |d| + |r_b| = |d| + 0.099 \mu m$. 47
- 5.1 (a) Mapa de espessura de uma hemácia imersa em solução (a) hipotônica, (b) isotônica e (c) hipertônica, e suas respectivas reconstruções 3D de espessura (d - f). (g - i) Perfil radial médio de espessura para 25 hemácias analisadas em cada solução. A área sombreada representa a dispersão dos dados em relação ao valor médio. 54
- 5.2 (a/c/e) temos o perfil radial de altura h_1 (pontos) e h_2 (quadrados) retornados pelo AG e a dispersão (área cinza). (b/d/f) as curvaturas locais κ_1 (pontos) e κ_2 (quadrados) para cada membrana. *O gráfico (c-d) foi gentilmente cedido por Siman.* . 56
- 5.3 Imagem 3D total da hemácia em soluções (a/d) hipotônica, (b/e) isotônica e (c/f) hipertônica. (g-i) Perfil radial médio de altura sobre todas as células analisadas. A área sombreada representa o desvio em relação à média sobre 25 hemácias. . . 59
- 5.4 Distribuição dos perfis de altura $h_{1/2}$ para $\Delta f=0/2\mu m$, para uma hemácia sob condição osmótica isotônica (a) e hipotônica (b). Este resultado ilustra que independente da distância focal utilizada, o método é consistente, desde que a distância focal esteja dentro da faixa de regime linear do contraste (figura 4.2). Os perfis para $\Delta f=2 \mu m$ foram levemente deslocados com relação à outra posição focal avaliada para uma melhor visualização do resultado. 61
-

-
- 5.5 Caracterização dos parâmetros morfológicos de uma hemácia em forma de estomatócito obtidos a partir da análise do contraste MD utilizando o método Assimetria. A barra de cores representa a espessura da hemácia em μm 62
- 5.6 Caracterização dos parâmetros morfológicos de uma hemácia em forma de equinócito obtidos a partir da análise do contraste MD utilizando o método Assimetria. A barra de cores representa a espessura da hemácia em μm 63
- 5.7 Representação dos perfis radiais médios de altura $h_{1/2}$ retornados pelos métodos AG (pontos) e Assimetria (quadrados vazios) e a dispersão (área cinza) relativa à média sobre as 25 hemácias, sujeitas a três diferentes soluções: (a) hipotônica, (b) isotônica e (c) hipertônica. A dispersão apresentada é referente ao método Assimetria. 64
- 5.8 Em (a-c) representamos a média sobre todos os perfis de flutuação quadrática média das 25 hemácias em solução hipotônica, isotônica e hipertônica, respectivamente. 66
- 5.9 Em (a-c) apresentamos a média dos ajustes retornados pelo AG, onde os pontos representam o dado de $\langle (\Delta C)^2 \rangle$ e a linha contínua representa a média sobre os 10 ajustes finais. A área em cinza representa a dispersão em relação à média e reflete a variabilidade natural das células. 67
- 5.10 Perfis radiais das flutuações em altura em solução (a) hipotônica (b) isotônica e (c) hipertônica retornado pelo AG para cada membrana. Os pontos em azul representam a membrana superior das células e os quadrados em vermelho representam a 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 ao movimento lateral da célula. 68
-

- 5.11 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. Na figura 5.10 as flutuações retornadas pelo AG, representam as flutuações u_z , que é a projeção em z da flutuação total. 69
- 5.12 Perfil radial médio de $k_{c_{1/2}}$ para hemácias imersas em solução hipotônica (a), isotônica (b-c) e hipertônica (d-e), respectivamente. Os símbolos vazios representam o potencial sem correção e os símbolos cheios o potencial corrigido. 72
- 5.13 (a) Representação de uma membrana plana e quadrada, de lado l_0 e espessura d . (b) Ao curvamos a membrana pelas extremidades resulta em uma expansão/compressão das duas superfícies. Com R o raio de curvatura definido até o plano neutro l_0 , K_{A_1} e K_{A_2} representam os módulos de expansão/compressão da superfície superior e inferior, respectivamente. 73
- 5.14 Perfil radial médio de $\gamma_{1/2}$ para hemácias imersas em solução hipotônica (a), isotônica (b - c) e hipertônica (d - e), respectivamente. Os símbolos vazios representam o potencial sem correção e os símbolos cheios o potencial corrigido. 76
- 5.15 (a) Termo de curvatura ($2H_{1/2}^2 - K_{1/2}$) da membrana superior h_1 (pontos) e inferior h_2 (quadrados) em solução isotônica. (b) γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$ e (c) γ_2 versus $4(2H_2^2 - K_2)$ com ajuste linear $\gamma_{1/2} = K_{A_{1/2}} \times 4(2H_{1/2}^2 - K_{1/2}) + \gamma_{0_{1/2}}$ [38]. 77
- 5.16 Em (a) representação do envelope cilíndrico. O envelope possui curvaturas principais $C_L = \frac{1}{R_L}$ e $C_T = \frac{1}{R_T}$. (b) Ilustração da área da membrana da hemácia delimitada por uma circunferência de raio $R \sim 2 \mu m$. (c) Residual γ_R versus a distância da membrana inferior ao substrato (h_2). O potencial alcança um valor máximo quando $h_2 = 0$, que é a região em que a célula toca o substrato [38]. 79
-

- 5.17 (a) Termo de curvatura ($2H_1^2 - K_1$) da membrana superior h_1 (pontos) em solução hipotônica. (b) γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$. (c) ajuste linear $\gamma_1 = K_{A_1} \times 4(2H_1^2 - K_1) + \gamma_{0_1}$ até $\rho \leq 1 \mu m$ 82
- 5.18 (a) Termo de curvatura ($2H_{1/2}^2 - K_{1/2}$) da membrana superior h_1 (pontos) e inferior h_2 (quadrados) em solução hipertônica. (b) γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$ e (c) γ_2 versus $4(2H_2^2 - K_2)$. Em (d) temos o gráfico de γ_1 versus $4(2H_1^2 - K_1)$ até $\rho \leq 1 \mu m$ 83
- 5.19 Perfil radial de espessura da membrana da célula (bicamada + citoesqueleto) em (a) solução hipotônica, (b) solução isotônica e em (c) solução hipertônica. 85
- 5.20 Perfil radial médio de $\sigma_{1/2}$ para hemácias imersas em solução hipotônica (a), isotônica (b-c) e hipertônica (d-e), respectivamente. Os símbolos vazios representam o potencial sem correção e os símbolos cheios o potencial corrigido. Em (f) temos ilustrado a área da circunferência de raio r definida pela região de adesão/contato da membrana inferior ao substrato 86
- A.1 Esquema de um objeto observado por um microscópio óptico invertido com a óptica corrigida no infinito. O objeto é posicionado no plano focal da objetiva e é iluminado por feixe de raios paralelos. Ao passar pelo objeto a luz transmitida e difratada pelo objeto são coletadas pela objetiva que conjuga a sua imagem no infinito. Ao utilizarmos uma lente de tubo, a imagem passa a ser conjugada no plano imagem. 98
- A.2 Coordenadas do sistema de referência: (a) no espaço real e (b) no espaço de Fourier dos vetores de ondas. 100
- A.3 Esboço de um objeto de fase. \vec{E}_0 é o campo elétrico incidente; $h(\vec{\rho})$ é a amplitude do objeto; n e $n + \Delta n$ são os índices de refração do meio por onde o campo elétrico se propaga; $\vec{\rho}$ é o vetor posição no plano (x, y) perpendicular à direção z de propagação do campo elétrico 103
-

- A.4 Esquema do microscópio desfocalizado. O objeto está desfocalizado de uma pequena distância z_f em relação ao plano focal da objetiva representado por f_1 ; as lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano I. 105
- A.5 Propagação do campo elétrico em um microscópio desfocalizado para observação de uma célula plana: a lamínula está localizada a uma pequena distância z_f em relação ao plano focal da objetiva e as interfaces são localizadas por p_1 e p_2 . Sendo assim, a interface 1 está localizada a uma distância $z_f - p_1$ do plano focal enquanto a interface 2 está localizada a uma distância $z_f - p_2$ do mesmo plano. Na região entre as interfaces p_1 e p_2 o índice de refração $n + \Delta n$ e o meio n são considerados homogêneos e isotrópicos. 111
- A.6 Propagação do campo elétrico em um microscópio desfocalizado para observação de um objeto de fase curvo: objeto está desfocalizado de uma pequena distância z_f . As lentes estão separadas por uma distância d e a imagem é formada desfocalizada no plano I. A distância f_1 localiza o plano focal da objetiva. No entanto, cada ponto no plano xy está a uma distância $z_f - h(\vec{\rho})$ do plano focal. 113
-

Referências Bibliográficas

- [1] **G. Y. Lee and C. T. Lim** 2007 Biomechanics approaches to studying human diseases *Trends Biotechnol.* **25**, 111
 - [2] **G. Y. H. Lee and C. T. Lim** 2007 Nanotechnology and human diseases. *COSMOS* **3**, 89
 - [3] **C. T. Lim, E. H. Zhou, and S. T. Quek** 2006 Mechanical models for living cells: a review *J. Biomech.* **39**, 195
 - [4] **D. Voet and J. G. Voet** Bioquímica 2013 *Porto Alegre: Artmed.*
 - [5] **B. Alberts et al.** Molecular Biology of the cell 1994 *Garland Publishing, New York.*
 - [6] **F. Brochard and J. F. Lennon** 1975 Frequency Spectrum of Flicker Phenomenon In Erythrocytes. *Le Journal De Physique* **36**(11), 1035–1047.
 - [7] **Y. K. Park et al.** 2010 Metabolic remodeling of the human red cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 1289-1294
 - [8] **T. Betz et al.** 2009 ATP-Dependent mechanics of red blood cells *Proc. Nat. Am. Soc.* **106**, 15320-15325
 - [9] **S. Levin and R. Korenstein** 1991 Membrane fluctuations in erythrocytes are linked to MgATP - dependent dynamic assembly of membrane skeleton. *Biophys. Journal* **60**, 733
 - [10] **N. Gov, A.G. Zilman and S. Safran** 2003 Cytoskeleton confinement of red blood cell membrane fluctuations. *Phys. Rev. Lett* **90**, 228101
-

-
- [11] **N. Gov and S. Safran** 2004 Membrane undulations driven by force fluctuations of active proteins. *Phys. Rev. Lett* **26**, 268104
- [12] **N. Gov and S. Safran** 2005 Red-blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects. *Biophys. J.* **88**, 1859
- [13] **N. Gov** 2007 Active elastic network: Cytoskeleton of red blood cell *Phys. Rev. E* **75**, 011921
- [14] **T. Auth, S. A. Safran and N. Gov** 2007 Fluctuations of coupled fluid and solid membranes with application to red blood cells *Phys. Rev. E* **76**, 051910
- [15] **G. Bao and S. Suresh** 2003 Cell and molecular mechanics of biological materials *Nat Mater* **2**, 715-725
- [16] **D.E. Discher, N. Mohandas and E. A. Evans** 1994 Molecular maps of red cell deformation: Hidden elasticity and in situ connectivity *Science* **266**, 1032-1035
- [17] **F. Zernike** 1942 Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects Part I *Physica* **9**, 686-698
- [18] **F. Zernike** 1942 Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects Part II *Physica* **9**, 974-986
- [19] **G. Nomarski** 1955 Microinterféromètre différentiel à ondes polarisées *J. Phys. Radium* **16**, S88-S88
- [20] **B. Rappaz et al.** 2008 Comparative Study of Human Erythrocytes by Digital Holographic Microscopy, Confocal Microscopy and Impedance Volume Analyzer *Cytometry* **73A**, 895
- [21] **G. Popescu et al.** 2008 Imaging Red Blood Cell dynamics by quantitative phase microscopy *Blood Cells, Mol. Dis.* **41**, 10-16
- [22] **V. L. Kononenko** Characterization of Red Blood Cells Rheological and Physiological State Using Optical Flicker Spectroscopy: Advanced
-

- Optical Flow Cytometry: Methods and Disease Diagnoses 2011 *Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA*. 155–210
- [23] **G. Glionna et al.** 2009 Tomography of fluctuating biological interfaces using defocusing microscopy *Applied Phys. Lett.* **94**, 193701
- [24] **L. Siman** 2013 Desenvolvimento de métodos em microscopia óptica para obtenção de parâmetros biomecânicos de células e moléculas únicas *Tese de Doutorado DF, UFMG*
- [25] **P. M. S. Roma et al.** 2014 Total 3–D imaging of phase objects using defocusing microscopy: application to red blood cells. *Appl. Phys. Lett.* **104**, 251107 (2014)
- [26] **T. Kim et al.** 2014 White light diffraction tomography of unlabelled live cells *Nature Photonics* **8**, 256–263
- [27] **A. Zilker et al.** 1987 Dynamical Reflection Interference Contrast (RIC) Microscopy. A New Method to Study Surface Excitations of Cells and to Measure Membrane Bending Elastic-Moduli. *J. Physique* **48**, 2139
- [28] **G. Popescu et al.** 2006 Red Blood Cell Fluctuations During Osmolarity Changes *Optical Society of America* **107**, 1289-1294
- [29] **Y. K. Park et al.** 2011 Measurement of the nonlinear elasticity of red blood cell membranes *Phys. Rev. E* **83**, 051925
- [30] **Y. Kim et al.** 2012 Measurement Techniques for Red Blood Cell Deformability: Recent Advances, Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology. ISBN: 978-953-51-0753-8, *InTech*, DOI: 10.5772/50698
- [31] **U. Agero et al.** 2003 Cell Surface Fluctuations Studied with Defocusing Microscopy *Physical Review E* **67**, 051904
- [32] **J. C. Neto et al.** 2005 Real-time Measurements of Surface Dynamics on Macrophages and the Phagocytosis of Leishmania Parasites *Experimental Cell Research* **303**, 207
-

-
- [33] **L. G. Mesquita, U. Agero, and O. N. Mesquita** 2006 Defocusing Microscopy: An approach for Red Blood Cell Optics *Applied Physics Letters* **88**, 133901
- [34] **J. C. Neto et al.** 2006 Measuring Optical and Mechanical Properties of a Living Cell with Defocusing Microscopy *Biophysics Journal* **91**, 1101
- [35] **Camilla Karla Q.B.O. Martins** 2008 Aplicação de Técnicas Ópticas em amostras biológicas *Dissertação de Mestrado DF, UFMG*
- [36] **Giuseppe Glionna** 2009 Tomografia de Hemácias *Tese de Doutorado DF, UFMG*
- [37] **Ulisses Moreira** 2010 Microscopia de Desfocalização e seus limites de validade: um estudo experimental *Dissertação de Mestrado DF, UFMG*
- [38] **L. Siman et al.** 2014 Shape reconstruction and height fluctuation of phase objects using Defocusing Microscopy: an application to red blood cells *submitted to publication*
- [39] **D. Bray** Cell Movements: From Molecules to Motility 2001 *Garland Publishing, New York*, 2nd ed.
- [40] **Y. Yawata** The red blood cells as a Model 2003 *WILEY-VCH*.
- [41] **Y. C. Fung** Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues 1993 *Spring-Verlag, New York*
- [42] **M. Bessis** 1972 An illustrated classification and its rationale *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **122**, 721
- [43] **G. Gompper and M. Schick** Soft Matter: Volume 4: Lipid Bilayers and Red Blood Cells 2008 *WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA*
- [44] **K. Tachev et al.** 2004 On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **34**, 123-140
- [45] **E. A. Price and S. L. Schrier** 2008 Hemoglobinopathies and hemolytic anemias *ACP Medicine*. 1-34.
-

-
- [46] **Gerald Karp** *Biologia celular e molecular* 2005 *Editora Manole Ltda*
- [47] **P. Murador and E. Deffune** 2007 Aspectos estruturais da membrana eritrocitária *Rev. bras. hematol. hemoter.* **29**(2):168–178
- [48] **V. Heinrich et al.** 2001 Elastic Thickness Compressibility of the Red Cell Membrane *Biophys. J.* **81**, 1452–1463
- [49] **D. Boal** *Mechanics of the Cell* 2002 *Cambridge University Press*
- [50] **R. M Hochmuth and R. E. Waugh.** 1987 Erythrocyte membrane elasticity and viscosity. *Annu. Rev. Physiol.* **49**, 209.
- [51] **E.A. Evans and R. Skalak** *Mechanics and Thermodynamics of Biomembranes* 1980 *CRC-Press, Boca Raton, FL*
- [52] **R. Phillips, J. Kondev and J. Theriot** *Physical Biology of the Cell* 2010 *Garland Science Publishing*
- [53] **Y. Park et al.** 2010 Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes. *Proc. Nat. Ac. of Sc* **107**, 6731
- [54] **W. Rawicz et al.** 2000 Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophysical Journal* **79**, 328 -339
- [55] **D. E. Discher, N. Mohandas, E. A. Evans** 1994 Molecular maps of red cell deformation: hidden elasticity and in situ elasticity *Science* **266**, 1032-1035
- [56] **R. Waugh and E. Evans** 1979 Thermoelasticity of red blood cell membrane *Biophys. Journal* **26**, 115-132
- [57] **G. Lenormand et al.** 2001 Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton *Biophys. Journal* **81**, 43-56
- [58] **H. Deuling e W. Helfrich** 1976 Red blood cell shapes as explained on the basis of the curvature elasticity *Biophysical Journal* **16**(8):861–868
-

- [59] **M. do Carmo** Differential Geometry of Curves and Surfaces 1976 *Prentice-Hall, New Jersey*, p. 503.
- [60] **S. Tuvia et al.** 1998 Mechanical fluctuations of the membrane-skeleton are dependent on F- Actin ATPase in human erythrocytes. *J Cell Biol* **141**, 1551-1561
- [61] **E. A. Evans et al.** 2008 Fluctuations of the red blood cell membrane: Relation to mechanical properties and lack of ATP dependence *Biophysical Journal* **94**, 4134-4144
- [62] **Y. D. Szekely and P. Kuchel** 2009 Human erythrocyte flickering: temperature, ATP concentration, water transport, and cell aging, plus a computer simulation *European Biophysical Journal* **38**, 923-939
- [63] **C. A. Schneider, W. S. Rasband and K. W. Eliceiri** 2012 NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis *Nature Methods* **9**:671-675
- [64] <http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id>
- [65] **M. R. Teague** 1983 Deterministic phase retrieval: a Green's function solution *J. Opt. Soc. Am.* **73**, 1434
- [66] **T. E. Gureyev and K. A. Nugent** 1997 Rapid quantitative phase imaging using the transport intensity equation. *Opt. Commun.* **133**, 339-346
- [67] **D. Paganin and K. A. Nugent** 1998 Noninterferometric Phase Imaging with Partially Coherent Light. *Phys. Rev. Lett.* **80**, 2586-2589
- [68] **E. D Barone-Nugent, A. Barty, K. A. Nugent** 2002 Quantitative phase-amplitude microscopy I: optical microscopy *J. Microsc.* **206**, 194-206
- [69] **M. Born and E. Wolf** Principles of Optics 1999 *Cambridge University Press New York*
- [70] **J. W. Goodman** Introduction Fourier Optics 2002 *McGraw-Hill Companies Press*
-

-
- [71] **J. R. Koza** Genetic programming 1998 *The MIT Press, Cambridge*
- [72] **G. Mazarevica, T. Freivalds and A. Jurka** 2002 Properties of erythrocyte light refraction in diabetic patients *J. Biomed. Opt.* **7**, 244-247.
- [73] **A. L. Yusipovich et al.** 2009 Laser interference microscopy in erythrocyte study *J. Appl. Phys.* **105**, 102037.
- [74] **E. Evans and Y.C.Fung** 1972 Improved Measurements of the Erythrocyte Geometry *Microvascular Research* **4**, 335-347
- [75] **P. B. Canham and A. C. Burton** 1968 Distribution of Size and Shape in Populations of Normal Human Red Cells *Circulation Research* **22**, 405
- [76] **P. B. Canham** 1970 The Minimum Energy of Bending as a Possible Explanation of the Biconcave Shape of the Human Red Blood Cell *J. Theor. Biol.* **26**, 61
- [77] **B. Rappaz et al.** 2009 Spatial Analysis of Erythrocytes Membrane Fluctuation by Digital Holographic Microscopy *Blood Cells, Mol. and Dis.* doi:10.10016.
- [78] **E. A. Evans** 1974 Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayer *Biophys J* **14**, 923-931
- [79] **K. Svoboda and S. M. Block** 1994 Biological applications of optical forces *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 247 -285
- [80] **T. Fischer** 1988 Role of spectrin in cross bonding of red cell membrane *Blood Cells* **13**, 377-394
- [81] **Y. Fung and P. Tong** 1968 Theory of sphering of red blood cells *Biophys. J.* **18**, 175-198
- [82] **O. Farago** 2011 Mechanical surface tension governs membrane thermal fluctuations *Phys. Rev. E* **84**, 051914
-

-
- [83] **D. Gingell et al.** 1987 Direct measurements of cell detachment force on single cells using a new electromechanical method *Journal of Cell Science* **87**, 519-523
- [84] **T. Loftsson, D. Duchêne** 2007 Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* **329**, 1–11
- [85] **E. Albers, B.W. Muller** 1992 Complexation of steroid hormones with cyclodextrin derivatives: substituent effects of the guest molecule on solubility and stability in aqueous solution *J. Pharm. Sci.* **81**: 756-761
- [86] **T. Loftsson, M.E. Brewster** 1996 Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilisation *J. Pharm. Sci.* **85**, 1017-1025
- [87] **R. Zidovetzki and I. Levitan.** 2007 Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies *Biochimica et Biophysica Acta* **1768**,1311-1324
- [88] **J.D. Jackson** 1998 Classical Eletrodynamics *John Wiley & Sons, Inc.*
-