
Motilidade do Citoesqueleto de Macrófagos e sua
Relação com o Processo de Fagocitose Estudados
Através de Microscopia de Desfocalização

José Coelho Neto

Motilidade do Citoesqueleto de
Macrófagos e sua Relação com o
Processo de Fagocitose Estudados
Através de Microscopia de
Desfocalização

José Coelho Neto

Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

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

Belo Horizonte
Março de 2005

*Dedicado aos meus pais,
José Coelho e Maria Antônia,
à minha esposa, amiga, sócia, cúmplice e amante, Juliana,
e ao meu mais novo amor, Jéssica Freitas Coelho.*

Sumário

Agradecimentos	viii
Resumo	x
Abstract	xi
1 Introdução	1
1.1 Motivação	1
1.2 Descrição do Trabalho	3
2 Macrófagos & Citoesqueleto	4
2.1 Macrófagos	4
2.2 O Citoesqueleto Celular	6
2.2.1 Filamentos Intermediários	8
2.2.2 Microtúbulos	10
2.2.3 Filamentos de Actina	12
3 Estrutura e Dinâmica do Citoesqueleto de Actina	15
3.1 Organização dos Filamentos de Actina no Córtex Celular	15
3.2 Dinâmica de Formação e Degradação de Filamentos de Actina no Córtex Celular	16
3.3 Motilidade Celular Baseada na Polimerização de Actina	19
3.3.1 A Catraca Browniana	20
3.3.2 A Catraca Browniana Elástica	23
3.3.3 A Catraca Browniana Elástica com Filamentos Aderidos	26

4	Metodologia Experimental e de Análise de Dados	28
4.1	Preparação de Amostras	28
4.1.1	Macrófagos	28
4.1.2	Parasitas	29
4.2	Técnicas Experimentais	29
4.2.1	Microscopia de Desfocalização	29
4.2.2	Pinça Óptica	31
4.2.3	Montagem Experimental	32
4.2.4	Procedimentos Básicos de Medida	35
4.3	Experimentos Realizados	37
4.4	Métodos de Análise de Dados	38
4.4.1	Autocorrelação Temporal e Espacial da Curvatura	39
4.4.2	Distribuição da Curvatura	40
4.4.3	Comprimento, Frequência de Ocorrência e Perfil de Curvatura de Ruffles	41
4.4.4	Tempo de Fagocitose	41
4.4.5	Curvatura Quadrática Média em Torno de Uma Região	42
5	Resultados Obtidos	43
5.1	Caracterização das Flutuações de Curvatura a $37^{\circ}C$	43
5.1.1	Flutuações Aleatórias de Curvatura (FAC)	43
5.1.2	Ruffles	46
5.1.3	Proporção entre FAC e ruffles	50
5.2	Efeito de Fármacos e Tratamentos Diversos Sobre as Flutuações de Curvatura a $37^{\circ}C$	52
5.3	Efeito de Mudanças na Temperatura Sobre as Flutuações de Curvatura	55
5.4	Comportamento das Flutuações de Curvatura Durante Eventos de Fagocitose a $37^{\circ}C$	59
5.5	Efeito de Mudanças na Temperatura Sobre o Processo de Fagocitose	63
6	Discussão dos Resultados Obtidos	66
6.1	Sobre as características de FAC e ruffles a $37^{\circ}C$	66

6.2	Fármacos e tratamentos diversos	70
6.3	Relação entre ruffles e o processo de fagocitose	70
6.4	A influência da temperatura e a origem comum de FAC, ruffles e do processo de fagocitose	72
7	Conclusão	74
A	Projeto Inicial: “Medida Dinâmica Do Comprimento de Per- sistência de Uma Molécula de DNA”	76
B	Protocolos de Extração e Cultivo de Células e Composição dos Meios de Cultura Celular	79
B.1	Extração de Células Tronco e Cultura Primária de Macrófagos	79
B.2	Composição do Meio de Cultura Padrão	80
B.3	Composição do Meio de Cultura para Macrófagos	81
B.4	Obtenção do Fator de Crescimento (M-CSF) para Macrófagos	81
C	Calibração do Sistema de Vídeomicroscopia	82
D	Artigos Publicados	84
	Revista <i>Physica A</i>	85
	Revista <i>Experimental Cell Research</i>	97
	Lista de Figuras	108
	Lista de Tabelas	110
	Referências Bibliográficas	111

Agradecimentos

Nestes pouco mais de 22 anos passados como estudante, do primeiro dia no jardim de infância até o término do doutorado, muita coisa mudou (como, aliás, não poderia deixar de ser). Ainda assim, mesmo considerando o universo de todas as escolhas feitas ao longo de todos estes anos, um fator foi sempre constante: a presença de caminhos bem definidos à frente de cada escolha possível. Ao chegar ao fim do que pode ser considerado “o caminho final”, na medida em que representa o maior grau de estudo possível nos moldes “professor-aluno”, gostaria de agradecer:

Aos meus pais, principais incentivadores e patrocinadores de todos os caminhos que percorri, do jardim de infância até aqui;

À Juliana, pela paciência, compreensão, colaboração e suporte em todas as horas;

À Jéssica, por estar a toda hora me lembrando, ainda que inconscientemente, que tudo começa (e recomeça) ao aprendermos as coisas mais simples;

A todos os professores que tive ao longo destes anos, por toda a contribuição que deram para a construção de minha formação acadêmica, em todos os níveis do ensino;

Ao Oscar, não somente pela orientação, mas também por toda a experiência, maturidade e segurança transmitidas;

Aos companheiros de laboratório, principalmente Aline, Bira, Nathan e Márcio, por todas as produtivas discussões, palpites e conselhos, sem deixar de lado a conversa fiada;

Ao professor Ricardo Gazzinelli e todo o pessoal do laboratório de imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, principalmente Eneida, Bráulia, Oscar Romero e Diogo, pela paciência ao transmitir a um físico um pouco da experiência necessária para trabalhar na área

biológica;

A todos os amigos, professores, funcionários e alunos do DF, por propiciarem um ambiente agradável de trabalho e sempre estarem dispostos a ajudar;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento dos laboratórios onde este trabalho foi desenvolvido, juntamente com a FAPEMIG, FINEP e o Instituto do Milênio de Nanociências;

... pois o fim do caminho não significa o fim da jornada.

Resumo

Neste trabalho aplicamos a técnica de microscopia de desfocalização, recentemente desenvolvida em nosso laboratório, ao estudo quantitativo *in vivo* das características morfológicas e dinâmicas das estruturas formadas na superfície da membrana plasmática de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos. Dois tipos distintos de flutuações de formato da membrana foram detectadas e estudadas: pequenas flutuações aleatórias, presentes, de maneira uniforme, sobre toda a superfície da célula, em todos os instantes, e grandes estruturas localizadas, conhecidas como *ruffles*, que se propagam sobre a membrana. A partir dos dados obtidos destas flutuações pudemos determinar o módulo de curvatura da membrana e a viscosidade do citoplasma dos macrófagos. O efeito de vários fármacos e tratamentos sobre o comportamento das estruturas estudadas também foi avaliado. Através do uso combinado das técnicas de microscopia de desfocalização e pinçamento óptico, pudemos estudar o comportamento da membrana durante a fagocitose de parasitas (*Leishmania amazonensis*). A análise das mudanças observadas na quantidade de *ruffles* presente em regiões da membrana periféricas aos fagossomos em formação indicou que estas estruturas podem estar associadas à aceleração do processo de fagocitose. A investigação dos efeitos da redução da temperatura sobre as flutuações observadas e a fagocitose de parasitas resultou em dados que demonstram como estes fenômenos compartilham a mesma origem comum, diretamente relacionada à dinâmica do citoesqueleto celular.

Abstract

Defocusing microscopy, a novel, recently developed, approach on quantitative analysis of bright field optical microscopy images, was used for real-time *in vivo* observation and quantification of both morphological and dynamical characteristics of the structures formed on the membrane surface of murine bone marrow macrophages. Two distinct types of membrane shape fluctuations were detected and studied: small, random fluctuations, uniformly distributed over all membrane surface at any time, and large, localized, propagating structures, commonly referred as membrane *ruffles*. Data collected from these fluctuations allowed determination of membrane bending modulus and cytoplasm viscosity of the macrophages. The effects of several drugs and treatments on the behavior of the structures studied were also investigated. The combined use of defocusing microscopy and optical tweezers allowed membrane surface dynamics to be followed closely during phagocytosis of parasites (*Leishmania amazonensis*). Analysis of the changes in ruffling activity in a large area of membrane around the forming phagosomes indicated that ruffles may be related to the acceleration of the engulfment of the parasites. Investigation of temperature decrease effects on the fluctuations observed and on the phagocytosis of the parasites provided evidence of how these phenomena share the same basic origin, directly related to cytoskeleton dynamics.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação

Para compor um organismo complexo como um ser humano são necessárias da ordem de centenas de trilhões de células. Embora, para um mesmo indivíduo, todas elas sejam geneticamente idênticas (considerando-se os gametas à parte), a evolução ao longo de pouco mais de 3,5 bilhões de anos levou a um grau tão elevado de diferenciação e especialização que, dentre os muitos tipos celulares encontrados no corpo humano, podemos encontrar células tão distintas em termos de forma e funções, tais como um neurônio e um eritrócito, que dificilmente acreditaríamos que, retrocedendo apenas uns poucos anos ou meses até nossa fase embrionária, veríamos estes dois tipos celulares se originando de um único tipo celular comum: as células tronco.

A evolução, entretanto, talvez por um capricho da natureza, encontrou formas de preservar, mesmo nos organismos mais complexos, alguns tipos celulares cuja forma e comportamento ainda podem facilmente nos remeter à época das primeiras células eucariotas, quando o desenvolvimento da capacidade de auto-locomção e de predação de outras células certamente foi um fator importante na sobrevivência dos organismos unicelulares.

Parte importante do sistema imunológico dos vertebrados de hoje, o macrófago, ou “grande devorador”, é uma célula que ainda apresenta estas mesmas características primitivas de mobilidade e captura de outras células, mas que, no entanto, se especializou em exercer funções importantes para a manu-

tenção destes organismos como um todo, tais como ajudar na defesa contra a invasão por agentes infecciosos externos e promover a eliminação da enorme quantidade de células que morrem normalmente todos os dias, entre outras funções correlatas.



"A giant killer macrophage ? Doctor, this is madness !"

Figura 1.1: Apesar de serem tidos por muitos apenas como monstruosas máquinas de fagocitar voltadas para a interceptação e assassinato de organismos invasores, razão pela qual seria loucura torná-los tão grandes quanto sugerido neste *cartoon*[†], uma das funções mais importantes desempenhadas pelos macrófagos consiste em eliminar, por fagocitose, a enorme quantidade de células que morrem naturalmente todos os dias em nosso corpo, impedindo assim que nos tornemos verdadeiros depósitos de matéria orgânica morta. Se realmente eles pudessem ser tão grandes, talvez fossem ótimos lixeiros...

Fundamentada na oportunidade de poder estudar o comportamento *in vivo* de uma célula de tal importância para todos os organismos vertebrados, nossa motivação na realização deste trabalho é ainda reforçada pela nossa capacidade experimental de acompanhar a evolução individual de cada célula em tempo real, bem como pela capacidade de observar, sob as mesmas condições, os macrófagos desempenharem sua função principal: a fagocitose.

[†]Publicado na revista *The Scientist* 12 (6), p. 2 (1998).

1.2 Descrição do Trabalho

O trabalho realizado consiste na observação e caracterização quantitativa do comportamento de macrófagos enquanto aderidos à superfície de vidro das amostras e também durante a fagocitose de agentes externos, introduzidos durante os experimentos. A visualização e quantificação da atividade dos macrófagos é feita através do uso da técnica de microscopia de desfocalização, que permite a visualização direta das deformações presentes em sua membrana durante sua movimentação, mesmo esta sendo um objeto transparente quando observada ao microscópio óptico convencional. A fagocitose dos agentes externos introduzidos nas amostras é controlada com o auxílio de uma pinça óptica acoplada à montagem experimental.

O texto se encontra organizado na seguinte ordem:

No Capítulo 2 são apresentadas, resumidamente, a origem e funções dos macrófagos no organismo dos vertebrados e a composição e organização de seu citoesqueleto, principal estrutura responsável por sua mobilidade.

No Capítulo 3 apresentamos, de maneira mais detalhada, a estrutura e a dinâmica da porção do citoesqueleto diretamente ligada à membrana do macrófago: a rede de filamentos de actina. Neste capítulo também apresentamos um resumo dos principais modelos utilizados para explicar como a dinâmica de polimerização/despolimerização de actina pode gerar força mecânica suficiente para movimentar a célula.

Os detalhes referentes à preparação das amostras, técnicas experimentais utilizadas, tipos de experimento realizados e métodos de análise de dados empregados durante o trabalho são dados no Capítulo 4.

Os resultados de todos os experimentos realizados serão dados no Capítulo 5 e analisados e discutidos no Capítulo 6.

Um resumo dos resultados e as conclusões obtidas será dado no Capítulo 7.

Nos apêndices serão apresentados comentários sobre nosso projeto anterior, onde trabalhamos com moléculas de DNA, detalhes sobre os procedimentos de extração e cultura das células utilizadas nos experimentos, o procedimento de calibração do sistema de vídeomicroscopia e o texto dos artigos publicados durante a realização deste trabalho.

Capítulo 2

Macrófagos & Citoesqueleto

2.1 Macrófagos*

Macrófagos são células do sistema imune inato dos vertebrados cuja função primária é a de *fagocitar*[†] organismos invasores, partículas estranhas e também células doentes ou mortas do próprio organismo (*Figura 2.1*).

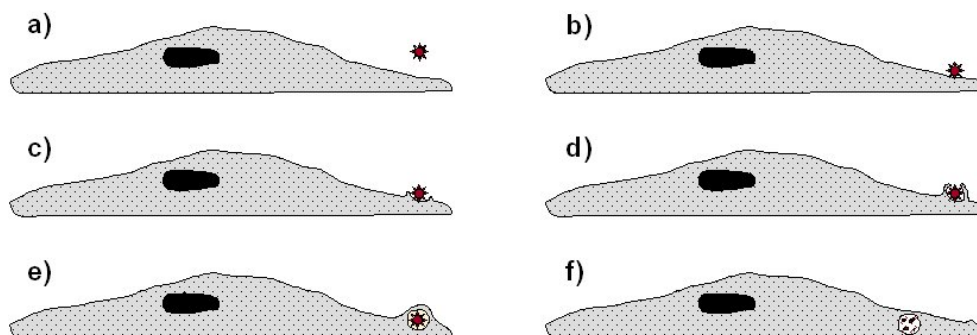


Figura 2.1: O processo de fagocitose: uma partícula estranha se aproxima de um macrófago (a) e adere à superfície de sua membrana (b). A membrana do macrófago se projeta sobre a partícula (c-d), encobrindo-a completamente (e). Uma vez isolada do meio externo, a partícula invasora é digerida pela ação de substâncias produzidas pelo macrófago (f).

Como todas as células do sistema imunológico, os macrófagos se originam

*Esta seção foi livremente baseada nas informações presentes em [1–5].

[†]Internalizar, através do envolvimento completo pela membrana plasmática, com o propósito de digerir, objetos com dimensões lineares superiores a $0,5 \mu\text{m}$ [5].

na medula óssea a partir de uma *célula tronco hematopoiética pluripotente* auto-renovável, da qual também se originam outros componentes sanguíneos, como eritrócitos e plaquetas. Quando deixam a medula óssea para entrarem na corrente sanguínea, o processo de diferenciação dos macrófagos ainda não está completo e eles recebem o nome de monócitos. Ao deixarem a corrente sanguínea para se instalarem nos tecidos, os monócitos completam seu processo de diferenciação, tornando-se macrófagos (*Figura 2.2*). Presentes em todos os órgãos e tecidos conjuntivos, em alguns casos os macrófagos recebem nomes especiais, identificando o local específico onde se instalaram. No sistema nervoso central (SNC), são chamados de células microgliais; nos pulmões, macrófagos alveolares; no fígado, células de Kupffer; nos ossos, osteoclastos.

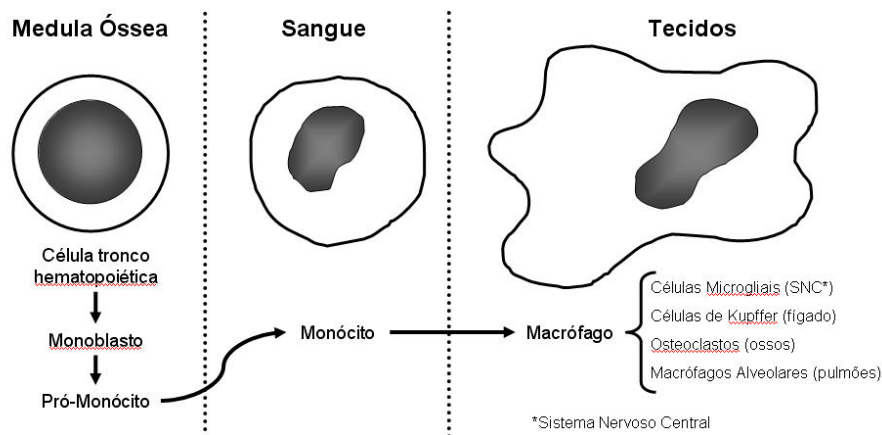


Figura 2.2: Maturação dos macrófagos.

Embora sua função primária seja a fagocitose, os macrófagos também desempenham outras funções tanto no sistema imune inato quanto no sistema imune adaptativo. Como parte de sua atuação no sistema imune inato, macrófagos secretam diversos tipos de substâncias que servem para matar micróbios e ajudar no controle de infecções, recrutar outras células de defesa, como os neutrófilos, e mesmo ajudar no reparo de tecidos danificados. No sistema imune adaptativo, os macrófagos atuam como agentes de apresentação e eliminação de antígenos, além de estimularem a atuação de linfócitos T em locais de infecção e inflamação. Ainda atuando no sistema imune adaptativo, os macrófagos são capazes de produzir proteínas que estimulam a prolifera-

ção e a diferenciação de linfócitos T. Em contrapartida, a interação entre os macrófagos e outros componentes do sistema imune inato e adaptativo faz com que os macrófagos desempenhem sua função primária de maneira mais eficiente.

Da mesma forma que todas as células eucariotas, os macrófagos são capazes de adotar uma variedade de formas e se movimentar de maneira coordenada e direcionada. Tais habilidades, essenciais para o processo de fagocitose, são possíveis graças a uma extensa rede de filamentos protéicos que permeia todo o citoplasma da célula: o *citoesqueleto celular*.

2.2 O Citoesqueleto Celular*

Presente apenas nas células eucariotas, o citoesqueleto celular é uma estrutura formada por diversos tipos de filamentos protéicos que se estendem por todo o citoplasma da célula (*Figura 2.3*) e que desempenham funções importantes, tais como manter sua integridade estrutural e organizar e controlar seus movimentos internos e externos.

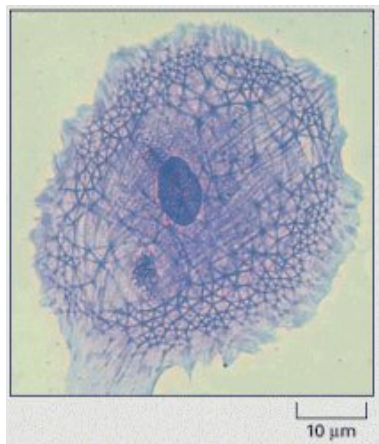


Figura 2.3: O citoesqueleto: usando um corante genérico para proteínas, podemos visualizar a extensa rede de estruturas filamentosas que se estende por toda a célula. (foto extraída de [6])

O citoesqueleto é composto basicamente por três tipos de filamentos protéicos: os *filamentos de actina* (também conhecidos como *microfilamentos*), os *microtúbulos* e os *filamentos intermediários*. Cada tipo de filamento é

*Esta seção foi livremente baseada nas informações presentes em [6], salvo referências específicas, indicadas no texto.

formado por um ou mais tipos de proteína específicos: *actina* para os filamentos de actina, *tubulina* para os microtúbulos e um conjunto de proteínas fibrosas* para os filamentos intermediários. Embora cada um destes três tipos de proteína possua dimensões lineares da ordem de alguns nanômetros apenas, sua capacidade de polimerização permite que elas formem filamentos longos que podem atingir comprimentos da ordem de micrômetros, podendo se estender de uma extremidade à outra da célula.

Ao contrário do que se poderia imaginar pela nomenclatura, o citoesqueleto é uma estrutura dinâmica que se mantém em constante estado de reorganização, permitindo à célula eucariota promover e manter a ordem interna necessária ao seu delicado equilíbrio ao mesmo tempo em que muda de forma, se locomove ou mesmo se divide.

Cada uma das funções do citoesqueleto é desempenhada por um tipo de filamento: os filamentos intermediários são os responsáveis por dar resistência mecânica à célula; os microtúbulos organizam a movimentação interna de diversos componentes celulares; os filamentos de actina controlam a movimentação da membrana celular, conseqüentemente desempenhando um papel essencial na movimentação da célula como um todo e também em processos como a fagocitose.

Para desempenhar cada uma destas funções, cada tipo de filamento possui uma organização diferente dentro do citoplasma (*Figura 2.4*).

Filamento	Proteína	Diâmetro	Função
filamentos intermediários	várias*	10 nm	dar rigidez mecânica e estrutural
microtúbulos	α - e β -tubulina	25 nm	promover e manter a organização interna
filamentos de actina	actina-g	8 nm	controlar a forma e o movimento da membrana

Tabela 2.1: Características dos filamentos do citoesqueleto.

* *Queratinas, vimentinas e laminas*, entre outras.

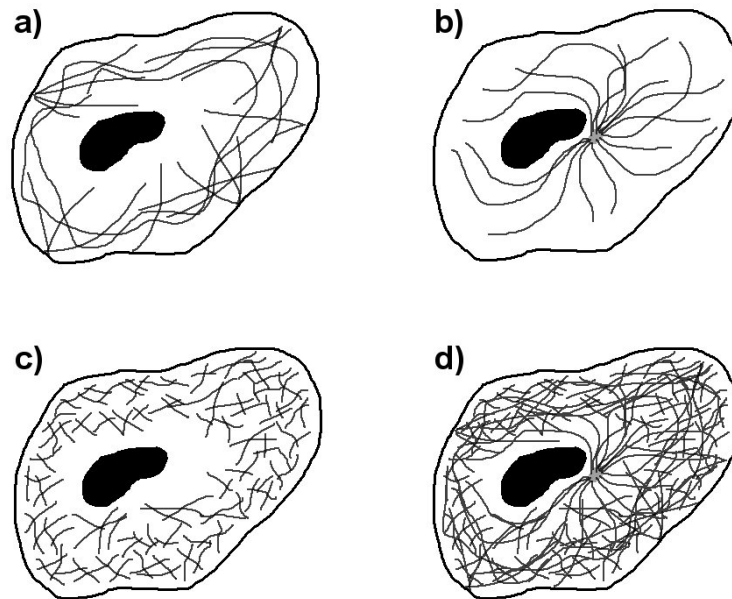


Figura 2.4: Organização do citoesqueleto: a) filamentos intermediários. b) microtúbulos. c) filamentos de actina. d) superposição dos painéis a, b e c (veja a *Figura 2.3*).

As características principais de cada um dos tipos de filamento que formam o citoesqueleto, tais como estrutura, dimensão e organização, assim como sua relação com a função desempenhada serão tratadas resumidamente a seguir.

2.2.1 Filamentos Intermediários

Classificados como “intermediários” devido ao fato de seu diâmetro médio, em torno de 10 nm , estar na faixa intermediária entre os diâmetros dos filamentos de actina e os microtúbulos, os filamentos intermediários são formados por proteínas fibrosas que se caracterizam por uma estrutura molecular bastante alongada, onde os terminais *amino* e *carboxil*, mantidos em posições diametralmente opostas, são conectados através de um longo domínio central, formado por uma α -hélice (*Figura 2.5a*) contendo repetições de uma sequência de aminoácidos específica, responsável por promover a formação de dímeros através do entrelaçamento, em paralelo, da α -hélice de cada monô-

mero (Figura 2.5b). Ao se emparelharem antiparalelamente, dois dímeros formarão um tetrâmero (Figura 2.5c). A associação entre tetrâmeros (Figura 2.5d) formará, finalmente, um filamento intermediário (Figura 2.5e). A organização antiparalela dos dímeros faz com que cada tetrâmero, e, conseqüentemente, cada filamento intermediário, possua extremidades idênticas, sendo, portanto, apolar.

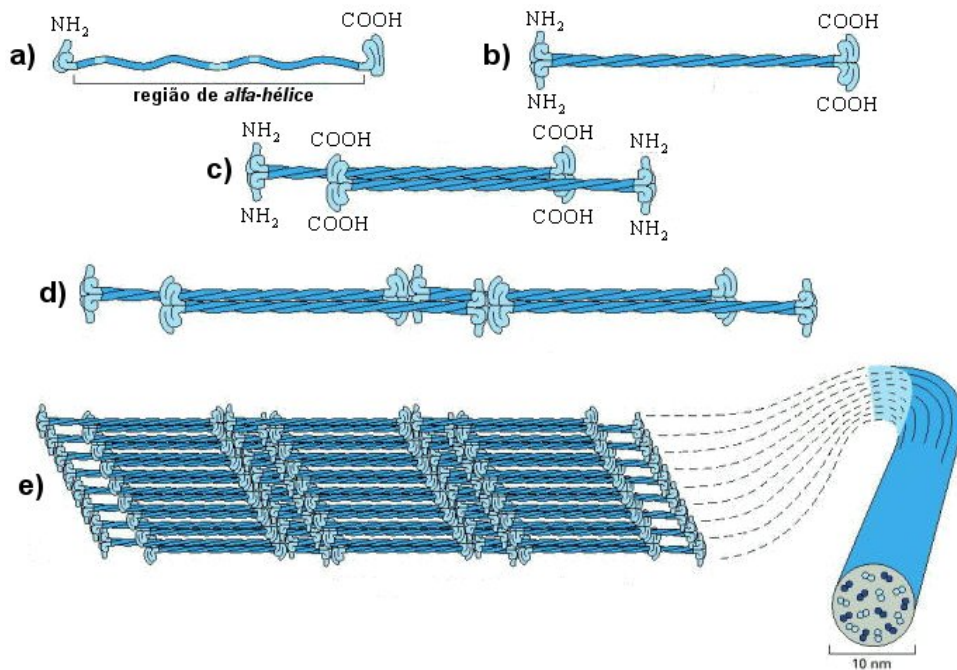


Figura 2.5: Estrutura dos filamentos intermediários: a) estrutura genérica de um monômero. Apenas o tamanho e a seqüência de aminoácidos nos terminais *amino* e *carboxil* variam significativamente para cada tipo de proteína que forma filamentos intermediários. b) o entrelaçamento paralelo da α -hélice de dois monômeros forma um dímero. c) o emparelhamento antiparalelo de dois dímeros forma um tetrâmero, cuja simetria confere ao filamento intermediário seu caráter apolar. d) dois tetrâmeros agrupados. e) o agrupamento de diversos tetrâmeros forma, finalmente, um filamento intermediário. (diagrama extraído de [6], com modificações)

Os filamentos intermediários constituem a porção mais durável do citoesqueleto, e, apesar de serem facilmente deformáveis, são capazes de resistir a grande tensão e esforço sem se romper, o que não acontece com os filamentos de actina e microtúbulos. Devido à sua resistência e durabilidade e por serem encontrados em maior número em células normalmente sujeitas a

grande esforço mecânico, tais como epitélios e células musculares, atribui-se aos filamentos intermediários a função de manter a rigidez mecânica da célula. A estabilidade dos filamentos intermediários é tal que, mesmo quando a célula é tratada com soluções salinas concentradas e detergentes não-iônicos, removendo a grande maioria de suas proteínas, a rede de filamentos intermediários permanece. De fato, o termo “citoesqueleto” foi originalmente usado para designar esta estrutura de filamentos, de resistência e estabilidade não usuais.

2.2.2 Microtúbulos

Os microtúbulos são estruturas cilíndricas, aparentemente ocas, formadas por moléculas de tubulina organizadas em cadeias paralelas, formando um tubo com diâmetro externo de aproximadamente 25 nm . A molécula de tubulina é um heterodímero formado por duas proteínas globulares fortemente relacionadas, tanto em estrutura quanto em ligação, denominadas α -tubulina e β -tubulina (*Figura 2.6a*). Assim sendo, a estrutura dos microtúbulos também pode ser descrita, de maneira um pouco mais precisa, como sendo formada pelo conjunto de 13 *protofilamentos* (*Figura 2.6b*), que são cadeias alternadas de α - and β -tubulina, organizados em paralelo para formar um cilindro (*Figura 2.6c*).

Ao contrário dos filamentos intermediários, os microtúbulos possuem extremidades distintas, sendo, portanto, estruturas polares. As duas extremidades de um microtúbulo possuem taxas de crescimento diferentes. A extremidade que cresce mais rapidamente é denominada *positiva* (*plus end*), enquanto a extremidade com crescimento mais lento é denominada *negativa* (*minus end*).

Dentro do citoplasma das células, os microtúbulos se encontram organizados de modo a formar um padrão radial, onde suas extremidades negativas tendem a se concentrar na região central da célula, enquanto suas extremidades positivas se concentram próximas às bordas. Geralmente as extremidades negativas dos microtúbulos se encontram inseridas em um *centro organizador de microtúbulos* (COM), próximo à região central da célula. Tal estrutura promove a nucleação constante de novos microtúbulos, que irão estender suas

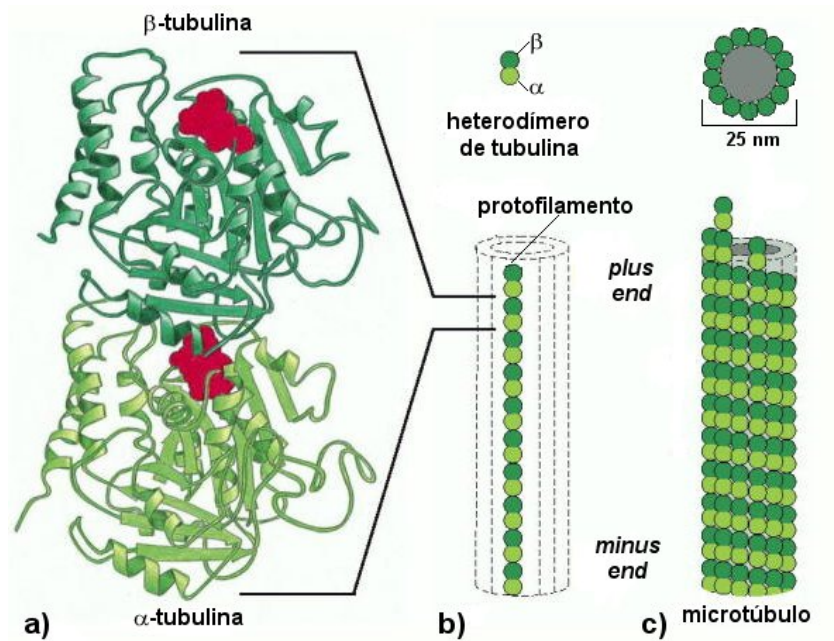


Figura 2.6: Estrutura dos microtúbulos: a) estrutura da α -tubulina e da β -tubulina em um heterodímero. b) diversos heterodímeros de tubulina alinhados formam um protofilamento. c) um feixe de 13 protofilamentos, agrupados em torno de um núcleo vazio, formam um microtúbulo. (diagrama extraído de [6], com modificações)

extremidades positivas até as bordas da célula. De fato, uma característica importante dos microtúbulos, e que também contrasta com os filamentos intermediários, é o seu caráter *lábil*, isto é, sua capacidade de auto-degradação e auto-renovação constantes, o que permite que sua distribuição pelo citoplasma da célula seja um processo dinâmico.

O caráter dinâmico, ou até mesmo instável, dos microtúbulos pode ser alterado através da interação com outras proteínas existentes no citoplasma da célula. A ação de tais proteínas, referidas genericamente como *proteínas associadas a microtúbulos* (PAMs) podem servir tanto para promover a estabilização dos microtúbulos quanto também para mediar sua interação com diversos outros tipos de componentes celulares. Um dos tipos mais importantes de PAMs são as *cinesinas* e as *dineínas citoplasmáticas*, que constituem duas classes de proteínas motoras que dependem da interação com a rede de microtúbulos. Tanto as cinesinas quanto as dineínas utilizam a energia de hidrólise de moléculas de ATP para se moverem unidirecionalmente ao longo

dos microtúbulos, transportando diversos tipos de carga, tais como organelas celulares. As cinesinas se movem sempre em direção à extremidade positiva dos microtúbulos, enquanto as dineínas se movem em direção à extremidade negativa. Desta forma, a rede de microtúbulos funciona como um sistema de circulação interna da célula, através do qual diversos componentes celulares são deslocados da região central da célula para sua periferia e vice-versa, promovendo e mantendo sua organização interna.

2.2.3 Filamentos de Actina

Os filamentos de actina são formados por duas cadeias poliméricas de actina globular (actina-g) entrelaçadas, formando uma hélice compacta e flexível, de diâmetro médio em torno de 8 nm (Figura 2.7). Assim como os microtúbulos, os filamentos de actina são estruturas lábeis e polares, sendo a taxa de crescimento de sua extremidade positiva (*barbed end*) muitas vezes superior à de sua extremidade negativa (*pointed end*).

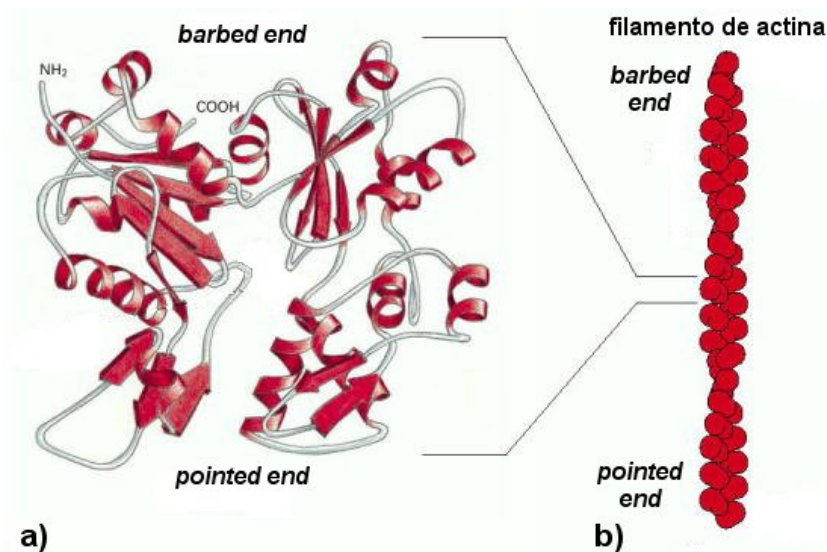


Figura 2.7: Estrutura dos filamentos de actina: a) estrutura da actina globular (actina-g). b) O entrelaçamento helicoidal de duas cadeias lineares de actina globular formam um filamento de actina. (diagrama extraído de [6], com modificações)

Apesar das semelhanças entre os processos de polimerização e despolimerização da tubulina e da actina, ao contrário dos microtúbulos, os filamentos

de actina organizam-se em feixes e redes entrelaçadas, que se localizam, em boa parte, logo abaixo da membrana plasmática. Os feixes e redes formados por estes filamentos, atuando juntamente com diversos tipos de proteínas que se ligam aos filamentos de actina e à membrana plasmática, entre elas as *miosinas* (classe importante de proteínas motoras), forma o *córtex celular*. A constante reorganização das redes e filamentos de actina do córtex celular controla o movimento de toda a superfície da célula. Desta forma, ao estudarmos a motilidade do citoesqueleto a partir de um ponto de vista externo à célula, estamos, de fato, estudando principalmente a motilidade causada pela dinâmica dos filamentos de actina. Por esta razão, o córtex celular também é conhecido como o *citoesqueleto de actina*.

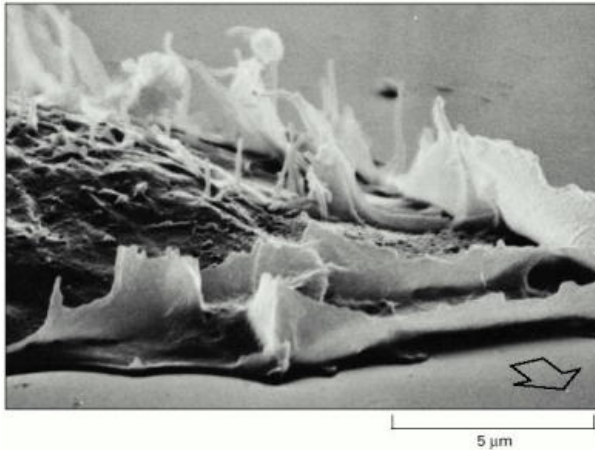


Figura 2.8: Ruffles em um fibroblasto. Esta imagem, obtida através de microscopia eletrônica de varredura, mostra um fibroblasto se locomovendo sobre uma placa de cultura. Ruffles de diversos tamanhos e formatos são formados sobre sua membrana. A seta indica a direção do movimento da célula. (foto extraída de [6])

Ao controlar a dinâmica de polimerização/despolimerização dos filamentos de actina do córtex celular, a célula pode estender sua membrana sobre o substrato em que se encontra, formando estruturas conhecidas como *lamellipódios* ou *lâminas líder*. A protrusão de lamellipódios, seguida da adesão da membrana recém-estendida ao substrato, associada ao descolamento e retração do lado oposto da célula, constituem o mecanismo básico da motilidade celular [7,8]. Quando o processo de adesão falha [9,10], a membrana recém-estendida recede, dando origem a uma perturbação local no formato da superfície da membrana e que se move em direção à região central da célula. Estas perturbações, conhecidas genericamente como *ruffles* (*Figura 2.8*), também são formadas na região dorsal da membrana, longe das bordas da célula, possivelmente como resultado da intensificação local da polimerização de actina

no córtex celular. A presença deste tipo de estrutura é frequentemente associada a processos celulares importantes, tais como a *macropinocitose** e a fagocitose [2,11–14]. Assim sendo, a rede de filamentos de actina que forma o córtex celular é capaz de dar origem a estruturas essenciais à locomoção da célula e ao desempenho de funções como a fagocitose.

Apesar da polimerização de actina no córtex celular ser atualmente bem aceita como causa principal da movimentação e das deformações da membrana plasmática, o mecanismo exato através do qual estruturas como lamelipódios e ruffles são criadas e desfeitas ainda é desconhecido.

*Captura grandes quantidades de meio extra-celular que ocorre de maneira similar à fagocitose de partículas/objetos sólidos.

Capítulo 3

Estrutura e Dinâmica do Citoesqueleto de Actina

3.1 Organização dos Filamentos de Actina no CórTEX Celular

Mesmo parecendo desorganizada ao primeiro exame, a rede de filamentos de actina sob a membrana celular em lamellipódios, que exemplifica a estrutura do córtex celular, possui um alto grau de organização (*figura 3.1*). Sua estrutura básica é constituída de cadeias paralelas de filamentos que se cruzam quase ortogonalmente, formando grades bidimensionais que se superpõem umas às outras e cujo ângulo de contato com a membrana fica entre 45° e 55° [15–18]. A orientação dos filamentos em relação à posição de suas extremidades positiva (crescimento rápido) e negativa (crescimento lento) também apresenta um alto grau de organização. Na região mais próxima da borda da célula, onde a rede de filamentos faz contato com a membrana, quase 80% dos filamentos apresentam suas extremidades positivas apontadas para a membrana, enquanto cerca de 20% estão orientados quase paralelamente a ela. Apenas uma fração mínima de filamentos apresentam sua extremidade negativa direcionada para a membrana. Esta proporção se mantém mesmo quando nos afastamos da membrana, indo em direção à região central da célula [16]. O predomínio de extremidades positivas próximas a membrana mostra que a grande maioria dos filamentos de actina cresce em direção à

membrana. De fato, a idéia de que é a pressão exercida pelos filamentos de actina em crescimento contra a membrana o principal mecanismo gerador de movimento da superfície da célula é a base dos modelos de motilidade celular que discutiremos neste capítulo.

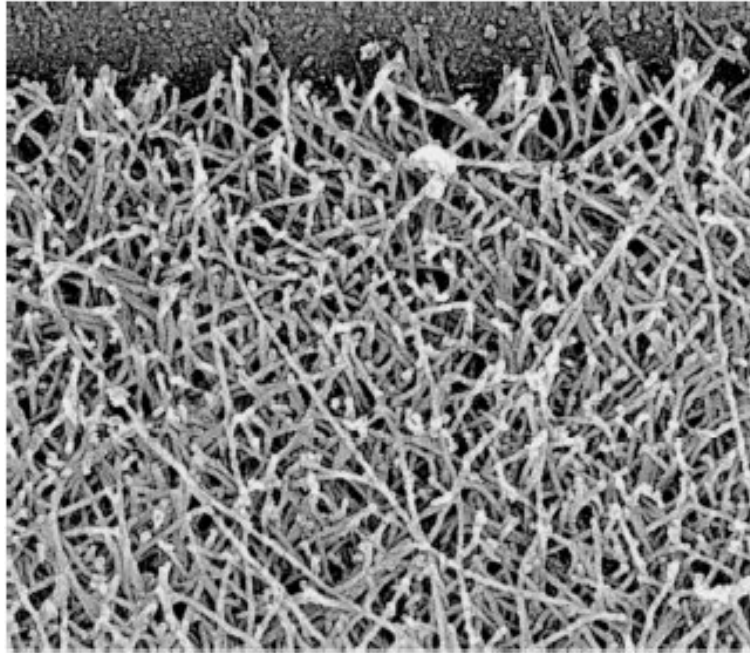


Figura 3.1: Estrutura do córtex celular em um lamelipódio de um keratócito. A remoção da membrana plasmática pela ação de detergentes permite a visualização da rede de filamentos de actina. (foto extraída de [16], com modificações)

3.2 Dinâmica de Formação e Degradação de Filamentos de Actina no Córtex Celular

Apesar de se tratar de um processo ativado, isto é, que necessita de uma fonte de energia para começar a ocorrer, a polimerização *in vivo* de actina-g em filamentos de actina pode ser resumida, em termos práticos, de maneira bastante simples: a ação de um catalizador promove a nucleação de pequenos filamentos, formados por apenas algumas moléculas, a partir do estoque de actina-g disponível no citoplasma. A partir de então cada extremidade dos

novos filamentos cresce a uma taxa t_c dada por

$$t_c = \delta (k_+ \times M - k_-), \quad (3.1)$$

onde k_+ representa a taxa de incorporação de novas moléculas de actina-g à extremidade do filamento, que depende da concentração local micromolar M de actina-g, e k_- representa a taxa de dissociação do filamento, que é independente da concentração de moléculas de actina-g. A constante δ , cujo valor é de $2,7 \text{ nm}$, representa a contribuição de cada molécula de actina-g para o comprimento do filamento, já levando-se em conta sua geometria de hélice dupla. Os valores de k_+ e k_- para as extremidades positiva e negativa dos filamentos de actina são dados na *tabela 3.1*. Com base nesses valores e

	Extremidade Positiva	Extremidade Negativa
k_+ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	11,6	1,3
k_- (s^{-1})	1,4	0,8

Tabela 3.1: Taxas de crescimento das extremidades de filamentos de actina em meio contendo 50 mM KCl , 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA , $\text{pH } 7,0$ (dados extraídos de [19]).

assumindo que a concentração local de actina-g seja da ordem de $25 \mu\text{M}$, obtemos uma taxa de crescimento da ordem de 780 nm s^{-1} para a extremidade positiva de um filamento de actina, o que equivale à adição de 280 moléculas de actina-g por segundo [19]. Entretanto, se ocorresse *in vivo* livremente com essa velocidade, o crescimento dos filamentos de actina reduziria rapidamente a concentração de actina-g para valores próximos à concentração crítica $M_c = k_-/k_+ = 0.12 \mu\text{M}$, fazendo com que o crescimento fosse interrompido. Entretanto, no decorrer de sua evolução, as células eucariotas desenvolveram mecanismos para controlar a formação e o crescimento ordenados de filamentos de actina, mantendo, ao mesmo tempo, a concentração de actina-g em seu citoplasma em níveis bem mais altos do que M_c .

O controle sobre quando, onde e como novos filamentos de actina serão formados, quanto tempo eles deverão crescer e quando e como serão degradados é exercido através de um elaborado ciclo que conta com a participação de

Proteína	Função
Thymosina- β 4	Liga-se à actina-g, impedindo sua polimerização.
Profilina	Liga-se à actina-g, permitindo sua incorporação somente à extremidade positiva de filamentos existentes.
Arp2/3	Inicia a nucleação de novos filamentos e ramifica filamentos já existentes.
Proteína “tampa”	Liga-se à extremidade positiva dos filamentos de actina, impedindo seu crescimento.
ADF/cofilina	Fragmenta filamentos e os despolimeriza, liberando actina-g.

Tabela 3.2: Algumas das principais proteínas associadas à actina.

uma série de proteínas associadas à actina [7,8,17,18]. Durante cada ciclo (esquemático resumidamente na *Figura 3.2*), proteínas se ligam à actina-g, impedindo a formação espontânea de novos filamentos ou mesmo bloqueando sua incorporação a um filamento já existente. Desta forma a célula pode manter a concentração local de actina-g bem acima do valor crítico. A ação do complexo protéico arp2/3, que depende de ativação por algum estímulo, inicia a polimerização de novos filamentos e também ramifica os já existentes. Neste último caso, a ramificação ocorre sempre em um ângulo da ordem de 70° [17]. Os novos filamentos, impulsionados pela alta concentração de actina-g, podem então crescer rapidamente, empurrando a membrana da célula e gerando movimento. Este crescimento dura até que outras proteínas, denominadas genericamente de proteínas “tampa”, bloqueiem a extremidade positiva dos filamentos, impedindo a incorporação de novas moléculas de actina-g. Os filamentos “tampados” são então fragmentados e despolimerizados pela ação da proteína ADF/cofilina, realimentando o estoque de actina-g no citoplasma. Algumas das principais proteínas associadas à actina, bem como sua função, estão listadas na *Tabela 3.2*.

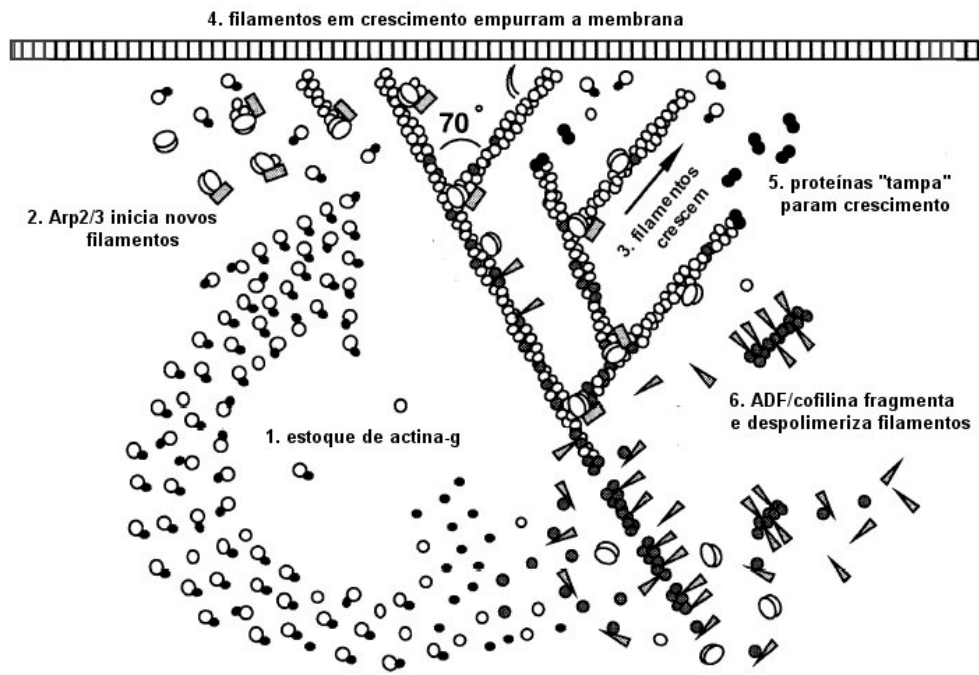


Figura 3.2: Modelo para o ciclo da actina dentro da célula. A ação de várias proteínas permite que a célula controle a formação, o crescimento e a degradação dos filamentos de actina no córtex celular. (diagrama extraído de [18], com modificações)

3.3 Motilidade Celular Baseada na Polimerização de Actina

Como vimos até agora, tanto a organização estrutural quanto a dinâmica envolvida na polimerização dos filamentos de actina sustentam a idéia de que realmente é a pressão exercida por eles sobre a membrana celular a força motriz por trás da formação de estruturas como os lamellipódios e os ruffles, e, conseqüentemente, a força motriz de processos como a fagocitose e a migração celular. De fato, mesmo sendo um processo ativado, a adição de moléculas de actina-g à extremidade positiva de um filamento é um processo para o qual a variação da energia livre de Gibbs é negativa, sendo $\Delta G \approx -6,05 \times 10^{-20} J \approx -14k_B T$ para cada molécula de actina-g incorporada [20]. Assim sendo, o processo de polimerização da actina-g é capaz de liberar energia, que pode então ser empregada para exercer trabalho sobre a membrana.

Os modelos que resumiremos brevemente a seguir representam o pensamento atualmente mais aceito para explicar como a energia livre de polimerização da actina-g é transferida, sob a forma de trabalho mecânico, para a membrana celular.

3.3.1 A Catraca Browniana

O modelo da Catraca Browniana [21] considera as extremidades dos filamentos de actina próximos à membrana celular como polímeros rígidos que crescem ou diminuem pela adição ou remoção de uma única subunidade (no caso, uma molécula de actina-g) por vez. A adição de uma nova subunidade, que ocorre a uma taxa $\alpha = k^+ \times M$, está condicionada à existência de espaço suficiente entre a extremidade do filamento e a membrana, que devem estar a uma distância $x \geq \delta$. Caso $x < \delta$, o filamento não crescerá. Em ambos os casos os filamentos podem diminuir através da remoção de uma subunidade, que ocorre a uma taxa $\beta = k^-$. A distância entre a extremidade do filamento e a membrana é alterada a todo instante pela mudança na posição da membrana, cuja mobilidade, de origem térmica, é caracterizada por seu coeficiente de difusão D_m .

O mecanismo da catraca, esquematizado na *Figura 3.3*, opera quando, por difusão, a membrana se afasta da extremidade do filamento de actina, permitindo a adição de mais uma subunidade. O crescimento do filamento impede que a membrana retorne à sua posição original, permanecendo em uma nova posição de equilíbrio a partir da qual pode, novamente por difusão, distanciar-se mais uma vez da extremidade do filamento e permitir a adição de mais uma subunidade. Este processo, que funciona como um retificador do movimento browniano da membrana, continua até que a força restauradora $-f$ agindo sobre a membrana seja suficiente para impedir sua difusão para longe da extremidade do filamento.

O comportamento médio estatístico do sistema filamentos-membrana é descrito pela função $c(x, t)$, que representa a densidade de filamentos cuja extremidade se encontra a uma distância x da membrana no instante t , de modo que $\int_a^b c(x, t) dx$ é igual ao número total de filamentos com extremidade compreendida dentro do intervalo (a, b) em um dado instante t .

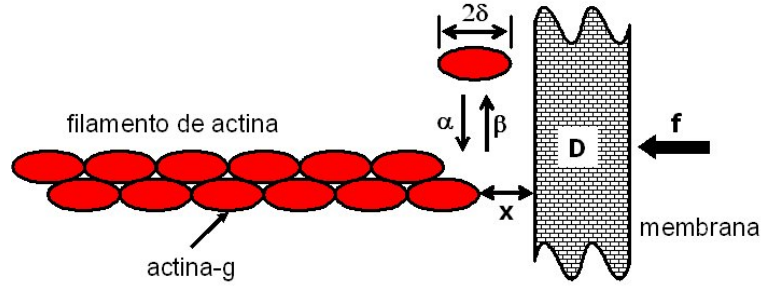


Figura 3.3: Mecanismo da catraca browniana: ao se mover, por difusão, para longe da extremidade do filamento de actina, a membrana permite a adição de mais uma molécula de actina-g. Ao crescer, o filamento impede o retorno da membrana à sua posição de equilíbrio original. A repetição deste processo faz com que a membrana seja projetada à frente, acompanhada pelo crescimento do filamento.

A aplicação das regras do modelo, descritas nos parágrafos anteriores, mostra que $c(x, t)$ deve obedecer à equação

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_m \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \left(\frac{f D_m}{k_B T} \right) \frac{\partial c}{\partial x} + \alpha [c(x + \delta, t) - H(x - \delta)c(x, t)] + \beta [H(x - \delta)c(x - \delta, t) - c(x, t)], \quad (3.2)$$

onde H é a função degrau de Heaviside ($H = 0$ para $x < \delta$ e $H = 1$ para $x \geq \delta$). O primeiro e o segundo termos à direita da igualdade correspondem à contribuição do movimento difusivo da membrana e da força restauradora $-f$ atuando sobre ela, respectivamente. O terceiro e o quarto termos correspondem à cinética de polimerização e despolimerização da extremidade dos filamentos, onde a expressão $\alpha c(x + \delta, t) + \beta H(x - \delta)c(x - \delta, t)$ corresponde às transições que levam ao aumento de $c(x, t)$ e a expressão $-\alpha H(x - \delta)c(x, t) - \beta c(x, t)$ corresponde às transições de levam à sua diminuição (*Figura 3.4*).

A partir da solução estacionária $c(x)$ da *Equação (3.2)*, a velocidade média de crescimento dos filamentos pode ser escrita como

$$V = \delta \frac{\alpha \int_{\delta}^{\infty} c(x) dx - \beta \int_0^{\infty} c(x) dx}{\int_0^{\infty} c(x) dx}, \quad (3.3)$$

onde $\int_{\delta}^{\infty} c(x) dx$ é o número de filamentos capazes de incorporar um novo

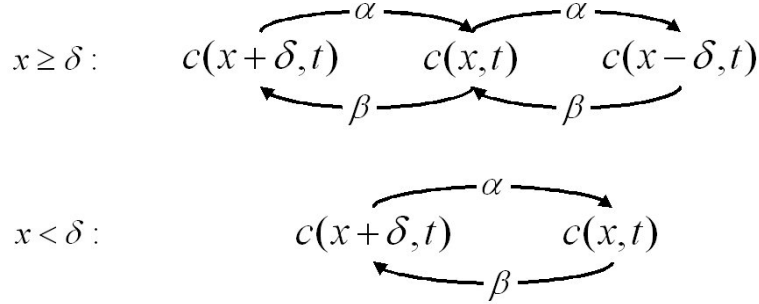


Figura 3.4: Diagrama das transições possíveis entre as populações de filamentos de actina durante a cinética de polimerização/despolimerização prevista pela *Equação 3.2*.

monômero, isto é, o número total de filamentos para os quais $x \geq \delta$, e $\int_0^\infty c(x) dx$ é o número total de filamentos.

O fato de que os valores estimados das grandezas envolvidas no modelo para o movimento da membrana são tais que $\beta \times \delta$, $\alpha \times \delta \ll 2D_m/\delta$, permitem a solução analítica da *Equação 3.2*, levando à simplificação da *Equação 3.3*, que pode então ser escrita como

$$V = \delta [\alpha e^{-w} - \beta], \quad (3.4)$$

onde

$$w = \frac{f\delta}{k_B T} \quad (3.5)$$

representa a razão entre o trabalho gasto para mover, ainda que por difusão, a membrana de uma distância δ e a energia térmica.

O valor da força restauradora f_0 necessária para impedir a difusão da membrana, que interpretaremos como a força máxima exercida por cada filamento ao “empurrá-la”, pode ser obtido tomando-se $V = 0$ na *Equação (3.4)*, de onde obtém-se

$$f_0 = -\frac{k_B T}{\delta} \ln \left(\frac{\beta}{\alpha} \right). \quad (3.6)$$

Calculando os valores de α e β a partir dos dados da *Tabela 3.1* para $M = 25 \mu M$ e $\delta = 2.7 nm$, com $T = 37^\circ C$, obtemos $f_0 \approx 8.5 pN$.

3.3.2 A Catraca Browniana Elástica

O modelo da Catraca Browniana Elástica [22,23] expande o modelo da Catraca Browniana, que acabamos de descrever, levando em consideração a flexibilidade da extremidade dos filamentos de actina próximos à membrana, bem como a geometria da rede de filamentos em relação a ela. Duas situações distintas são analisadas:

1. As flutuações térmicas da membrana não são suficientes para permitir a adição de moléculas de actina-g às extremidades dos filamentos. São as flutuações térmicas das extremidades dos filamentos que permitem a acomodação de mais moléculas de actina-g, impulsionando a membrana. Neste caso o modelo prevê um ângulo crítico $\theta_c \approx 46^\circ$ para a orientação das extremidades dos filamentos em relação à direção do movimento da membrana para o qual a velocidade de polimerização é maximizada.
2. As flutuações térmicas da membrana são suficientes para permitir a adição de moléculas de actina-g às extremidades dos filamentos. Neste caso $\theta_c = 0^\circ$, situação em que o comportamento previsto pelo modelo da Catraca Browniana com filamentos rígidos é reproduzido.

Uma vez que a situação 2 é idêntica à descrita pelo modelo da Catraca Browniana, já discutido, discutiremos a seguir apenas a situação 1.

Situação 1: Flutuações da membrana insuficientes para permitir a adição de actina-g às extremidades dos filamentos

Começamos denotando por $x(t)$ a distância instantânea da extremidade do filamento à membrana e por $y(t)$ sua posição de equilíbrio (não flexionada) no tempo t . Os valores de x e y são determinados a partir de um único eixo de coordenadas \hat{i} fixo na membrana e que cresce perpendicularmente a ela em direção ao interior da célula (*Figura 3.5*). Para pequenas deformações, a força elástica dos filamentos pode ser escrita como $F_y(x) = -k(x - y)$. A constante elástica k , que depende do ângulo θ , é dada por $k(\theta) = 4\lambda k_B T / l^3 \sin^2 \theta^*$,

*A dedução da expressão para $k(\theta)$, que não reproduziremos aqui, pode ser encontrada no Apêndice B em [23].

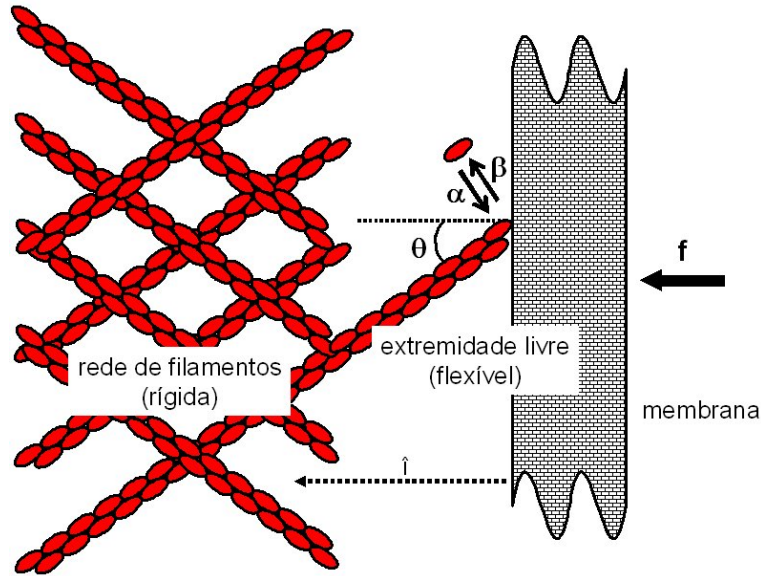


Figura 3.5: Geometria dos filamentos de actina na catraca browniana elástica

onde as constantes λ e l , que representam o comprimento de persistência e o comprimento de contorno da extremidade do filamento, respectivamente, são parâmetros relacionados à sua rigidez*. Se consideramos como $P(x, y, t)$ a probabilidade de encontrarmos a extremidade de um filamento a uma distância $(y - x)$ de sua posição de equilíbrio y no tempo t , seu comportamento será dado por

$$\begin{aligned} \frac{\partial P}{\partial t} &= D_f \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} - \frac{D_f}{k_B T} \frac{\partial}{\partial x} (F_y(x)P) - V \frac{\partial P}{\partial y} \\ &+ \alpha [P(x, y + \delta) - P(x, y)H(x - \delta)] \\ &+ \beta [H(x - \delta)P(x, y - \delta) - P(x, y)], \end{aligned} \quad (3.7)$$

onde D_f é o coeficiente de difusão da extremidade do filamento e V é a velocidade com que a membrana se desloca. Analogamente à Equação 3.2, os dois primeiros termos à direita da igualdade correspondem à contribuição da difusão da extremidade do filamento e da força restauradora elástica atuando sobre ela, respectivamente. O terceiro termo corresponde à velocidade relativa entre a extremidade do filamento e a membrana. Novamente, os últimos

*Para maiores detalhes, veja, por exemplo, Doi, M. and Edwards, S. F., “*The Theory of Polymer Dynamics*”, pp. 316-318, Oxford University Press, Oxford, 1986.

dois termos correspondem à cinética de polimerização e despolimerização da extremidade dos filamentos. A solução estacionária da *Equação (3.7)*, obtida considerando-se a escala de tempo de difusão dos filamentos como dominante e tratando-se os três últimos termos como perturbações, resulta em uma velocidade de propagação da membrana

$$V \approx \delta \cos \theta [\alpha \hat{p}(\theta, y_0) - \beta], \quad (3.8)$$

onde $\hat{p}(\theta, y_0)$ representa a probabilidade de ocorrência de um espaço entre a extremidade do filamento e a membrana com tamanho e duração suficientes para permitir a adição de mais uma molécula de actina-g,

$$\hat{p}(\theta, y_0) = \frac{\int_0^\infty \exp(-\kappa(x - y_0)^2/2k_B T) dx}{\int_0^\infty \exp(-\kappa(x - y_0)^2/2k_B T) dx}. \quad (3.9)$$

O valor de y_0 , que representa a distância de equilíbrio assintótica da extremidade do filamento à membrana, pode ser eliminado considerando-se a força elástica média exercida pela extremidade de um filamento sujeito a flutuações térmicas*,

$$f \approx k_B T \frac{\exp\left(-\frac{\kappa y_0^2}{2k_B T}\right)}{\int_0^\infty \exp\left(-\frac{\kappa(x - y_0)^2}{2k_B T}\right) dx}. \quad (3.10)$$

A análise numérica da função $V(f, \theta)$ obtida com a substituição paramétrica de y_0 por f mostra que filamentos flexíveis ($\lambda \approx 1 \mu m$) com extremidade livre da ordem de $l \approx 0.1 \mu m$ podem crescer mesmo para $\theta = 0^\circ$, uma vez que a energia térmica é suficiente para curvá-los o bastante para a adição de mais actina-g com facilidade. Filamentos mais rígidos ou com extremidades livres menores, entretanto, tem que se aproximar da membrana em ângulos maiores, uma vez que a probabilidade de ocorrência de um espaço suficiente para a adição de mais uma molécula de actina-g cresce com o aumento do ângulo θ . Também o aumento na força restauradora $-f$ sobre a membrana, que dificulta a difusão da extremidade dos filamentos, favorece o aumento do ângulo de aproximação θ . Como para $\theta = \pi/2$ os filamentos estão paralelos à

*A dedução desta expressão pode ser encontrada no Apêndice D em [23].

membrana ($V \rightarrow 0$), o modelo prevê a existência de um valor crítico θ_c para o qual a velocidade de deslocamento da membrana é máxima. Se considerarmos a tensão natural da membrana ($\sigma \approx 3.5 \times 10^{-2} \text{ pN/nm}$) como única força restauradora atuando, teremos

$$\theta_c \approx \arctan \left(\frac{2\delta\sqrt{\lambda}}{l^{3/2}} \right). \quad (3.11)$$

Substituindo os valores típicos $\lambda \approx 1 \mu\text{m}$, $l \approx 30 \text{ nm}$, obtemos $\theta_c \approx 46^\circ$.

O modelo também prevê que a força restauradora f_0 necessária para parar o movimento da membrana, que consideraremos como sendo a força máxima exercida por cada filamento, é

$$f_0 \approx \frac{2k_B T}{l} \sqrt{\frac{\lambda}{\delta}}. \quad (3.12)$$

Substituindo os valores típicos com $T = 37^\circ\text{C}$, obtemos $f_0 \approx 5.5 \text{ pN}$.

3.3.3 A Catraca Browniana Elástica com Filamentos Aderidos

A Catraca Browniana Elástica com Filamentos Aderidos [24] estende os dois modelos apresentados anteriormente para incluir a existência de filamentos de actina aderidos à membrana, hipótese fortemente suportada por experimentos recentes [25,26]. Ao contrário dos filamentos com extremidade positiva livre, que “impulsionam” a membrana à frente, os filamentos aderidos agem como “âncoras”, gerando uma força de adesão que se soma à força restauradora em oposição ao movimento da membrana.

O modelo considera que os filamentos aderidos à membrana, nucleados a uma taxa n pela ação do complexo arp2/3, podem soltar-se, tornando-se filamentos livres a uma taxa ϕ , e que os filamentos livres podem tornar-se inativos (não contribuindo para o movimento da membrana e nem impedindo-o) ao serem “capeados” a uma taxa ψ (*Figura 3.6*). Assim sendo, tanto o número a de filamentos aderidos quanto o número w de filamentos livres ativos podem apresentar variações no tempo. Entretanto, considerando o balanço de forças requerido para que o movimento da membrana seja uniforme teremos

$$F_r + F_a \times a = F_w \times w, \quad (3.13)$$

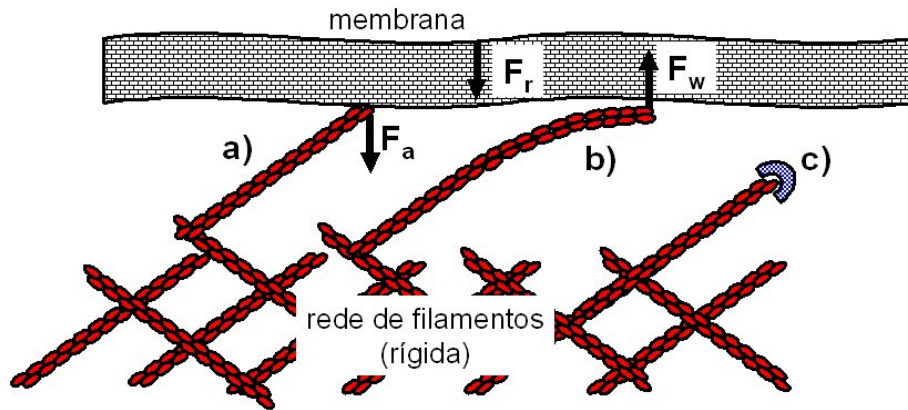


Figura 3.6: A catraca browniana elástica com filamentos aderidos: a) filamentos nucleados já aderidos à membrana agem como “âncoras”, gerando uma força F_a que se soma à força restauradora F_r em oposição ao movimento da membrana. b) filamentos com extremidade livre “impulsionam” a membrana à frente pela incorporação de moléculas de actina-g. c) após algum tempo impulsionando a membrana, os filamentos livres tornam-se inativos quanto suas extremidades são “capeadas” por proteínas “tampa”.

onde F_r é a força restauradora da membrana, F_a é a força de adesão exercida por cada filamento aderido à membrana e F_w é a força exercida por cada filamento livre ativo ao empurrar a membrana à frente.

Com base nos resultados obtidos pelos dois modelos anteriores, a velocidade de deslocamento da membrana deve obedecer

$$V \approx \delta \cos \theta \left[\alpha \exp \left[-\frac{\delta \cos \theta F_w}{k_B T} \right] - \beta \right], \quad (3.14)$$

que, combinada com a condição de balanço de forças (Equação (3.13)), resulta em

$$V \approx \delta \cos \theta \left[\alpha \exp \left[-\frac{\delta \cos \theta (F_a(a/w) + F_r/w)}{k_B T} \right] - \beta \right]. \quad (3.15)$$

A análise numérica da Equação (3.15), considerando a dinâmica das populações de filamentos aderidos e livres (que não discutiremos aqui), permite estimar o valor da força exercida por cada filamento ativo em $F_w \approx 3.8 pN$.

Capítulo 4

Metodologia Experimental e de Análise de Dados

4.1 Preparação de Amostras

4.1.1 Macrófagos

Os macrófagos utilizados nos experimentos são obtidos a partir da diferenciação de células precursoras de macrófagos extraídas da medula óssea de fêmures de camundongos *C57BL/6*. Após a extração, as células extraídas da medula são colocadas em meio de cultura celular contendo fator de crescimento (M-CSF), que estimula seu desenvolvimento em macrófagos [1], e mantidas em estufa a 37°C e atmosfera com 5% CO_2 por 4 – 5 dias. Após este período, as células, que já terão se tornado macrófagos, são transferidas para cubetas (lâminas de vidro acopladas a um pequeno reservatório de acrílico) contendo 1 *ml* de meio de cultura e deixadas em repouso por um período de 3 – 24 horas (37°C , 5% CO_2) para que possam aderir à superfície da lâmina. Uma vez aderidas, as células podem estender sua membrana facilmente sobre a superfície da lâmina, permitindo que estruturas como lamellipódios e ruffles possam ser observadas sem a interferência dos demais componentes celulares, como o núcleo e outras organelas.

O protocolo completo de extração e cultivo das células, assim como a composição dos meios de cultura utilizados, são dados no *Apêndice B*.

4.1.2 Parasitas

Para os experimentos de fagocitose, utilizamos leishmanias (*Leishmania amazonensis*, cepa IFLA/BR/67/PH8) em fase amastigota. Os parasitas são extraídos das patas de camundongos *C57BL/6* infectados. Tecido extirpado das lesões nas patas dos animais é homogeneizado em meio celular próprio e centrifugado para separar os parasitas. Após serem ressuspensos, os parasitas são adicionados à cubeta já contendo macrófagos.

Todos os parasitas utilizados nos experimentos foram gentilmente cedidos, já ressuspensos e prontos para uso, por Denise Fonseca Cortes, do Laboratório de Nutrição e Gnotobiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

4.2 Técnicas Experimentais

Para estudar o comportamento das estruturas formadas sobre a membrana dos macrófagos como decorrência da constante reorganização da rede de filamentos de actina do córtex celular, utilizamos como ferramenta principal a microscopia de desfocalização [27,28], associada à técnica de pinçamento óptico [29].

4.2.1 Microscopia de Desfocalização

Por conter, em sua maioria, apenas a membrana plasmática e as redes de filamentos de actina logo abaixo dela, a porção periférica da superfície dos macrófagos aderidos é fina e transparente à luz visível. Somando-se a isto o fato de que seu índice de refração é muito próximo ao do meio de cultura em que está imersa, esta região da célula pode ser considerada um objeto de fase*. A visualização de objetos desta natureza usualmente requer o uso de técnicas mais elaboradas e dispendiosas do que a microscopia óptica convencional, tais como a microscopia de contraste de fase, microscopia DIC

*Objetos de fase são definidos como aqueles capazes de modificar somente a fase da luz que os atravessa, deixando inalterada sua intensidade (Born, M. and Wolf, E., “*Principles of Optics*”, pp. 447 e 472, Cambridge University Press, New York, 7th (*expanded*) edition (1999)).

(differential interference contrast) ou ainda a microscopia de fluorescência. Entretanto, como nosso interesse não é estudar a membrana plasmática em si, mas apenas as estruturas que se formam em sua superfície, podemos empregar uma técnica simples, no entanto bastante poderosa, que permite a visualização direta e a quantificação de curvaturas e inhomogeneidades presentes em uma superfície bidimensional, mesmo que a superfície em si seja transparente: a microscopia de desfocalização. Apesar de podermos obter o mesmo tipo de informação através do uso das outras técnicas mencionadas, a análise dos dados obtidos através da microscopia de desfocalização é bem mais simples, como veremos a seguir. Este argumento, combinado com o fato de que a microscopia de desfocalização pode ser usada em praticamente todo e qualquer microscópio óptico sem a necessidade de filtros, placas de onda, prismas especiais, entre outros dispositivos ópticos, a torna a técnica ideal para estudar a motilidade da membrana celular e outros sistemas com características similares.

Princípio de Funcionamento

Como pode ser inferido pelo nome, a microscopia de desfocalização consiste em introduzir uma pequena desfocalização à imagem, a princípio invisível, de um objeto de fase sob um microscópio óptico convencional. Embora o objeto de fase não se torne visível, a introdução de uma pequena desfocalização faz com que quaisquer irregularidades presentes em sua superfície ou inhomogeneidades em seu índice de refração produzam uma imagem cujo contraste é dado por [27,28]

$$C_I(x, y) = \frac{I - I_0}{I_0} = \Delta n \Delta f \nabla^2 h(x, y), \quad (4.1)$$

onde I é a intensidade luminosa observada na posição (x, y) , I_0 é a intensidade luminosa média fora do objeto, Δn é a diferença entre os índices de refração do objeto observado e do meio em que ele está imerso, Δf é a desfocalização introduzida e $h(x, y)$ é a espessura do objeto. Uma vez conhecidos Δn e Δf , e aproximando-se a curvatura da superfície observada por $\kappa \approx \nabla^2 h(x, y)$, podemos determinar o valor de κ em qualquer ponto da superfície do objeto de fase a partir do valor do contraste C observado naquele ponto.

Embora a dedução da *Equação 4.1* não possa ser feita com base neste argumento, a origem do contraste produzido pela desfocalização pode ser entendida ao imaginarmos que, uma vez que possui certa curvatura, o objeto estudado funciona como uma lente delgada adicional no caminho óptico do microscópio. Tal lente será convergente ou divergente dependendo do sinal da curvatura do objeto. Enquanto o objeto permanece focalizado, nenhum efeito é observado, uma vez que qualquer lente delgada colocada no foco de outra lente não produz qualquer efeito sobre a luz que a atravessa. Entretanto, ao movermos o objeto estudado para fora do foco do microscópio, isto é, ao introduzirmos uma desfocalização, o efeito de lente do objeto se manifesta, divergindo ou convergindo os raios que o atravessam de acordo com sua curvatura a com o sentido da desfocalização, gerando assim o contraste previsto pela teoria.

Aplicação no Trabalho

Ao medirmos como varia a curvatura ao longo da superfície da membrana dos macrófagos em um determinado instante, podemos recuperar a forma e as dimensões reais aproximadas das estruturas formadas sobre ela. Ao acompanharmos como varia a curvatura em um mesmo ponto ao longo do tempo, podemos determinar sua duração e velocidade de propagação. A simples observação e acompanhamento da evolução temporal das imagens obtidas dos macrófagos, mesmo sem a quantificação das curvaturas envolvidas, permitem determinar o comprimento e a frequência de ocorrência das deformações sobre a membrana.

4.2.2 Pinça Óptica

Para que possamos determinar se as estruturas formadas sobre a membrana dos macrófagos podem ter alguma influência ou papel em sua atividade fagocítica, é necessário que tenhamos a capacidade de promover eventos de fagocitose de maneira controlada. Para tal, introduzimos pequenas quantidades de parasitas no meio de cultura durante os experimentos. Com o auxílio de uma pinça óptica [29], ferramenta que durante a última década se estabeleceu como um dos melhores métodos para a manipulação individual

de células vivas, organelas celulares e até mesmo de moléculas, podemos capturar, um a um, tais parasitas, levá-los até um macrófago e colocá-los em contato com sua membrana, induzindo eventos de fagocitose quando e onde desejarmos.

Princípio de Funcionamento

Uma pinça óptica consiste basicamente de um feixe de laser, usualmente com perfil gaussiano, focalizado através de uma lente ou objetiva*. O mecanismo de pinçamento pode ser entendido, de forma simplificada, aplicando-se a conservação do momento linear ao sistema laser-objeto pinçado (*Figura 4.1*).

A força da pinça depende da intensidade e da frequência do laser utilizado. Deve-se ter em mente, porém, a natureza do material a ser manipulado ao se escolher tanto o tipo do laser quanto a intensidade incidente, a fim de evitar possíveis danos às amostras. No nosso caso, assim como na maioria das pinças utilizadas para manipulação de material biológico, utilizamos um laser infravermelho (SDL 5422-H1, $\lambda = 832 \text{ nm}$), a uma potência incidente de aproximadamente 1 mW , que gera uma força de pinçamento da ordem de 1 pN . Arranjos experimentais semelhantes podem chegar a forças da ordem de 50 pN .

4.2.3 Montagem Experimental

Os experimentos são realizados em um microscópio óptico invertido (*Nikon Eclipse TE 300*) acoplado a duas câmaras CCD (*Dage MTI 72*) e ao laser infravermelho que gera a pinça óptica, conforme mostrado na *Figura 4.2*. As imagens captadas são gravadas em vídeo através de um VCR (*Sony Hi8, EVO9650 / Sony DVCAM, DSR 20*) conectado à CCD 2 e analisadas posteriormente. O controle de temperatura da amostra durante os experimentos é feito por um sistema de circulação de água ligado a um banho térmico (*LAUDA Compact Low-Temperature Thermostats, RCS 6 / RCS 20*) e acoplado à objetiva do microscópio. Todos os experimentos são feitos mantendo-

*Por este motivo as pinças ópticas são geralmente montadas a partir de um microscópio óptico, o que também auxilia na visualização dos objetos a serem manipulados.

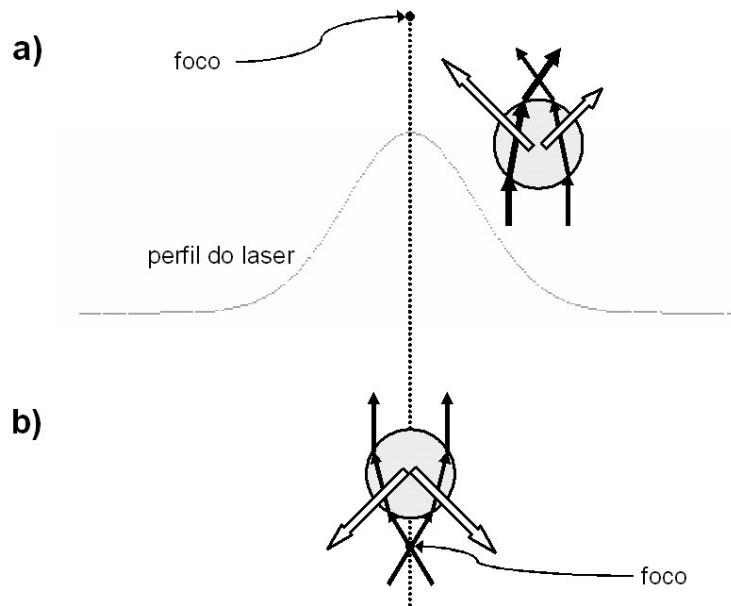


Figura 4.1: Princípio do pinçamento óptico: a) Ao se aproximar do feixe laser, o objeto refrata os raios que o atravessam (*setas pretas*). A conservação do momento linear do sistema laser-objeto exige que a mudança de momento sofrida pelos raios refratados seja compensada por uma mudança semelhante no momento do objeto, fazendo com que este sofra uma força (*setas brancas*). A diferença de intensidade entre os raios refratados por diferentes pontos do objeto, que é devida ao perfil do laser, faz com que o objeto seja puxado em direção do eixo do feixe, ao mesmo tempo em que é empurrado para o foco. b) Uma vez posicionado no eixo do feixe, ao passar pelo foco, a força sofrida pelo objeto devido à conservação do momento troca de sentido, puxando-o de volta para o foco do laser. Como resultado final o objeto é estabilizado sobre o eixo do feixe, em uma posição ligeiramente posterior ao foco, onde a pressão de radiação e a força da pinça se contrabalanceiam.

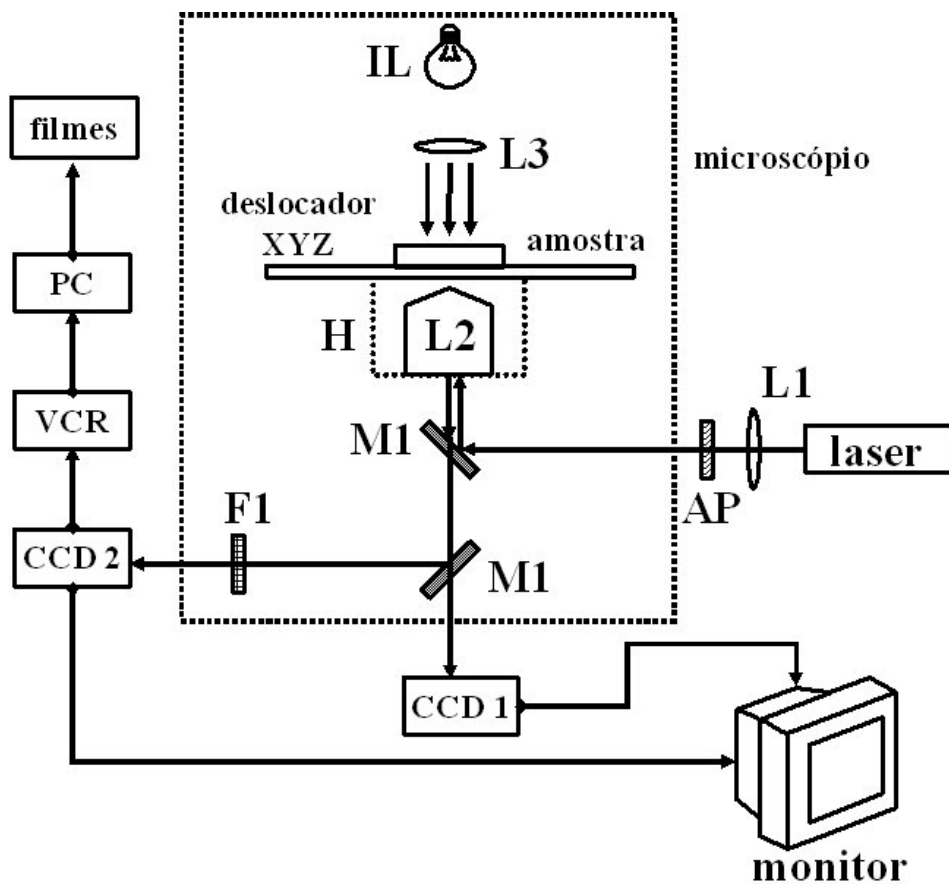


Figura 4.2: Diagrama da montagem experimental.

- laser: SDL 5422 ($\lambda = 832 \text{ nm}$)
- L1: Objetiva 20x
- L2: Objetiva Nikon 100x 1.4 na
- L3: Condensador
- IL: Iluminação
- M1: Espelho 50%
- F1: Filtro infravermelho
- AP: Prisma anamórfico
- H: Sistema de aquecimento

se a amostra a 37°C , salvo os casos em que os efeitos da alteração da temperatura estejam sendo investigados.

Calibração do Sistema de Videomicroscopia

Na fase inicial de nosso trabalho, durante o decorrer do processo de análise dos primeiros filmes que fizemos dos macrófagos, ficou claro que diferentes ajustes na sensibilidade da CCD 2 resultavam em imagens com diferentes contrastes e diferentes níveis de ruído, dificultando assim a comparação entre amostras. A origem deste comportamento está no fato de que o contraste previsto pela *Equação 4.1* é definido com base na intensidade luminosa da imagem observada, que podemos considerar como uma grandeza absoluta, isto é, cujo valor independe do método de medida, e não com base na resposta produzida pela CCD, que irá variar de acordo com os ajustes dos controles da câmera, sendo, portanto, uma grandeza relativa. Assim sendo, foi necessário procurar por um ajuste para a câmera que permitisse a obtenção de imagens com um bom contraste, ao mesmo tempo em que o nível de ruído no sinal se mantivesse baixo. Uma vez encontrado um ajuste adequado, o sistema de videomicroscopia foi calibrado de forma a permitir que o contraste relativo obtido das imagens digitalizadas pudesse ser convertido adequadamente para o contraste absoluto, determinado com base na intensidade luminosa em cada ponto da imagem, que obedece a *Equação 4.1*. O processo de calibração está descrito no *Apêndice C*.

4.2.4 Procedimentos Básicos de Medida

O estudo dos macrófagos é feito com base em dois tipos básicos de experimento: caracterização de seu comportamento enquanto aderidos à superfície da amostra e monitoramento de eventos de fagocitose induzidos com o auxílio da pinça óptica. No primeiro caso, a intenção é determinar as características morfológicas e dinâmicas das estruturas formadas naturalmente na membrana, tais como suas dimensões, tempo de relaxação, velocidade de propagação e frequência de ocorrência. No segundo caso, queremos avaliar a intensidade e extensão médias das mudanças provocadas no comportamento da membrana durante a fagocitose, em relação ao seu comportamento médio

natural. Os procedimentos básicos utilizados na realização de cada tipo de experimento são descritos a seguir.

Caracterização dos Macrófagos

Todos os experimentos de caracterização do comportamento dos macrófagos seguem o mesmo protocolo básico: uma vez ligados todos os equipamentos, a temperatura do sistema é ajustada para o valor desejado. A amostra a ser estudada é levada ao microscópio, focalizada e deixada em repouso por um período de 15 – 20 minutos para que entre em equilíbrio térmico com o sistema. Após o equilíbrio ter sido atingido, é selecionado um macrófago para o experimento. São escolhidas preferencialmente as células com melhor adesão à superfície da amostra, uma vez que estas apresentam porções maiores de membrana espalhada. O macrófago escolhido é focalizado e o nível de cinza médio da imagem é ajustado controlando-se a iluminação. A seguir é feita a desfocalização da imagem ($\Delta f \approx 1 \mu m$). Cada macrófago desfocalizado é então filmado durante pelo menos 10 minutos.

Eventos de Fagocitose

Para os experimentos de fagocitose de parasitas, pequenas modificações são introduzidas nos procedimentos de medida para caracterização dos macrófagos: os parasitas são adicionados à amostra logo após esta ter sido levada ao microscópio. Após a amostra ter atingido a temperatura desejada, a pinça óptica é acionada e utilizada para capturar um parasita e transportá-lo até as proximidades de um macrófago, escolhido com base no mesmo critério anterior. O nível de cinza médio e a desfocalização são ajustados e o macrófago é filmado por alguns minutos. Sem interromper a gravação, o parasita é então colocado em contato direto com a membrana do macrófago. A observação da mudança no padrão de movimento browniano do parasita permite determinar quando este adere à membrana do macrófago, momento em que a pinça é desligada. O macrófago continua a ser filmado até que o parasita tenha sido fagocitado ou se solte. No caso de uma fagocitose bem sucedida, o macrófago é filmado por mais alguns minutos após a conclusão do evento.

4.3 Experimentos Realizados

No decorrer de nosso estudo, realizamos diferentes tipos de experimentos com os macrófagos. Nesta seção, relacionamos cada tipo de experimento realizado, bem como seu objetivo principal.

Foram realizados os seguintes tipos de experimento:

- **Caracterização das Flutuações de Curvatura a $37^{\circ}C$:**

Neste tipo de experimento queremos determinar as características morfológicas e dinâmicas típicas das estruturas formadas naturalmente na membrana dos macrófagos aderidos à superfície da amostra. A amostra é mantida a uma temperatura constante de $37^{\circ}C$ enquanto os macrófagos são filmados.

- **Efeito de Fármacos e Tratamentos Diversos Sobre as Flutuações de Curvatura a $37^{\circ}C$:**

Neste tipo de experimento queremos determinar possíveis efeitos de fármacos que afetam aspectos específicos da fisiologia celular sobre o comportamento das estruturas formadas na membrana dos macrófagos. Os experimentos são realizados a uma temperatura constante de $37^{\circ}C$. O fármaco cujo efeito queremos investigar é adicionado à cubeta após a amostra atingir o equilíbrio térmico com a montagem experimental e seus efeitos são avaliados ao longo do tempo.

- **Efeito de Mudanças na Temperatura Sobre as Flutuações de Curvatura:**

Neste tipo de experimento queremos determinar possíveis efeitos na diminuição da temperatura sobre o comportamento das estruturas formadas na membrana dos macrófagos. Um teste preliminar, realizado à temperatura ambiente, mostrou que este tipo de experimento causava grandes efeitos sobre a dinâmica das estruturas na membrana dos macrófagos. Por este motivo, este tipo de experimento foi priorizado para a realização de experimentos mais detalhados. Os experimentos são iniciados à temperatura de $24^{\circ}C$, que vai sendo elevada, a intervalos regulares, até atingir $37^{\circ}C$. Em cada intervalo, após um período de

adaptação à nova temperatura, os macrófagos são filmados por pelo menos 10 minutos.

- **Comportamento das Flutuações de Curvatura Durante Eventos de Fagocitose a $37^{\circ}C$:**

Neste tipo de experimento empregamos a pinça óptica para induzir a fagocitose de parasitas (*Leishmania amazonensis*, em forma amastigota) para determinarmos como este tipo de evento afetaria o comportamento das flutuações na curvatura da membrana nas proximidades do ponto de contato entre a membrana e o parasita. A amostra é mantida a uma temperatura constante de $37^{\circ}C$ enquanto os eventos de fagocitose provocados são filmados.

- **Efeito de Mudanças na Temperatura Sobre o Processo de Fagocitose:**

Neste tipo de experimento queremos determinar como a diminuição da temperatura afetaria o processo de fagocitose dos parasitas pelo macrófago. Os eventos de fagocitose são provocados inicialmente a uma temperatura de $24^{\circ}C$, que vai sendo elevada, a intervalos regulares, até atingir $37^{\circ}C$. Em cada intervalo, após um período de adaptação à nova temperatura, eventos de fagocitose provocados são filmados.

4.4 Métodos de Análise de Dados

As imagens gravadas em vídeo são analisadas com o auxílio do programa *ImageJ**. Cada filme passa por diferentes tipos de análise, de acordo com o tipo de experimento realizado. Nos experimentos de caracterização dos macrófagos são feitas análises de correlação temporal e espacial da curvatura,

*O *ImageJ* (Image Java) é um programa de domínio público desenvolvido no National Institutes of Health, USA, para manipulação e extração de informações de imagens armazenadas em diversos formatos. Além de contar com diversas ferramentas de análise, sua interface permite a criação de rotinas adicionais (*plugins*) a partir das quais pode-se efetuar operações com a informação armazenada em quaisquer pontos da imagem de maneira rápida e automatizada. O software, sua documentação completa e também *plugins* diversos podem ser obtidos no endereço <http://rsb.info.nih.gov/ij>.

distribuição da curvatura e comprimento, frequência de ocorrência e perfil de curvatura dos ruffles. Já nos experimentos de fagocitose de parasitas são feitas análises do tempo de fagocitose e da curvatura quadrática média em torno da região de engolfamento do parasita. Em ambos os casos, a desfocalização utilizada foi sempre $\Delta f \approx 1 \mu m$. O valor da diferença entre o índice de refração do macrófago e do meio de cultura utilizado em todas as análises foi $\Delta n = 0,1$ [27,28]. Cada tipo de análise será descrito a seguir.

4.4.1 Autocorrelação Temporal e Espacial da Curvatura

Neste tipo de análise procuramos determinar o tempo de relaxação, o comprimento de correlação e curvatura rms médios das pequenas estruturas formadas na membrana, cujo contraste possuiu intensidade bem menor que o produzido por estruturas que causam grandes mudanças na curvatura na membrana, tais como os ruffles, o que dificulta sua observação direta.

O tempo de relaxação médio destas estruturas é estimado a partir do cálculo do valor médio do produto da curvatura observada em um ponto qualquer da membrana em um dado instante pela curvatura no mesmo ponto em instantes posteriores, ou seja, a partir da função de autocorrelação temporal

$$F_t(t) = \langle \langle \kappa(\rho, t_0) \times \kappa(\rho, t_0 + t) \rangle \rangle_{t_0, \rho}, \quad (4.2)$$

onde $\kappa(\rho, t_0)$ é a curvatura observada na posição ρ no instante t_0 . O valor da função de autocorrelação temporal $F_t(t)$ em cada instante t é uma medida estatística do quanto a curvatura em um ponto da membrana em um dado instante está relacionada à curvatura do mesmo ponto após um intervalo de tempo t . A partir do decaimento e da amplitude máxima da função $F_t(t)$, podemos obter o tempo de relaxação e a curvatura rms médios das estruturas estudadas.

Analogamente, o comprimento de correlação médio de tais estruturas, que tomaremos como uma estimativa de sua dimensão linear média individual, pode ser estimado a partir do cálculo do valor médio do produto da curvatura observada em um instante qualquer em uma determinada posição pela curvatura, observada no mesmo instante, em pontos adjacentes, ou seja, a

partir da função de autocorrelação espacial

$$F_e(\rho) = \left\langle \langle \kappa(\rho_0, t) \times \kappa(\rho_0 + \rho, t) \rangle_{\rho_0} \right\rangle_t, \quad (4.3)$$

onde $\kappa(\rho_0, t)$ é a curvatura observada na posição ρ_0 no instante t . O valor da função de autocorrelação espacial $F_e(\rho)$ em cada posição ρ é uma medida estatística de quanto a curvatura em um ponto da membrana em um dado instante está relacionada à curvatura, observada no mesmo instante, em pontos adjacentes, separados do ponto inicial por uma distância ρ . A partir do decaimento e da amplitude máxima da função $F_e(\rho)$, podemos obter o comprimento de correlação e a curvatura rms médios das estruturas estudadas.

Nos dois casos, os cálculos com os valores da curvatura sobre a membrana dos macrófagos são feitos por *plugins* escritos para o *ImageJ* especificamente para esse fim.

4.4.2 Distribuição da Curvatura

Neste tipo de análise estudamos a distribuição estatística da curvatura observada em toda a área da membrana aderida à superfície da amostra. Inicialmente os valores da curvatura presentes a cada instante de observação em cada ponto da área de membrana aderida são medidos. A seguir, é determinada a quantidade de vezes que cada valor de curvatura foi detectado e os dados são usados para a construção de um histograma, que nada mais é do que uma representação de como a curvatura se distribui sobre a membrana dos macrófagos aderidos. Assumindo que toda e qualquer curvatura observada na área de membrana aderida só pode ter sua origem nas pequenas deformações da membrana ou então nos ruffles, podemos, a partir do histograma das curvaturas, determinar a proporção relativa entre as pequenas flutuações e os ruffles, bem como a curvatura média produzida por cada um desses tipos de estrutura.

O histograma das curvaturas é calculado a partir de um *plugin* para o *ImageJ*, disponível no sítio do próprio programa, que fornece o histograma dos níveis de cinza observados em uma região selecionada de um filme.

4.4.3 Comprimento, Frequência de Ocorrência e Perfil de Curvatura de Ruffles

Como perturbações significativas no formato da membrana, os ruffles produzem grandes mudanças em sua curvatura, gerando padrões facilmente detectáveis pela microscopia de desfocalização. Assim sendo, podemos facilmente medir seu comprimento sobre a superfície da membrana e sua frequência de ocorrência diretamente das imagens gravadas durante os experimentos. Além destas medidas, neste tipo de análise traçamos o perfil de curvatura da membrana ao longo dos ruffles, seguido sempre uma direção paralela do seu movimento. A partir do perfil de curvatura podemos estimar o formato dos ruffles, além de determinar sua altura e largura. O acompanhamento da evolução dos perfis de curvatura dos ruffles ao longo do tempo também permite determinar sua velocidade de propagação.

4.4.4 Tempo de Fagocitose

Ao provocarmos eventos de fagocitose de parasitas quando e onde desejamos, com o auxílio da pinça óptica, podemos ter certeza de ter acompanhado todo o processo, do início ao fim. A partir da análise cuidadosa, feita quadro a quadro, das imagens de cada evento, podemos determinar, com relativa precisão, o instante em que cada fagocitose foi iniciada, caracterizado pela interrupção do padrão de movimento browniano do parasita enquanto preso à pinça óptica, bem como o instante em que a fagocitose é completada, caracterizado pela mudança no padrão de imagem do parasita ao ser completamente envolvido pela membrana do macrófago e também pelo início de seu deslocamento, já sob a membrana, em direção à região central do macrófago. Uma vez determinados os tempos em que cada uma destas situações ocorre, definimos o tempo de cada evento de fagocitose como sendo o intervalo de tempo transcorrido entre elas.

4.4.5 Curvatura Quadrática Média em Torno de Uma Região

Durante eventos de fagocitose, a porção da membrana em contato direto com a partícula sendo fagocitada deve se deformar, a fim de encobri-la e completar a fagocitose. Tal deformação certamente induz o aparecimento de curvaturas significativas na região de contato entre a membrana e a partícula sendo fagocitada. Neste tipo de análise buscamos determinar o comportamento da curvatura quadrática média da membrana em torno da região em que a fagocitose acontece, excluindo completamente a porção da membrana diretamente envolvida, durante o decorrer do processo de fagocitose. Para tal, acompanhamos, quadro a quadro, a partir das imagens gravadas em vídeo, a evolução da curvatura quadrática média da membrana em torno do ponto de contato entre a membrana e a partícula sendo fagocitada, antes, durante e depois da fagocitose. Uma vez que os ruffles são as estruturas que causam as maiores deformações no formato da membrana, aumentando sua curvatura local, a curvatura quadrática média da membrana em uma determinada área pode ser interpretada como uma medida da quantidade de ruffles presentes naquela região. A partir destes dados, combinados com as medidas do tempo de fagocitose, podemos ter uma idéia de como a presença de estruturas como os ruffles na membrana dos macrófagos podem influenciar o processo de fagocitose efetuado por estas células.

Capítulo 5

Resultados Obtidos

5.1 Caracterização das Flutuações de Curvatura a $37^{\circ}C$

Os macrófagos aderidos apresentam dois tipos distintos de flutuações de curvatura na forma de sua membrana: pequenas flutuações aleatórias de curvatura (FAC), distribuídas de maneira uniforme sobre toda a membrana da célula, independentemente do instante de observação, e os ruffles, grandes flutuações locais na curvatura da membrana que formam estruturas coerentes que se propagam sobre ela. Uma imagem típica obtida de um macrófago aderido, já desfocalizado, destacando os padrões de contraste tipicamente gerados por cada um dos dois tipos de flutuação na forma da membrana, é mostrada na *Figura 5.1*.

5.1.1 Flutuações Aleatórias de Curvatura (FAC)

Ao compararmos os dois tipos de padrão de contraste observados na membrana dos macrófagos, vemos que o nível de contraste gerado pelas FAC é significativamente menor que o dos ruffles, indicando que as FAC apresentam amplitudes de curvatura pequenas comparadas às curvaturas presentes nos ruffles. Devido ao seu baixo contraste, a observação direta das FAC se mostrou difícil, razão pela qual a caracterização deste tipo de estrutura foi feita a partir do comportamento das funções de autocorrelação temporal e espacial

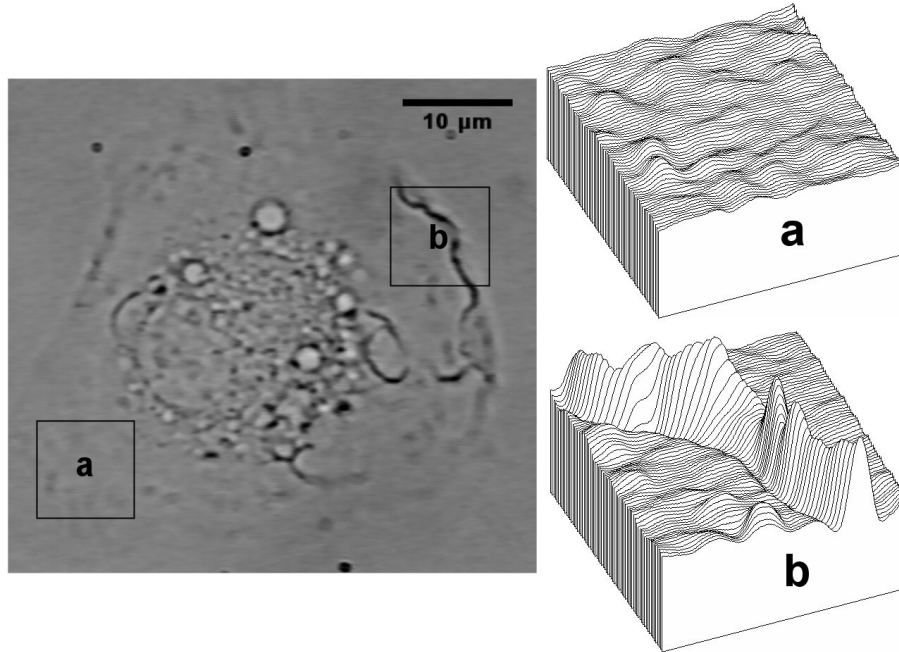


Figura 5.1: Padrões de contraste sobre a membrana de um macrófago desfocado: (a) padrão de contraste de pequena intensidade, indicativo da presença de pequenas flutuações na curvatura da membrana. (b) padrão de contraste de grande intensidade, indicativo da presença de um ruffle na membrana. O núcleo da célula está localizado na região inferior esquerda do centro da imagem. Os grandes círculos claros são macropinosomos formados por ruffles que se fecharam sobre si mesmos, capturando grandes porções de meio extra celular. A desfocalização introduzida é de aproximadamente $1 \mu m$.

e da distribuição da curvatura da membrana. O comportamento típico obtido para as funções $F_t(t)$ e $F_e(\rho)$, a partir das quais estimamos o tempo de relaxação τ , o comprimento de correlação ξ e curvatura rms κ médios para as FAC está mostrado nas *Figuras 5.2 e 5.3*, respectivamente. Em ambos os casos, o decaimento das funções pode ser ajustado satisfatoriamente por exponenciais simples,

$$F_t(t) \approx A_0 e^{-\frac{t}{\tau}} + B_0 \quad (5.1)$$

e

$$F_e(\rho) \approx A_0 e^{-\frac{\rho}{\xi}} + B_0, \quad (5.2)$$

onde $A_0 = \langle \kappa^2 \rangle$ e B_0 é uma constante de *offset*.

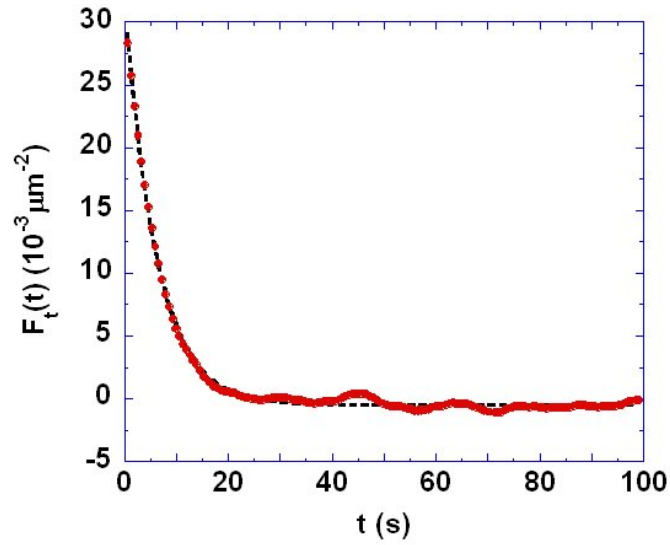


Figura 5.2: Comportamento típico da função de autocorrelação temporal $F_t(t)$. O tempo de relaxação τ e a curvatura rms κ médios para as FAC são determinados ajustando-se a curva obtida pela *Equação 5.1*. Para este gráfico, $\tau = 6 \text{ s}$, $\kappa = 0,18 \mu\text{m}^{-1}$ e $B_0 = -5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^{-2}$.

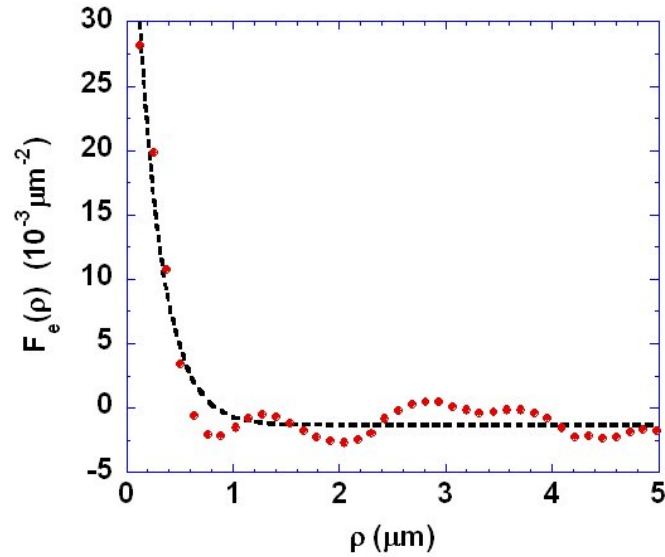


Figura 5.3: Comportamento típico da função de autocorrelação espacial $F_e(\rho)$. O comprimento de correlação ξ e a curvatura rms κ médios para as FAC são determinados ajustando-se a curva obtida pela *Equação 5.2*. Para este gráfico, $\xi = 0,23 \mu\text{m}$, $\kappa = 0,23 \mu\text{m}^{-1}$ e $B_0 = -1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^{-2}$.

Os valores médios de τ , ξ e κ obtidos a partir da análise das funções de correlação temporal e espacial da membrana de macrófagos mantidos a 37°C são mostrados na *Tabela 5.1*. É importante notarmos que o valor médio obtido para o comprimento de correlação ξ , que tomamos como uma estimativa da extensão média individual das FAC, é da mesma ordem da resolução óptica da objetiva utilizada nos experimentos ($\approx 0,26 \mu\text{m}$). Assim sendo, o valor de ξ obtido da função de autocorrelação espacial $F_e(\rho)$ deve ser interpretado como um limite superior para a extensão linear individual das FAC.

τ (s)	ξ (μm)	κ (μm^{-1})	B_0 ($10^{-4} \mu\text{m}^{-2}$)
7 ± 2	$0,23 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,13$	$-1,3 \pm 0,7$

Tabela 5.1: Características das FAC a 37°C obtidas a partir da análise do comportamento das funções $F_t(t)$ e $F_e(\rho)$. Foram analisadas 60 funções de autocorrelação, obtidas a partir de 15 macrófagos distintos.

5.1.2 Ruffles

Os ruffles formados na membrana das células são normalmente classificados em dois tipos, de acordo com sua região de origem: ruffles de borda e ruffles dorsais [14,30]. Os ruffles de borda, originados a partir da retração de lamelipódios não-aderentes, formam estruturas lineares que acompanham a borda da célula e tendem a se mover em direção ao seu centro. Os ruffles dorsais, que incluem todos os outros ruffles não originários de lamellipódios, formam estruturas desordenadas, posicionadas de maneira aleatória na membrana, sendo comumente associados à atividade macropinocitótica.

Os ruffles caracterizados neste estudo apresentaram dois tipos de perfil de curvatura, independentemente de sua origem: o perfil hiperbólico, mostrado na *Figura 5.4*, e o perfil gaussiano, mostrado na *Figura 5.5*. Uma vez que estamos considerando a curvatura da superfície da membrana como sendo aproximadamente igual ao Laplaciano de sua forma, podemos definir o formato dos ruffles como sendo dado, aproximadamente, por quaisquer funções cujo Laplaciano corresponda aos perfis de curvatura observados.

Para definir o formato dos ruffles com perfil de curvatura do tipo hiperbólico, escolhamos a família de funções

$$h_{hyp}(x) = \frac{h_0}{2} \left[1 + \tanh \left(\frac{(x - x_0)}{w} \right) + a(x - x_0) + b \right], \quad (5.3)$$

onde os parâmetros h_0 e w representam, respectivamente, a altura e largura do ruffle, x_0 é a posição de seu centro e a e b são constantes*, e cujo Laplaciano

$$\nabla^2 h_{hyp}(x) = \frac{h_0}{w^2} \tanh \left(\frac{(x - x_0)}{w} \right) \left[\tanh^2 \left(\frac{(x - x_0)}{w} \right) - 1 \right] \quad (5.4)$$

pode ser ajustado ao tipo de perfil mostrado na *Figura 5.4*.

Analogamente, definimos o formato dos ruffles com perfil de curvatura do tipo gaussiano a partir da família de funções

$$h_{gauss}(x) = h_0 \left[e^{-(x-x_0)^2/2w^2} + a(x - x_0) + b \right], \quad (5.5)$$

cujo Laplaciano

$$\nabla^2 h_{gauss}(x) = \frac{h_0}{w^2} e^{-(x-x_0)^2/2w^2} \left[\frac{(x - x_0)^2}{w^2} - 1 \right] \quad (5.6)$$

pode ser ajustado ao tipo de perfil mostrado na *Figura 5.5*.

A partir do ajuste dos perfis de curvatura dos ruffles determinamos os valores de h_0 e w para cada ruffle analisado. Entretanto, não é possível determinar os valores de a e b , uma vez que o Laplaciano de uma função, que é de fato o que medimos, não carrega nenhuma informação sobre a inclinação ou sobre a linha de base da função original. Ainda assim, podemos ter uma boa idéia do formato aproximado de cada um dos tipos de ruffle observados desprezando tanto a inclinação quanto a linha de base da membrana, isto é, assumindo $a \rightarrow 0$ e $b \rightarrow 0$. O formato aproximado de cada ruffle pode ser então obtido integrando-se duas vezes o Laplaciano ajustado, empregando condição inicial nula a cada integração. Exemplos dos formato típico aproximado dos ruffles correspondentes aos perfis de curvatura mostrados nas *Figuras 5.4 e 5.5* podem ser vistos nas *Figuras 5.6 e 5.7*, respectivamente.

*As constantes a e b correspondem, respectivamente, à inclinação e à altura em relação à superfície de vidro da amostra do plano da membrana que contém os ruffles.

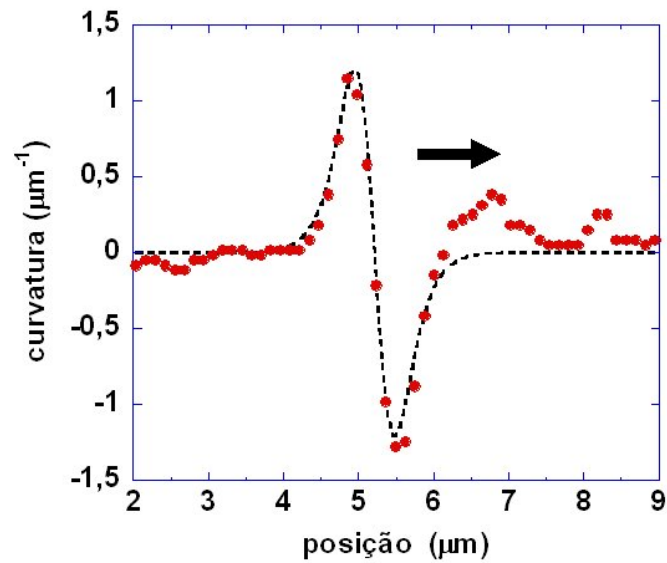


Figura 5.4: Perfil de curvatura do tipo hiperbólico. A altura h_0 e a largura w do ruffle correspondente são determinadas ajustando-se o perfil obtido pela Equação 5.4. Para este perfil, $h_0 = 0,5 \mu\text{m}$, $w = 0,4 \mu\text{m}$ e $x_0 = 5,2 \mu\text{m}$. A seta indica a direção e o sentido do movimento do perfil.

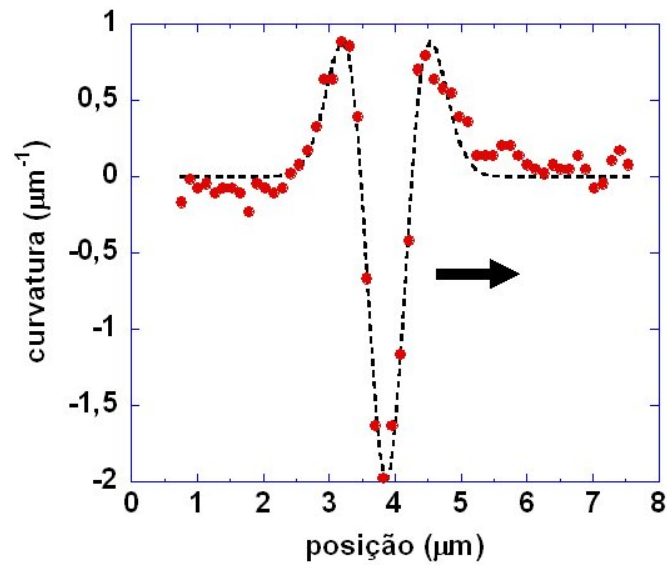


Figura 5.5: Perfis de curvatura do tipo gaussiano. A altura h_0 e a largura w do ruffle correspondente são determinadas ajustando-se o perfil obtido pela Equação 5.6. Para este perfil, $h_0 = 0,3 \mu\text{m}$, $w = 0,4 \mu\text{m}$ e $x_0 = 3,9 \mu\text{m}$. A seta indica a direção e o sentido do movimento do perfil.

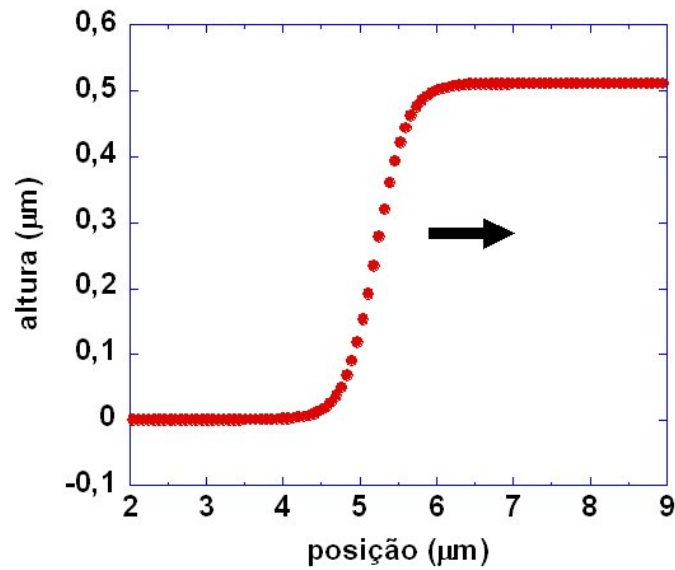


Figura 5.6: Formato aproximado dos ruffles de perfil hiperbólico. Esta curva foi obtida integrando-se duas vezes o perfil mostrado na *Figura 5.4*, com condição inicial nula a cada integração. A seta indica a direção e o sentido do movimento da estrutura.

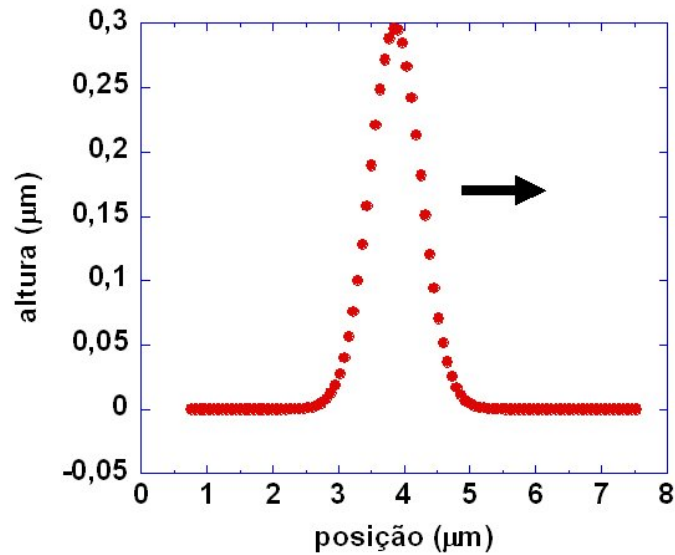


Figura 5.7: Formato aproximado dos ruffles de perfil gaussiano. Esta curva foi obtida integrando-se duas vezes o perfil mostrado na *Figura 5.5*, com condição inicial nula a cada integração. A seta indica a direção e o sentido do movimento da estrutura.

O acompanhamento ao longo do tempo da evolução dos perfis de curvatura dos ruffles mostrou que grande parte deles aparece inicialmente na forma hiperbólica, crescendo em amplitude e evoluindo para a forma gaussiana ao se distanciar da borda da célula para se dissipar na membrana. Os dois tipos de perfil de curvatura também foram observados, no mesmo instante, ao longo do comprimento do mesmo ruffle.

Os valores médios obtidos para a altura h_0 , a largura w , o comprimento L sobre a superfície da membrana, a velocidade de propagação v e a frequência $f q$ de ocorrência dos ruffles são dados na *Tabela 5.2*. O valor da frequência $f q$ se refere ao número de ruffles formado na mesma região da membrana a cada minuto e não ao número total de ruffles formado em toda a célula. A área considerada neste tipo de análise corresponde, usualmente, a cerca de um quarto da área total de membrana espalhada.

h_0 (μm)	w (μm)	L (μm)	v ($\mu m/min$)	$f q$ (ruffles/min)
$0,5 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	13 ± 4	6 ± 2	$0,5 \pm 0,2$

Tabela 5.2: Características médias dos ruffles a $37^\circ C$. Os valores mostrados se referem à média para os dois tipos de perfil de curvatura típicos. Foram analisadas 39 estruturas, em 7 macrófagos distintos.

5.1.3 Proporção entre FAC e ruffles

Para determinar a proporção relativa entre as FAC e os ruffles, assumimos que os valores de curvatura presentes na membrana seguem uma distribuição da forma

$$P = \frac{N_0}{\sqrt{2\pi}} \left(\frac{e^{-\frac{(\kappa-\sigma_0)^2}{2\sigma^2}}}{\sigma} + \chi \frac{e^{-\frac{(\kappa-\mu_0)^2}{2\mu^2}}}{\mu} \right), \quad (5.7)$$

onde as duas gaussianas representam a distribuição das curvaturas geradas pelas FAC e pelos ruffles, respectivamente. A proporção relativa entre as duas distribuições é dada pelo parâmetro χ . As larguras σ e μ representam a raiz da curvatura quadrática média de cada tipo de flutuação, avaliada em toda a área de membrana disponível para análise. A constante N_0 repre-

senta o número total de pontos considerado na estatística. O centro de cada distribuição é dado pelos parâmetros σ_0 e μ_0 .

Embora os histogramas de curvatura obtidos das amostras possam ser ajustados diretamente pela *Equação 5.7*, optamos por ajustar o logaritmo natural dos histogramas ao logaritmo natural da *Equação 5.7*, obtendo assim um ajuste bem mais preciso. Um exemplo típico da distribuição das curvaturas obtida, já na forma utilizada para o ajuste, é mostrado na *Figura 5.8*.

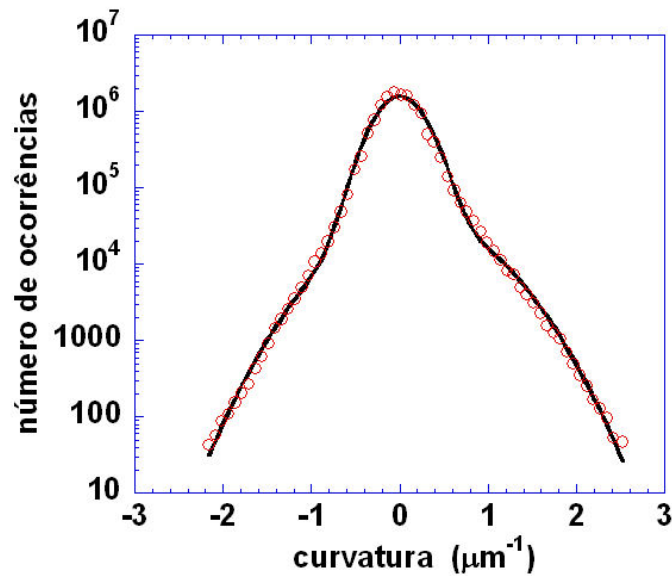


Figura 5.8: Distribuição das curvaturas da membrana a 37°C . A proporção relativa entre FAC e ruffles, dada pelo parâmetro χ , bem como os valores de curvatura médios σ e μ característicos cada tipo de flutuação são determinados ajustando-se as curvas obtidas pelo logaritmo natural da *Equação 5.7*. Para esta curva, $\xi = 0,024$, $\sigma = 0,25 \mu\text{m}^{-1}$, $\mu = 0,61 \mu\text{m}^{-1}$, $\sigma_0 = 0,00 \mu\text{m}^{-1}$ e $\mu_0 = 0,17 \mu\text{m}^{-1}$.

Os valores médios obtidos para a proporção χ entre FAC e ruffles, a curvatura média σ característica das FAC e a curvatura média μ característica dos ruffles são dados na *Tabela 5.3*. Os dados obtidos mostram que, a 37°C , os ruffles representam em torno de $3 \pm 2\%$ das flutuações de curvatura da membrana.

χ	σ (μm^{-1})	μ (μm^{-1})	σ_0 (μm^{-1})	μ_0 (μm^{-1})
$0,03 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,1$	$-0,01 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,2$

Tabela 5.3: Parâmetros característicos da distribuição das curvaturas da membrana a $37^\circ C$. Foram analisados 14 histogramas de curvatura, de 11 macrófagos distintos.

5.2 Efeito de Fármacos e Tratamentos Diversos Sobre as Flutuações de Curvatura a $37^\circ C$

Durante o decorrer deste trabalho, foram realizados diversos experimentos envolvendo a adição de fármacos às amostras, a fim de observar seus efeitos sobre o comportamento dos macrófagos e das estruturas formadas em sua membrana. Boa parte destes experimentos foi realizada antes que a necessidade de calibração do sistema de vídeomicroscopia fosse detectada. Uma vez que, para os experimentos realizados durante este período inicial, os ajustes dos controles da câmera, constantemente alterados a cada experimento, foram ignorados, não pudemos estabelecer uma comparação direta entre a escala das curvaturas obtidas para estes experimentos e as medidas realizadas após a calibração do sistema de vídeomicroscopia. Nestes casos, a avaliação dos efeitos dos fármacos foi baseada nas mudanças dos fatores independentes da escala das curvaturas observadas em cada célula estudada, tais como o tempo de relaxação médio τ das FAC, a velocidade média v de propagação dos ruffles e a proporção relativa χ média entre FAC e ruffles.

Os macrófagos foram inicialmente submetidos a tratamentos com: *lipopolisacarídeos* (LPS), componente comum da membrana de muitas bactérias; *azida sódica* (Az) e *n-Benzoil-D-glucosamina* (NBG), inibidores das vias de energia celulares; e *2,3-butanedione monoxine* (BDM), inibidor de miosina; Neste período também foram feitos experimentos mantendo os macrófagos à temperatura ambiente ($TA \approx 26^\circ C$).

Em experimentos mais recentes, realizados após a calibração do sistema de vídeomicroscopia, utilizamos *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA), que estimula a macropinocitose e o aumento na área de membrana celular espalhada sobre a superfície da amostra. O efeito da eliminação do fator de

crescimento (CSF) do meio de cultura das células 24 horas antes da realização dos experimentos também foi avaliado.

A concentração em que cada fármaco foi utilizado, já considerando sua diluição no meio de cultura das amostras, é dada na *Tabela 5.4*. Em todos os casos, o comportamento dos macrófagos foi monitorado no período entre 0 e 30 minutos após a adição do fármaco à amostra.

LPS	Az	NBG	BDM	PMA
$0,5 \mu\text{g/ml}$	5 mM	40 mM	25 mM	$0,2 \mu\text{M}$

Tabela 5.4: Concentrações finais dos fármacos utilizados nos experimentos.

Os resultados obtidos para os parâmetros de comparação adotados são dados, para cada fármaco e tratamento utilizado, na *Tabela 5.5*.

	LPS	Az	NBG	BDM
$\tau (s)$	8 ± 2	6 ± 2	8 ± 2	14 ± 2
$v (\mu\text{m}/\text{min})$	$3,5 \pm 0.8$	5 ± 1	5 ± 1	2 ± 1
$\chi (\%)$	4 ± 2	3 ± 2	3 ± 2	4 ± 2

	PMA	TA	-CSF	NT
$\tau (s)$	11 ± 4	35 ± 14	7 ± 2	7 ± 2
$v (\mu\text{m}/\text{min})$	3 ± 1	$1,4 \pm 0.5$	4 ± 1	6 ± 2
$\chi (\%)$	3 ± 2	3 ± 1	5 ± 3	3 ± 2

Tabela 5.5: Resultados obtidos para o tempo de relaxação médio τ das FAC, a velocidade média v de propagação dos ruffles e a proporção χ média entre FAC e ruffles para macrófagos submetidos à ação de fármacos e outros tratamentos. Os valores listados na última coluna referem-se aos resultados obtidos para macrófagos submetidos a nenhum tratamento (NT), utilizados como controle. Foram analisadas 156 funções de autocorrelação (38 macrófagos), 66 medidas de velocidade de propagação de ruffles (17 macrófagos) e 51 histogramas de curvatura (32 macrófagos).

Além dos parâmetros dados na *Tabela 5.5*, no caso dos experimentos envolvendo a adição de PMA às amostras e também a eliminação do fator

de crescimento (CSF) do meio de cultura após a diferenciação das células, ambos realizados após a calibração do sistema de vídeomicroscopia, o estabelecimento de uma escala de curvaturas comum permitiu a avaliação quantitativa de mudanças nas características dos ruffles, bem como nas curvaturas médias típicas σ e μ geradas pelas FAC e pelos ruffles, respectivamente, em relação ao comportamento observado nos macrófagos de controle (NT). As características médias obtidas para os ruffles nestes casos são mostradas na *Tabela 5.6*. Os resultados obtidos para as curvaturas médias características de FAC e ruffles, obtidos através da análise da distribuição das curvaturas, são mostrados na *Tabela 5.7*.

	h (μm)	w (μm)	L μm	v ($\mu m/min$)	$f q$ (<i>ruffles/min</i>)
PMA	$0,3 \pm 0,1$	$0,27 \pm 0,04$	12 ± 4	3 ± 1	$0,5 \pm 0,2$
-CSF	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	12 ± 3	4 ± 1	$0,5 \pm 0,2$
NT	$0,5 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	13 ± 4	6 ± 2	$0,5 \pm 0,2$

Tabela 5.6: Características médias dos *ruffles* a $37^\circ C$ em macrófagos tratados com PMA e macrófagos privados de CSF. Os valores mostrados se referem à média para os dois tipos de perfil de curvatura típicos. Os valores listados na última linha referem-se aos resultados obtidos para macrófagos submetidos a nenhum tratamento (NT), utilizados como controle. Foram analisadas 87 estruturas, em 16 macrófagos distintos.

	PMA	-CSF	NT
σ (μm^{-1})	$0,22 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,04$
μ (μm^{-1})	$0,47 \pm 0,08$	$0,60 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,1$

Tabela 5.7: Curvaturas médias típicas geradas pelas FAC (σ) e pelos ruffles (μ) a $37^\circ C$ em macrófagos tratados com PMA e macrófagos privados de CSF. Os valores listados na última coluna referem-se aos resultados obtidos para macrófagos submetidos a nenhum tratamento (NT), utilizados como controle. Foram analisados 24 histogramas de curvatura, obtidos de 20 macrófagos distintos.

Em todos os casos estudados, o valor do comprimento de correlação ξ

extraído da função de autocorrelação espacial $F_e(\rho)$, que tomamos como uma estimativa da extensão média individual das FAC, se manteve em torno do valor obtido para os macrófagos de controle, $\xi = 0,23 \pm 0,04 \mu m$.

5.3 Efeito de Mudanças na Temperatura Sobre as Flutuações de Curvatura

Os resultados mostrados na seção anterior mostram que, dentre todos os fármacos e tratamentos a que os macrófagos foram submetidos, somente foram detectadas alterações nos parâmetros estudados no caso da adição de BDM e PMA, bem como também no caso dos experimentos em temperatura ambiente (*Tabela 5.5*). Por ter gerado uma resposta mais pronunciada, bem como por não envolver a adição de nenhuma substância às amostras durante os experimentos, o estudo dos efeitos da variação de temperatura sobre o comportamento das flutuações de curvatura na membrana dos macrófagos foi priorizado. Os macrófagos foram submetidos a temperaturas na faixa de $24 - 37^\circ C$.

No caso das FAC, não foram detectadas alterações significativas nos valores do comprimento de correlação ξ ou na amplitude de curvatura κ médios na faixa de temperaturas utilizada nos experimentos, em comparação aos valores típicos observados a $37^\circ C$ (*Tabela 5.1*). O mesmo, entretanto, não ocorreu para o tempo de relaxação médio τ , que variou de maneira significativa, crescendo à medida em que a temperatura diminui (*Tabela 5.8*).

Analogamente, para os ruffles, não foram observadas variações no seu comprimento L e em sua largura w em relação aos valores obtidos a $37^\circ C$ (*Tabela 5.2*). Embora a altura h dos ruffles tenha se mantido sem grandes alterações ao passarmos de uma temperatura para outra, seu valor médio foi $h = 0,3 \pm 0,1 \mu m$, apresentando uma ligeira queda em relação ao valor médio observado a $37^\circ C$. A frequência de ocorrência Fq destas estruturas variou de $0,2$ ruffles/min a $24^\circ C$ até $0,5$ ruffles/min a $37^\circ C$, ficando, em média, em torno de $0,3 \pm 0,1$ ruffles/min. Foram analisadas 73 estruturas, em 2 macrófagos distintos, submetidos a 7 diferentes temperaturas, entre $24 - 37^\circ C$. As pequenas mudanças observadas nos valores médios de h e

de f_q são consideradas como de pouca importância, levando-se em conta as barras de erro experimentais. Em contrapartida, a velocidade de propagação v dos ruffles foi afetada de maneira mais pronunciada, diminuindo de maneira gradativa, juntamente com a temperatura (*Tabela 5.8*).

Temperatura ($^{\circ}C$):	24	27	29	31
τ (s):	32 ± 4	25 ± 4	19 ± 3	16 ± 2
v ($\mu m/min$):	$1,0 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$	$2,5 \pm 1,0$

Temperatura ($^{\circ}C$):	33	35	37	—
τ (s):	12 ± 1	$9,4 \pm 1,6$	$7,9 \pm 0,6$	—
v ($\mu m/min$):	$2,6 \pm 1,4$	$3,1 \pm 1,0$	$4,2 \pm 1,0$	—

Tabela 5.8: Tempo de relaxação τ médio das FAC e velocidade de propagação v média dos ruffles em diferentes temperaturas. Foram analisadas 28 funções de autocorrelação e 102 medidas de velocidade de propagação de ruffles, em 2 macrófagos distintos, submetidos às temperaturas dadas.

A análise das mudanças observadas no tempo de relaxação τ das FAC e na velocidade de propagação v dos ruffles em função da temperatura mostrou que, em ambos os casos, o comportamento observado pode ser ajustado por um processo ativado do tipo *Arrhenius*, comumente empregado no cálculo de taxas de reações químicas em função da temperatura, que pode ser descrito por uma equação da forma

$$\Phi(T) = \Phi_0 e^{\pm E_a/k_B T}, \quad (5.8)$$

onde Φ é o parâmetro afetado pela temperatura. A constante E_a , chamada de *energia de ativação*, corresponde à energia necessária à ocorrência do fenômeno que envolve o parâmetro Φ , que neste caso corresponde à energia necessária para a formação das FAC ou para a movimentação dos ruffles. O sinal \pm na *Equação 5.8* indica se o parâmetro em questão cresce ou diminui com o aumento da temperatura. Assim como na análise da distribuição das curvaturas sobre a membrana dos macrófagos, embora o comportamento do tempo de relaxação τ das FAC e da velocidade de propagação v dos ruffles possa ser ajustado diretamente pela *Equação 5.8*, uma melhor visualização

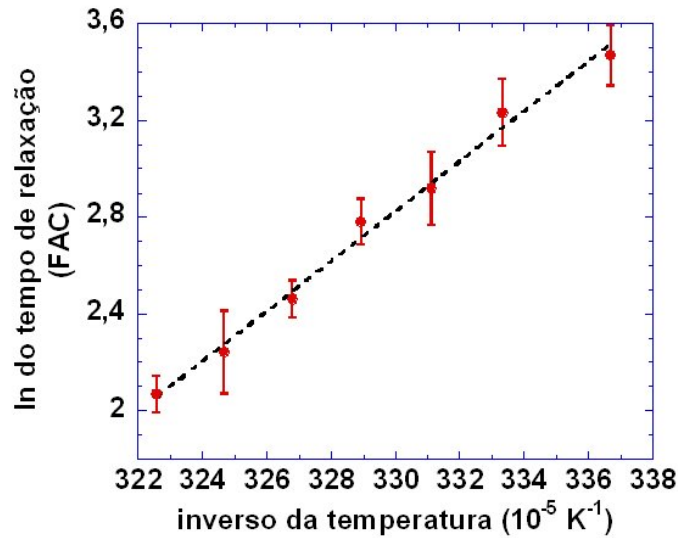


Figura 5.9: Ajuste tipo *Arrhenius* para o comportamento do tempo de relaxação τ das FAC em função da temperatura. A energia de ativação obtida foi $E_a = 33 \pm 2 k_B T$.

dos dados pode ser obtida tomando-se o logaritmo natural dos valores obtidos experimentalmente e ajustando o resultado pelo logaritmo natural da Equação 5.8, que resulta em retas da forma

$$\ln(\Phi(T)) = \ln(\Phi_0) \pm \frac{E_a}{k_B} \frac{1}{T}. \quad (5.9)$$

Para o tempo de relaxação τ das FAC, o ajuste dos dados experimentais, mostrado na *Figura 5.9*, resultou em uma energia de ativação $E_a = 33 \pm 2 k_B T$ para o processo de formação das FAC. Analogamente, o ajuste dos dados de velocidade de propagação v dos ruffles, mostrado na *Figura 5.10*, resultou em uma energia de ativação $E_a = 36 \pm 5 k_B T$ para o processo de movimentação dos ruffles. Em ambos os casos, o valor de E_a foi avaliado tomando-se como referência a temperatura de $37^\circ C$.

Na análise da distribuição das curvaturas sobre a membrana, tanto as FAC quanto os ruffles mantiveram os mesmos valores para suas curvaturas médias características σ e μ , independentemente da temperatura (*Figura 5.11*). Os valores médios obtidos para a curvatura média típica σ das FAC e μ dos ruffles, calculados sobre todas as temperaturas, foram $\sigma = 0,20 \pm 0,03 \mu m^{-1}$ e $\mu = 0,51 \pm 0,05 \mu m^{-1}$. A proporção relativa χ

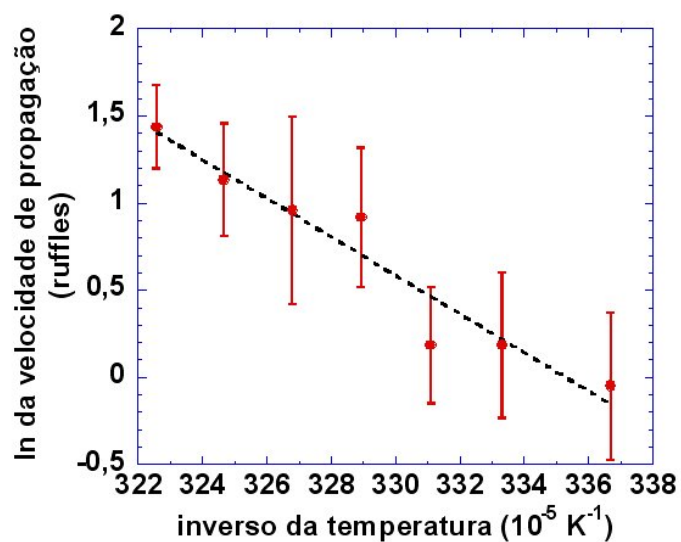


Figura 5.10: Ajuste tipo *Arrhenius* para o comportamento da velocidade de propagação v dos ruffles em função da temperatura. A energia de ativação obtida foi $E_a = 36 \pm 5 k_B T$.

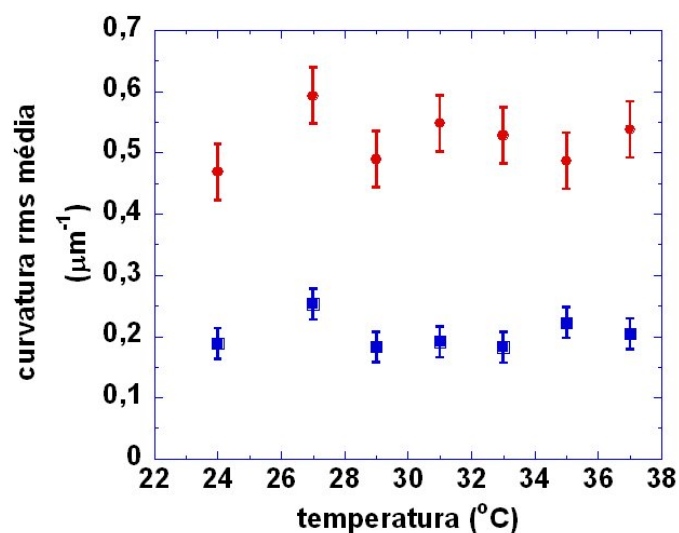


Figura 5.11: Curvaturas rms médias características das FAC (■) e dos ruffles (●) em diferentes temperaturas. Foram analisados 9 histogramas de curvatura, de 2 macrófagos distintos, submetidos às temperaturas dadas.

entre as FAC e os ruffles se manteve praticamente inalterada para todas as temperaturas utilizadas nos experimentos, sendo seu valor médio, calculado sobre todas as temperaturas, igual a $2,7 \pm 0,6 \%$.

5.4 Comportamento das Flutuações de Curvatura Durante Eventos de Fagocitose a 37°C

Durante o processo de fagocitose, a membrana de uma célula fagocítica deve ser capaz de envolver completamente a partícula sendo fagocitada para formar o fagosomo e completar o aprisionamento da partícula em questão. Esta exigência, entretanto, não impõe restrições sobre a quantidade e a intensidade das deformações no formato da membrana da célula fagocítica e nem restringe sua localização, bastando apenas que estas sejam suficientes para sobrepujar a partícula a ser fagocitada. Tal liberdade permite que as células de modo geral realizem o processo de fagocitose de diferentes maneiras [11–14,31–39].

Em nossos experimentos de fagocitose, observamos a existência de dois comportamentos distintos nos macrófagos estudados durante a fagocitose das leishmanias amastigotas (*Figura 5.12*). No comportamento mais comum, correspondente a cerca de 80% dos eventos observados, uma vez que a ingestão do parasita é iniciada, a quantidade de ruffles presentes na membrana aumenta significativamente não apenas na vizinhança imediata do ponto de contato entre o parasita e o macrófago, mas também em uma porção considerável da membrana na região periférica ao fagosomo. Usualmente, a quantidade de ruffles nestas regiões permanece elevada mesmo após o término da ingestão do parasita, retornando ao nível normal, observado antes do contato entre a leishmania e o macrófago, em cerca de 1 – 2 minutos (*Figura 5.13*). Para o outro tipo de comportamento observado, a captura do parasita ocorre sem que haja qualquer alteração da quantidade de ruffles presentes na membrana fora da região de contato entre o parasita e o macrófago. A quantidade de ruffles nas regiões periféricas ao fagosomo em formação permanece em níveis normais, sem nenhuma mudança antes, durante ou depois do evento de fagocitose (*Figura 5.14*).

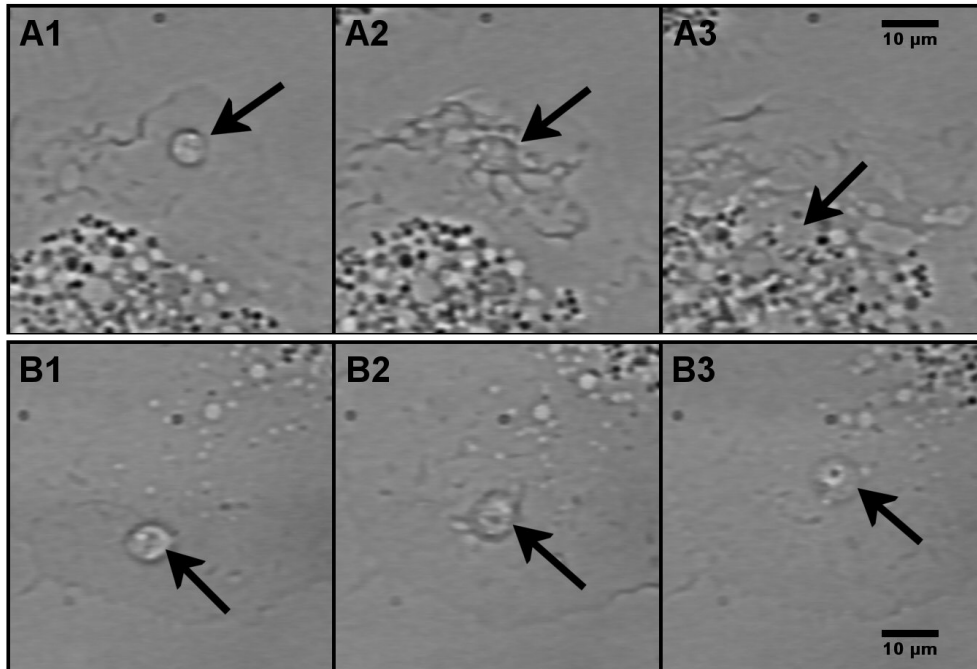


Figura 5.12: A observação do comportamento dos macrófagos mostrou que a fagocitose das leishmanias amastigotas ocorreu de duas formas distintas. (A) Fagocitose com aumento da quantidade de ruffles periféricos ao fagossomo ($\approx 80\%$ dos eventos observados): A1) antes da adesão do parasita, a membrana apresenta uma quantidade normal (baixa) de ruffles. A2) após a adesão do parasita à membrana, a quantidade de ruffles aumenta significativamente em uma grande porção da membrana em torno do fagossomo. A3) cerca de 2 minutos após a ingestão do parasita ter sido completada, a quantidade de ruffles na membrana retorna ao nível normal. (B) Fagocitose com quantidade constante (normal) de ruffles periféricos ao fagossomo ($\approx 20\%$ dos eventos observados): B1) antes da adesão do parasita, a membrana apresenta uma quantidade normal (baixa) de ruffles. B2) após a adesão do parasita, a quantidade de ruffles na vizinhança do fagossomo em formação permanece inalterada. B3) após a ingestão do parasita ter sido completada, a quantidade de ruffles sobre a membrana permanece inalterada. As setas indicam a posição do parasita.

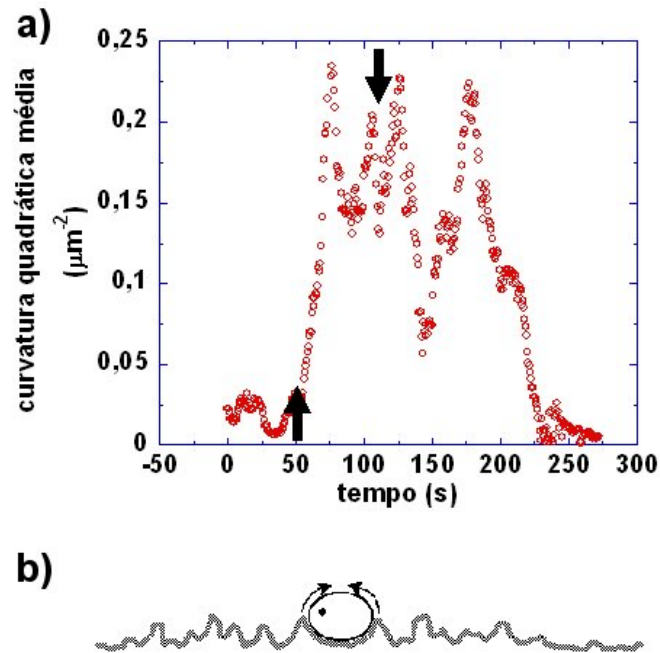


Figura 5.13: a) Evolução temporal da curvatura quadrática média da membrana do macrófago na região periférica ao fagossomo em um evento de fagocitose em que há aumento na quantidade de ruffles ($\approx 80\%$ dos eventos observados). O parasita é totalmente internalizado em ≈ 60 s. A quantidade de ruffles na membrana retornou aos níveis normais em cerca de 2 minutos após o término da ingestão do parasita. As setas indicam o instante em que a fagocitose foi iniciada (seta para cima) e terminada (seta para baixo). b) Diagrama idealizado mostrando a conformação da membrana em torno do fagossomo em um evento de fagocitose em que há aumento na quantidade de ruffles. O parasita (centro) é internalizado à medida em que a membrana adere à sua superfície e se fecha ao seu redor (setas). Uma grande quantidade de ruffles está presente em todas as direções.

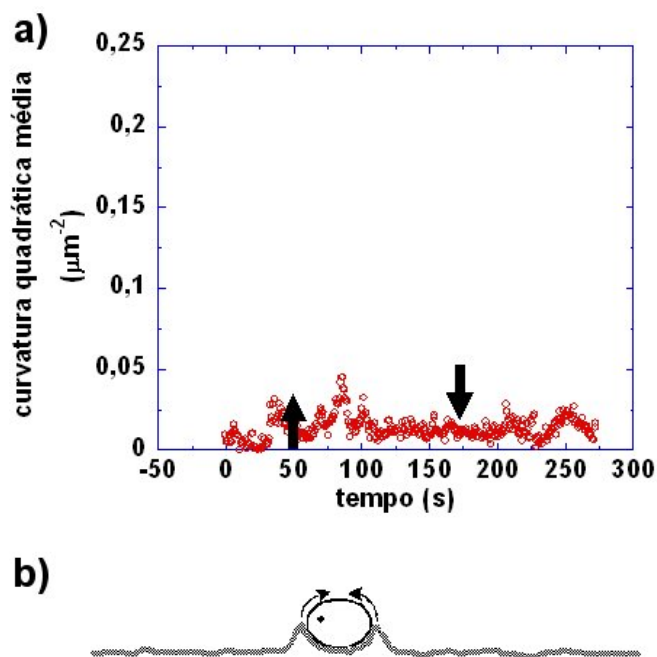


Figura 5.14: a) Evolução temporal da curvatura quadrática média da membrana do macrófago na região periférica ao fagossomo em um evento de fagocitose em que não há alteração na quantidade de ruffles na membrana fora da região de contato entre o parasita e o macrófago ($\approx 20\%$ dos eventos observados). O parasita é totalmente internalizado em ≈ 120 s. A quantidade de ruffles na região periférica ao fagossomo permaneceu inalterada antes, durante e após a conclusão da fagocitose. As setas indicam o instante em que a fagocitose foi iniciada (seta para cima) e terminada (seta para baixo). b) Diagrama idealizado mostrando a conformação da membrana em torno do fagossomo em um evento de fagocitose em que não há alteração na quantidade de ruffles da membrana fora da região de contato entre o parasita e o macrófago. Não há formação de ruffles em nenhuma direção fora da zona de contato entre o parasita e o macrófago.

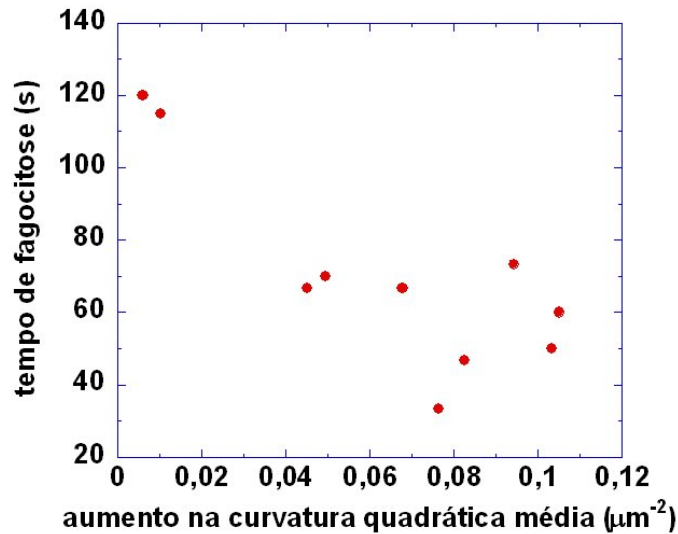


Figura 5.15: Tempo de fagocitose em função do aumento observado na curvatura quadrática média da região da membrana periférica ao fagossomo. Os eventos onde há aumento na quantidade de ruffles são concluídos em um tempo menor em comparação aos eventos em que não há alteração na quantidade de ruffles fora da região de contato entre o parasita e o macrófago.

O acompanhamento do tempo de fagocitose em cada tipo de comportamento mostrou que os eventos em que não há aumento no número de ruffles presentes na membrana levam aproximadamente duas vezes mais tempo para serem concluídos, em comparação aos eventos em que há aumento na quantidade de ruffles (*Figura 5.15*).

5.5 Efeito de Mudanças na Temperatura Sobre o Processo de Fagocitose

O abaixamento da temperatura pode ser usado como um método reversível para inibir a fagocitose sem a necessidade do uso de fármacos cujos efeitos colaterais podem afetar o funcionamento normal da célula [35].

Assim como nos experimentos para determinação dos efeitos da mudança da temperatura sobre as flutuações de curvatura, os macrófagos foram submetidos a temperaturas entre $24 - 37^\circ\text{C}$, intervalo este situado ligeiramente

acima do limiar crítico de $18 - 21^\circ C$ abaixo do qual a atividade fagocítica das células é bastante reduzida [31,32,40].

A redução da temperatura causou um aumento considerável no tempo de ingestão dos parasitas, conforme mostrado na *Tabela 5.9*. Os poucos eventos observados ocorreram de acordo com o comportamento mais comum (e tipicamente mais rápido) observado durante os experimentos realizados a $37^\circ C$, onde a quantidade de ruffles em toda a região da membrana periférica ao fagossomo em formação cresce significativamente.

Assim como o tempo de relaxação τ das FAC e a velocidade de propagação v dos ruffles, o comportamento do tempo de fagocitose em função da temperatura pode ser ajustado por um processo ativado do tipo *Arrhenius*. O ajuste dos dados do tempo de fagocitose, mostrado na *Figura 5.16*, resultou em uma energia de ativação $E_a = 38 \pm 4 k_B T$ para o processo de internalização dos parasitas pelos macrófagos.

Temperatura ($^\circ C$):	24	30	37
Tempo de fagocitose (s):	300 ± 60	140 ± 14	58 ± 13

Tabela 5.9: Tempo de fagocitose dos parasitas em diferentes temperaturas. Foram analisados 3 eventos de fagocitose a $24^\circ C$, 2 eventos a $30^\circ C$ e 8 eventos a $37^\circ C$. Cada um dos eventos analisados foi observado em macrófagos distintos, num total de 13.

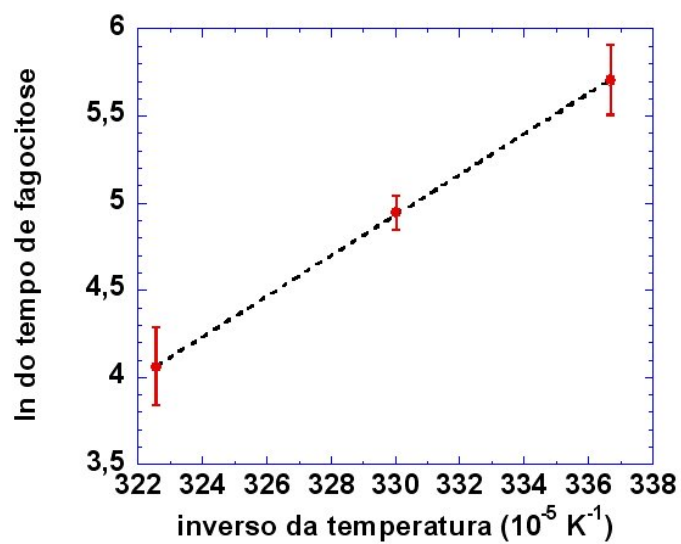


Figura 5.16: Ajuste tipo *Arrhenius* para o comportamento do tempo de fagocitose em função da temperatura. A energia de ativação obtida foi $E_a = 38 \pm 4 k_B T$.

Capítulo 6

Discussão dos Resultados Obtidos

6.1 Sobre as características de FAC e ruffles a $37^{\circ}C$

As pequenas flutuações aleatórias de curvatura (FAC) observadas na membrana dos macrófagos estudados neste trabalho apresentaram as seguintes características principais:

- Estão presentes em toda a membrana, de maneira uniforme, em todos os instantes;
- Apresentam um tempo de relaxação τ médio em torno de $7 \pm 2 s$ a $37^{\circ}C$;
- Apresentam uma curvatura rms κ média em torno de $0,24 \pm 0,12 \mu m^{-1}$ e uma extensão média máxima ξ estimada em torno de $0,23 \pm 0,04 \mu m$;

A ocorrência de flutuações de membrana com características similares já foi reportada em diversos tipos celulares distintos, incluindo eritrócitos, linfócitos, fibroblastos, monócitos e cardiomiócitos [41–43], o que sugere que este tipo de comportamento possa ser algo comum a todas as células eucariotas. Em todos os casos estudados, os resultados apresentados indicam que as flutuações individuais deste tipo estão sempre confinadas a uma área da ordem de $0,2 \mu m^2$, possuindo, portanto, dimensões lineares da ordem de $0,4 \mu m$. Este valor é compatível com os $0,23 \mu m$ estimados para a extensão média

das FAC a partir da função de autocorrelação espacial $F_e(\rho)$, que também sugere a independência estatística entre as flutuações individuais ocorrendo em cada um destes domínios. A concordância entre estes resultados suporta a idéia de que a membrana celular mantém conexões com o citoesqueleto de actina, situado logo abaixo, separadas entre si por distâncias em torno de $0,2 - 0,3 \mu m$, resultando em um certo grau de compartimentalização bi-dimensional da membrana, como demonstrado por Fujiwara *et al.* [26], e levando ao confinamento de pequenas flutuações como as FAC.

Se considerarmos a curvatura média κ observada como sendo a curvatura correspondente ao modo de oscilação de menor número de onda angular q possível para flutuações confinadas em regiões com extensão linear ξ , podemos estimar a amplitude rms aproximada a_0 das FAC pela relação

$$\kappa \approx \left(\frac{q_x^2}{2} + \frac{q_y^2}{2} \right) a_0, \quad (6.1)$$

onde $q_x = q_y = \pi/\xi$, obtendo $a_0 \approx 1,3 nm$. O valor de pico para a amplitude estimada das FAC é então $\sqrt{2}a_0 \approx 1,8 nm$. Este resultado mostra que a amplitude de pico das FAC equivale, aproximadamente, à distância necessária para permitir a adição de um monômero à extremidade dos filamentos de actina que se encontram próximos à membrana, da ordem de $2,2 nm$, conforme previsto pelos modelos mecano-estatísticos de motilidade celular baseados na polimerização de actina, resumidos no Capítulo 3. Assim sendo, é razoável concluir que as FAC podem ser o reflexo da contínua adição e remoção de um monômero de actina à extremidade dos filamentos próximos à membrana, hipótese que explicaria tanto a sua pequena amplitude quanto a sua presença uniforme por toda a membrana. É interessante perceber que, embora ainda não exista um modelo molecular dedicado à descrição de flutuações como as FAC, o fato de que os modelos de motilidade celular resumidos no Capítulo 3, idealizados originalmente para descrever o mecanismo empregado pelas células eucariotas para gerar movimento líquido direcionado, e cujas previsões não incluem a análise de flutuações, uma vez que estas produzem movimentação líquida nula, podem ser aplicados na descrição de flutuações como as FAC torna possível especularmos que a construção de um modelo para este tipo de flutuação deve partir do mesmo princípio: a polimerização de actina.

A energia associada à curvatura da membrana é dada por [44–46]

$$\mathcal{H} = \frac{K_c}{2} \int \kappa^2 dA, \quad (6.2)$$

onde a constante K_c é o módulo de curvatura da membrana. Se, novamente, considerarmos o valor da curvatura rms média κ obtido durante os experimentos como aproximadamente correspondente à curvatura média do modo de oscilação de menor número de onda angular q possível para flutuações confinadas em regiões com extensão linear ξ , podemos, uma vez que estamos considerando apenas um único modo de oscilação, aplicar o princípio da equipartição da energia à *Equação 6.2*, obtendo

$$\frac{k_B T}{2} = \frac{K_c}{2} \kappa^2 \xi^2. \quad (6.3)$$

Com a substituição dos valores obtidos experimentalmente para κ e ξ , podemos calcular o valor do módulo de curvatura da membrana dos macrófagos, obtendo $K_c \approx 1.4 \times 10^{-18} J$. Este valor é compatível com os módulos de curvatura obtidos para a membrana de outras células eucariotas nucleadas, como neutrófilos e células amebóides [47,48]. A diferença entre o valor de K_c obtido para os macrófagos e os valores típicos obtidos para vesículas lipoprotéicas artificiais de dupla camada e células eucariotas não nucleadas, como eritrócitos, para as quais K_c é da ordem de $10^{-19} J$ [45,47,49], pode ser interpretada como efeito de uma maior interação do citoesqueleto com a membrana em células como os macrófagos, o que levaria à observação de um módulo de curvatura efetivo maior em células deste tipo.

O tempo de relaxação médio τ das FAC está ligado à viscosidade η percebida pela membrana pela relação [50]

$$\tau \approx \frac{4\pi\eta}{K_c q^3}. \quad (6.4)$$

A partir da *Equação 6.4* e dos valores de τ , ξ e K_c obtidos para os macrófagos, podemos estimar a viscosidade efetiva sentida por sua membrana ao deslocar seu citoplasma, obtendo $\eta \approx 1994 Pa s$. O valor obtido é compatível com as viscosidades estimadas do citoplasma de células semelhantes aos macrófagos, obtidas a partir da observação do comportamento dinâmico de partículas com tamanhos na escala de $1 \mu m$ colocadas dentro das células, que

varia em torno de $1 - 3 \times 10^3 \text{ Pa s}$ [51–54]. É importante notar que, em geral, os experimentos de investigação da viscosidade do citoplasma celular *in vivo* se baseiam na inserção de algum tipo de sonda, usualmente partículas magnéticas, dentro ou em contato direto com a célula, produzindo resultados que variam consideravelmente de acordo com o tamanho das partículas empregadas como sonda, mesmo para células similares [51,52,54,55]. Como o método que empregamos neste trabalho não exige qualquer perturbação, intervenção ou ainda a adição de qualquer material às células, podemos supor que o resultado obtido reflete com maior fidelidade a viscosidade do citoplasma do macrófago em relação à sua membrana.

As grandes flutuações de curvatura observadas na membrana dos macrófagos, conhecidas genericamente como ruffles, apresentaram as seguintes características principais:

- Ocorrem de maneira localizada, ocupando regiões definidas, próximas as bordas da célula e também sobre a porção dorsal da membrana;
- Propagam-se sobre a membrana, movendo-se preferencialmente da borda para o centro da célula a uma velocidade v em torno de $6 \pm 2 \mu\text{m}/\text{s}$ a 37°C ;
- Apresentam uma curvatura rms média em torno de $0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}^{-1}$, com valores de pico de até $2 \mu\text{m}^{-1}$;
- Apresentam dimensões lineares médias da ordem de $0.4 \mu\text{m}$ de largura, $13 \mu\text{m}$ de comprimento e $0.5 \mu\text{m}$ de altura;

Mesmo se tratando de estruturas que vem sendo observadas durante os últimos 30 anos [7], poucos dados quantitativos sobre o comportamento e as características *in vivo* dos ruffles podem ser encontrados na literatura, onde a informação predominante trata apenas de sua associação qualitativa a processos como a macropinocitose e a fagocitose [11–14]. Ainda assim, apesar da relativa escassez de dados comparativos, os resultados obtidos para as características dos ruffles se encontram dentro da mesma faixa de valores obtida por outras técnicas para diversos tipos celulares [56–58]. Mais uma vez, assim como no caso das FAC, é interessante percebermos que, embora

ainda não haja um modelo capaz de explicar os mecanismos exatos envolvidos na formação e dissipação dos ruffles, a velocidade média obtida para sua propagação a $37^{\circ}C$, $v = (6 \pm 2)\mu m/min$, é da mesma ordem das velocidades de movimentação celular previstas pelos modelos de motilidade celular resumidos no Capítulo 3, da ordem de $0.05 - 0.5\mu m/s$, o que indica a existência de uma conexão entre os modelos de motilidade celular baseados na polimerização de actina e um modelo completo para a dinâmica dos ruffles

6.2 Fármacos e tratamentos diversos

Ao iniciarmos o trabalho com os macrófagos, esperávamos ser capazes de observar alterações significativas em seu comportamento em relação às características das estruturas formadas em sua membrana, provocadas pela adição de fármacos que afetam aspectos específicos da fisiologia celular ao meio de cultura. Tendo realizado experimentos com diversos fármacos (LPS, Az, NBG, BDM e PMA) e também com outros tratamentos, entre eles a diminuição da temperatura, os resultados obtidos para os fármacos utilizados mostraram pouca ou nenhuma alteração nos parâmetros avaliados, indicando pouca ou mesmo nenhuma influência sobre a motilidade do citoesqueleto. O fato de que experimentos similares [27,28] utilizando *cytochalasina D*, fármaco que afeta especificamente a polimerização de actina, permitiram a observação de mudanças bastante significativas no comportamento das FAC e dos ruffles, reforça esta indicação, ao mesmo tempo em que relaciona, uma vez mais, estes tipos de flutuação à polimerização de actina.

6.3 Relação entre ruffles e o processo de fagocitose

Através do uso combinado das técnicas de microscopia de desfocalização e de pinçamento óptico, pudemos, nesta parte de nosso trabalho, provocar e acompanhar, de maneira individual e em tempo real, a fagocitose de leishmanias amastigotas pelos macrófagos. Os experimentos realizados permitiram a identificação de duas formas distintas de fagocitose das leishmanias, am-

bas ocorrendo sob as mesmas condições experimentais, tanto em relação aos macrófagos quanto aos parasitas. A análise quantitativa de cada um dos tipos de evento de fagocitose observados mostrou que a internalização das leishmanias parece ocorrer de maneira mais rápida quando a quantidade de ruffles na região periférica ao ponto de contato entre o parasita e o macrófago cresce em relação ao valor observado antes do início da fagocitose. Este tipo de comportamento parece indicar que os ruffles são capazes de atuar como catalisadores do processo de internalização do parasita, acelerando-o.

Uma vez que a *Leishmania* é um parasita obrigatoriamente intracelular que se reproduz dentro de *fagolisosomos** de macrófagos de mamíferos hospedeiros [59,60], é possível que o aumento observado na quantidade de ruffles possa ser induzido pelo parasita, como parte de uma estratégia para acelerar sua internalização e facilitar a infecção de novas células, assim como fazem outros parasitas intracelulares [11,61,62].

De acordo com outros estudos sobre o processo de fagocitose de leishmanias, a internalização de amastigotas por macrófagos é um processo impulsionado pela polimerização de actina, aparentemente mediado por receptores de membrana do tipo Fc. Entretanto, outras formas de entrada, possivelmente associadas a outros tipos de receptores presentes na membrana dos macrófagos, podem existir [63–65]. Assim sendo, é também possível que os dois comportamentos observados neste estudo correspondam a duas rotas de infecção distintas.

O esclarecimento das causas dos dois comportamentos observados, mostrados na *Figura 5.12*, bem como o melhor entendimento dos dados obtidos, mostrados nas *Figuras 5.13, 5.14 e 5.15*, irá, portanto, requerer experimentos mais detalhados.

*Vesícula intracelular formada pela fusão de um fagossomo com vesículas contendo enzimas digestivas (lisosomos).

6.4 A influência da temperatura e a origem comum de FAC, ruffles e do processo de fagocitose

A redução da temperatura teve pouco ou mesmo nenhum efeito sobre a morfologia das flutuações na membrana dos macrófagos. Parâmetros estruturais estáticos, tais como as dimensões médias lineares dos ruffles, as curvaturas típicas de FAC e ruffles, bem como a proporção relativa de ocorrência entre estes dois tipos de flutuação de curvatura permaneceram estáveis dentro da faixa de temperatura empregada nos experimentos, considerando-se as barras de erro experimentais. Estes resultados indicam que tanto o tamanho quanto a quantidade das flutuações ocorrendo na membrana dos macrófagos não foram afetados pela redução da temperatura. Parâmetros dinâmicos das flutuações, entretanto, tais como o tempo de relaxação das FAC, a velocidade de propagação dos ruffles e o tempo de fagocitose dos parasitas estudados, foram alterados de maneira significativa.

O comportamento observado para os dois tipos de parâmetro pode ser explicado ao considerarmos que, embora a taxa de metabolismo dos macrófagos diminua ao reduzirmos a temperatura, conseqüentemente causando a redução de todos os parâmetros dinâmicos estudados, todas as funções celulares principais envolvidas no controle da movimentação da membrana da célula, incluindo a polimerização de actina, permanecem ativas, mantendo, portanto, a estrutura geral das flutuações, conforme indicado pelos resultados experimentais. Desta forma, os dados obtidos suportam a idéia de que tanto as FAC quanto os ruffles são fenômenos diretamente relacionados à atividade dinâmica do citoesqueleto, não podendo, portanto, serem flutuações de origem puramente térmica. De fato, a energia gasta pela célula na formação de um ruffle é estimada como sendo da ordem de 100 vezes a energia térmica disponível [27,28]. No caso das FAC, estudos de flutuações semelhantes em outros tipos celulares também indicam a existência de uma relação entre a dinâmica do citoesqueleto e este tipo de flutuação [42,43,66,67]. Entretanto, os mecanismos exatos envolvidos na formação de flutuações como as FAC e os ruffles ainda permanecem desconhecidos.

Um dos resultados que mais chamou a atenção durante o processo de análise dos dados experimentais foi o fato de que todos os parâmetros dinâmicos afetados pela temperatura seguiram um padrão de mudança que pode ser associado a um processo ativado do tipo *Arrhenius* com aproximadamente a mesma energia de ativação, em torno de $36 k_B T$. Este valor é bastante próximo da energia de ativação de $30 k_B T$ reportada para o processo de pinoctose em fibroblastos [68].

A polimerização da actina envolve uma energia de ativação de cerca de $25 k_B T$ [20]. A viscosidade efetiva do citoplasma sentida por um monômero de actina é de 2 – 8 vezes a viscosidade da água [69,70]. Supondo que esta proporcionalidade seja mantida na faixa de temperatura de $24 - 37^\circ C$, a constante de difusão dos monômeros de actina irá diminuir devido ao aumento da viscosidade do citoplasma causado pela redução da temperatura. A energia de ativação associada ao processo de difusão dos monômeros de actina pode ser estimada com sendo da ordem de $6 k_B T$, totalizando o valor de $31 k_B T$ para a energia de ativação envolvida nos processos de polimerização e movimentação da actina dentro das células.

A análise de todos os valores das energias de ativação apresentados suporta a idéia de que todos os processos de origem metabólica envolvendo a criação/dissipação de flutuações de formato da membrana são impulsionados primariamente pela polimerização de actina. É bastante interessante perceber que, diferentemente da grande maioria dos trabalhos relacionados ao papel e à importância da polimerização de actina na movimentação das células eucariotas, normalmente baseados no rastreamento e localização, através de marcação fluorescente, da posição da proteína actina dentro da célula, os resultados obtidos neste trabalho conduzem à identificação do envolvimento da actina em eventos relacionados à motilidade celular não pela detecção da proteína actina em sí, mas sim pela detecção e identificação, *in vivo*, de sua principal forma de atuação dentro das células: a polimerização. O aumento das energias de ativação obtidas para os processos dinâmicos analisados ao passarmos do estudo das FAC para os ruffles e para a fagocitose de parasitas também indica que, apesar de contarem com uma base comum, os fenômenos mais complexos devem agregar outros processos além da polimerização e difusão da actina, resultando em uma energia de ativação global maior.

Capítulo 7

Conclusão

Neste trabalho empregamos a técnica de microscopia de desfocalização para estudar, *in vivo* e em tempo real, o comportamento das estruturas formadas na membrana de macrófagos aderidos à superfície de uma lâmina de vidro.

Dois tipos distintos de flutuações foram detectadas ocorrendo na membrana dos macrófagos estudados: pequenas flutuações aleatórias na curvatura da membrana (FAC), presentes por toda a superfície da célula em todos os instantes, e grandes estruturas coerentes e localizadas, que se propagam pela membrana indo das bordas em direção à região central da célula, conhecidas como ruffles.

Embora hoje ainda não existam modelos moleculares dedicados a explicar os mecanismos exatos envolvidos na formação e dissipação destes dois tipos de flutuações, os resultados obtidos neste trabalho indicam que tais modelos, quando formulados, deverão se basear no mesmo princípio envolvido nos modelos atualmente usados na descrição da motilidade celular: a polimerização de actina.

A partir do estudo das características morfológicas e do comportamento dinâmico das FAC a $37^{\circ}C$, pudemos obter dados relevantes sobre propriedades dos macrófagos *in vivo*, tais como o módulo de curvatura de sua membrana e a viscosidade efetiva de seu citoesqueleto.

A uso combinado das técnicas de microscopia de desfocalização e de pinçamento óptico permitiu que eventos de fagocitose de parasitas (*Leishmania amazonensis* em forma amastigota) fossem provocados e acompanhados em

tempo real. A análise do comportamento dos ruffles antes, durante e após os eventos de fagocitose provocados desta forma, juntamente com o acompanhamento do tempo gasto pelos macrófagos para completar a internalização dos parasitas, indicou que o aumento maciço na quantidade deste tipo de estrutura nas regiões da membrana periféricas ao ponto de contato entre macrófago e parasita acelera o processo de internalização. Entretanto, os dados obtidos até o presente momento ainda não permitem a determinação dos fatores responsáveis pelo aumento da quantidade de ruffles, que pode ser provocado pelo parasita, como uma estratégia de infecção, ou mesmo ser consequência da ativação de diferentes receptores na membrana dos macrófagos.

A repetição dos experimentos de caracterização das flutuações na membrana dos macrófagos e de fagocitose de parasitas para diferentes temperaturas, na faixa de $24-37^{\circ}\text{C}$, tornou evidente que tanto as FAC quando os ruffles são estruturas diretamente ligadas ao metabolismo celular, não se tratando de flutuações de origem térmica. Através do acompanhamento das mudanças observadas em parâmetros dinâmicos das flutuações estudadas e dos eventos de fagocitose, tais como o tempo de relaxação das FAC, a velocidade de propagação dos ruffles e o tempo de internalização dos parasitas, pudemos determinar as energias de ativação envolvidas em cada um destes processos. A relativa coincidência entre os valores encontrados nos três casos e a energia de ativação envolvida no processo de polimerização e difusão de actina dentro da célula aponta para a confirmação da hipótese largamente aceita de que todos os processos de origem metabólica envolvendo a formação/dissipação de estruturas sobre a membrana, bem como sua movimentação coordenada, são baseados na reorganização ativa e contínua do citoesqueleto de actina.

O conjunto dos resultados obtidos demonstra que a microscopia de desfocalização é uma ferramenta poderosa e versátil para o estudo quantitativo *in vivo* da motilidade celular, bem como de outros processos biologicamente importantes, como a fagocitose de parasitas.

Apêndice A

Projeto Inicial: “Medida Dinâmica Do Comprimento de Persistência de Uma Molécula de DNA”

Quando iniciamos nossos estudos de doutoramento, em Março de 2001, nossa intenção era dar continuidade ao trabalho realizado durante o mestrado [71], no qual desenvolvemos um método alternativo, que denominamos *método de recuo*, para a determinação do *comprimento de persistência* de uma molécula de DNA. Entretanto, ao completarmos 18 meses de trabalho, em Setembro de 2002, decidimos alterar o tema de nossa pesquisa devido aos problemas e limitações detectados no método de recuo, para os quais não conseguimos soluções satisfatórias após alguns meses de tentativas. A partir de então passamos a nos dedicar ao estudo da motilidade do citoesqueleto de macrófagos, empregando a técnica de microscopia de desfocalização.

A idéia básica do método de recuo para estudo do comportamento elástico de regime entrópico de uma molécula de DNA consiste simplesmente em construir um sistema “massa–mola” utilizando uma molécula de DNA ligada pelas extremidades a uma microesfera de poliestireno e a uma lamínula de vidro (*Figura A.1*).

Nossa intenção era empregar os procedimentos de obtenção e análise de

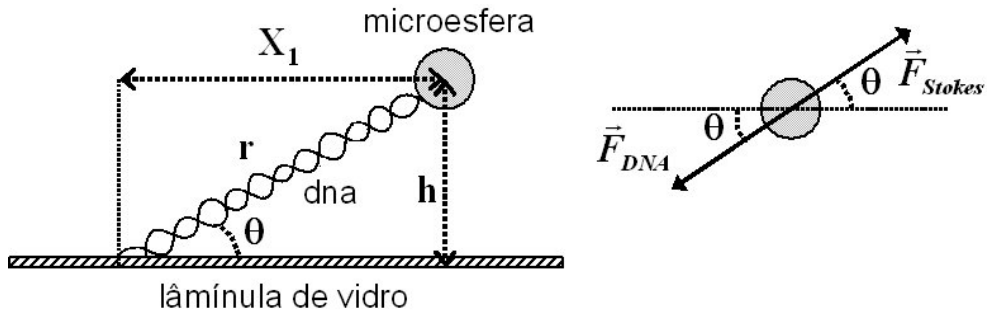


Figura A.1: Princípio do método de recuo: uma microesfera ancorada à superfície de uma lamínula de vidro através de uma molécula de DNA é capturada e deslocada com o auxílio de uma pinça óptica. A movimentação da microesfera estica o DNA, que responde aplicando à microesfera uma força restauradora \vec{F}_{DNA} , de origem entrópica. Desligada a pinça, a ação da força exercida pelo DNA puxa a microesfera, que, ao se mover, passa a sofrer também a ação da força de atrito \vec{F}_{Stokes} . Igualando a força do DNA com a força de atrito durante todo o movimento da microesfera, podemos obter o valor do comprimento de persistência do DNA.

curvas de recuo da microesfera desenvolvidos durante o mestrado para estudar problemas relacionados, tais como a influência de proteínas ligantes e de certos fármacos sobre a rigidez do DNA. Para melhorar os procedimentos de análise de dados, desenvolvemos uma rotina de simulação das curvas de recuo, a partir da equação de Langevin do sistema DNA–microesfera. Durante o aprimoramento do método, entretanto, dois problemas experimentais, não previstos nas simulações, se tornaram evidentes: a impossibilidade prática experimental de acompanhar o movimento vertical da microesfera, isto é, sua distância até a superfície da lamínula, e a mudança na interação da microesfera com o restante do sistema quando da adição de outros componentes, tais como proteínas. No primeiro caso, a ausência de informação sobre a distância entre a microesfera e a superfície da lamínula impede que o coeficiente de arraste da microesfera seja corrigido de maneira apropriada. Ainda assim, foram testadas aproximações para o movimento vertical da microesfera que produziram resultados aceitáveis na grande maioria dos casos. Entretanto, no segundo caso, a adição de outras substâncias ao sistema, que deveriam, a princípio interagir somente com o DNA, provou ter efeitos indesejados. Ao

aderirem à superfície da lamínula e também à superfície da microesfera, tais substâncias provocam uma mudança sem controle na força de atrito entre microesfera e lamínula, alterando as características originais do sistema e gerando resultados que, aparentemente, não refletem a realidade. Na tentativa de contornar este problema, investimos, durante algum tempo, na elaboração de um método “misto”, combinando a técnica de recuo com medidas convencionais de força. Com o insucesso destas tentativas, optamos pelo abandono do projeto.

Ainda assim, como o método se mostrou eficiente para o estudo do comportamento do DNA livre, isto é, sem a presença de nenhuma outra substância, foi possível aproveitar parte do trabalho realizado, o que resultou na elaboração de um artigo publicado na revista *Physica A*, cujo texto pode ser visto no *Apêndice D*.

Apêndice B

Protocolos de Extração e Cultivo de Células e Composição dos Meios de Cultura Celular

B.1 Extração de Células Tronco e Cultura Primária de Macrófagos

A obtenção dos macrófagos utilizados nos experimentos é feita de acordo com os procedimentos descritos a seguir:

1. Sacrificar um camundongo *C57BL/6* com 4 – 6 semanas de idade.
 2. Após remover a pele do animal, extrair cuidadosamente os dois fêmures inteiros, desarticulando as ligações nas tíbias e na bacia. Todo o cuidado deve ser tomando para não haver rompimento do peritônio ou dos intestinos.
 3. Em ambiente estéril, limpar cuidadosamente cada fêmur, removendo o máximo possível de músculo e articulações.
 4. Colocar 10 *ml* de meio de cultura padrão (ver composição) em uma placa de petri e encher duas seringas de 1 *ml* com meio.
 5. Manipulando um fêmur de cada vez e com extremo cuidado, cortar suas duas extremidades e injetar o meio de uma das seringas dentro do osso, de maneira
-

que o meio, ao sair pela outra extremidade carregando a medula óssea, caia dentro da placa de petri com meio de cultura. Se desejado, injetar mais meio pelo outro lado do osso.

6. Repetir o passo anterior com o outro fêmur.
7. Passar o meio da placa de petri para um tubo de centrifugação de 15 ml e centrifugar a $1.000 \times g$ por cerca de 10 minutos a $8^{\circ}C$.
8. Ressuspender o *pellet* em 10 ml de meio de cultura para macrófagos (ver composição) e colocar em uma placa de petri.
9. Manter em estufa a $37^{\circ}C$ em atmosfera com 5% CO_2 por 4 – 5 dias.
10. Após contagem, transferir cerca de 10^5 células para cada cubeta, devidamente esterilizada, ajustando o volume final para 1 ml.
11. Manter as cubetas por cerca de 3 – 24 horas em estufa ($37^{\circ}C$, 5% CO_2) para que os macrófagos possam aderir à sua superfície.

B.2 Composição do Meio de Cultura Padrão

O meio de cultura padrão utilizado é o DMEM*, suplementado com 10% de FCS† e 0,1% de antibiótico‡. A preparação do meio segue os procedimentos descritos a seguir:

1. Dissolver a quantidade adequada de DMEM para o volume final de meio desejado em água deionizada.
2. Adicionar 2 g de $NaHCO_3$ (bicarbonato de sódio) por litro.
3. Adicionar tampão HEPES (free acid)§ a 0,05 g/ml, equivalente a 25 mM.
4. Sob agitação, ajustar o pH para 7.2
5. Completar para o volume final e filtrar a vácuo, em ambiente estéril.

*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, D7777.

†Fetal Calf's Serum (soro fetal bovino), Cultilab.

‡Garamicina (sulfato de gentamicina) 40 mg/ml, Schering-Plough.

§Sigma, H3375.

6. Adicionar FCS na proporção de 10% e antibiótico (garamicina) na proporção de 0,1%.

B.3 Composição do Meio de Cultura para Macrófagos

O meio de cultura para macrófagos difere do meio de cultura padrão apenas pela adição do fator de crescimento M-CSF (Monocyte Colony Stimulating Factor), na proporção de 30%, após o último passo. Como fonte de fator de crescimento para macrófagos, empregamos o sobrenadante de culturas confluentes de fibroblastos de linhagem contínua *L929*.

B.4 Obtenção do Fator de Crescimento (M-CSF) para Macrófagos

O fator de crescimento para preparação do meio de cultura de macrófagos é obtido através da cultura dos fibroblastos *L929* de acordo com os procedimentos descritos a seguir:

1. Cultivar os fibroblastos em meio de cultura padrão a $37^{\circ}C$ e atmosfera com 5% CO_2 .
 2. Repicar a cultura a cada vez que houver confluência das células dentro da garrafa de cultura até atingir-se o número de garrafas desejado.
 3. Após as células atingirem o estado de confluência novamente, manter as garrafas na estufa por cerca de 4 – 6 dias.
 4. Após este período, o meio dentro das garrafas conterá grande quantidade de M-CSF, produzido pela camada confluenta de fibroblastos. Retirar este meio e filtrá-lo. Descartar as garrafas.
 5. Utilizar o meio filtrado como fonte de M-CSF.
-

Apêndice C

Calibração do Sistema de Vídeomicroscopia

Ao serem captadas pela CCD utilizada em nossa montagem experimental, as intensidades luminosas de diferentes pontos da imagem são convertidas em diferentes níveis de cinza, cujos valores correspondem apenas aos números inteiros de 0 a 255. O valor do nível de cinza NC mapeado pela CCD para uma dada intensidade luminosa I é dado por

$$NC = p_1 I + p_0, \quad (C.1)$$

onde p_1 e p_0 são constantes que dependem dos ajustes dos controles da CCD.

Se definirmos o contraste com base nos níveis de cinza gerados pela CCD como

$$C_{NC}(x, y) = \frac{NC - NC_0}{NC_0}, \quad (C.2)$$

onde NC e NC_0 representam o nível de cinza em (x, y) e o nível de cinza médio fora do objeto, respectivamente, podemos, combinando as *Equações 4.1, C.1 e C.2*, reescrever a *Equação 4.1* como

$$C_I(x, y) = \frac{NC_0}{NC_0 - p_0} C_{NC}(x, y) = \Delta n \Delta f \nabla^2 h(x, y), \quad (C.3)$$

que nos permite analisar nossos experimentos a partir das imagens gravadas em vídeo.

Para obter os valores de p_1 e p_0 correspondentes a um determinado ajuste dos controles da CCD, determinamos, com o auxílio de um detector de fótons

(*EG&G photon counting module, SPCM-200-PQ-F500*), conectado à montagem experimental de forma e receber exatamente a mesma intensidade de luz incidente na CCD 2, a intensidade luminosa correspondente a cada valor de nível de cinza gerado pela CCD. A curva de calibração obtida é então ajustada de acordo com a *Equação C.1*. Os valores de p_1 e p_0 correspondentes ao ajuste da CCD 2 utilizado durante os experimentos, obtidos com base na curva de calibração mostrada na *Figura C.1*, foram $p_1 = (0,93 \pm 0,01) \times 10^{-3}$ s/fótons e $p_0 = -(191 \pm 4)$. O fator de correção $\frac{NC_0}{NC_0 - p_0}$ obtido a partir destes valores é aproximadamente igual a 0,4.

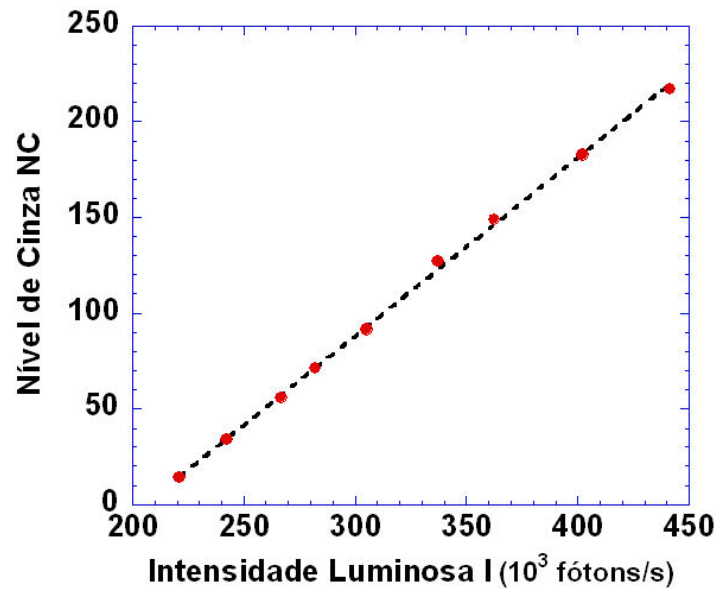


Figura C.1: Calibração do sistema de vídeomicroscopia. Ajustando os dados de acordo com a *Equação C.1* obtemos $p_1 = (0,93 \pm 0,01) \times 10^{-3}$ s/fótons e $p_0 = -(191 \pm 4)$.

Apêndice D

Artigos Publicados

Neste apêndice apresentamos o texto dos artigos resultantes de nosso trabalho durante o Doutorado, publicados nas revistas indicadas.

Relação de Artigos Publicados:

- Revista *Physica A* (F. I. = 1,180)
Coelho Neto, J., Dickman, R., and Mesquita, O. N., “Recoiling DNA molecule: simulation and experiment.” *Physica A* 345 (1-2), 173-184 (2005).
 - Revista *Experimental Cell Research* (F. I. = 3,949)
Coelho Neto, J., Agero, U., Oliveira, D. C. P., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N., “Real-time measurements of membrane surface dynamics on macrophages and the phagocytosis of *Leishmania* parasites.” *Exp. Cell Res.* 303 (2), 207-217 (2005).
-

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Physica A 345 (2005) 173–184

PHYSICA A

www.elsevier.com/locate/physa

Recoiling DNA molecule: simulation and experiment

José Coelho Neto*, Ronald Dickman, O.N. Mesquita

*Departamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, Belo Horizonte
CEP 30123-970, Minas Gerais, Brazil*

Received 1 April 2004; received in revised form 18 May 2004

Available online 7 August 2004

Abstract

Single molecule DNA experiments often generate data from force versus extension measurements involving the tethering of a microsphere to one end of a single DNA molecule while the other is attached to a substrate. We show that the persistence length of single DNA molecules can also be measured based on the recoil dynamics of these DNA-microsphere complexes if appropriate corrections are made to the friction coefficient of the microsphere in the vicinity of the substrate. Comparison between computer simulated recoil curves, generated from the corresponding Langevin equation, and experimental recoils are used to assure the validity of data analysis.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

PACS: 87.14.Gg; 87.15.La; 87.80.Cc; 05.10.Gg

Keywords: DNA; Single molecule; Persistence length; Recoil dynamics

1. Introduction

One of the most important characteristics of the DNA molecule is its high mechanical flexibility. Thanks to this, the entire genome of each living organism,

*Corresponding author. Tel.: +55-31-3499-5618; fax: +55-31-3499-5600.

E-mail addresses: rabbit@fisica.ufmg.br (J.C. Neto), dickman@fisica.ufmg.br (R. Dickman), mesquita@fisica.ufmg.br (O.N. Mesquita).

which can reach several meters in length, fits inside each of its cells. The flexibility of the DNA molecule also plays a key role in all its cellular functions such as replication, transcription and recombination. With advances in micromanipulation techniques during the last decade, single molecule DNA experiments have become common, and are explored through many different approaches [1].

Once free in solution, single DNA molecules present entropic elastic behavior, well described, in both low- and high-stretching regimes, by the *worm-like chain* (WLC) model [2–4]. The flexibility of the polymeric chain can be inferred through the ratio A/L , where A is its *persistence length* and L its *contour length*. Smaller A/L ratios correspond to more flexible chains. For the DNA molecule, a complete chain can have contour length L varying from around $2\mu\text{m}$ to more than 1m , while the persistence length A is of the order of $40\text{--}50\text{ nm}$ or $120\text{--}150$ base pairs.

The usual method to obtain A employing an optical trap [5] is based on *force versus extension* measurements [6–9]. One end of a DNA molecule is attached to a coverglass surface while the other end is tethered to a polystyrene microsphere (Fig. 1). The optical trap can then be used to capture and move the microsphere, stretching the DNA molecule. Obtaining force versus extension data for a DNA molecule, however, requires a very precise characterization and calibration of the trap, allowing the determination of the trapping force as a function of the position of the trapped microsphere. Here, we examine an alternate method to determine the persistence length A : once the DNA is stretched, one removes the trap and follows the motion of the microsphere in time, using videomicroscopy [8].

Using this method, Feingold [10] obtained a value of 152 nm for the persistence length of DNA, approximately three times larger than the value obtained from force versus extension measurements. The proposed explanation for this discrepancy was that during the initial part of the recoil, when the DNA is more than 80% stretched, the motion cannot be considered quasistatic, such that the force at each position is time dependent. Recently, Bohbot–Raviv et al. [11] considered a complete nonequilibrium theory for the relaxation of highly stretched semiflexible polymers like DNA and found a better agreement with Feingold’s experiment.

We have performed recoil experiments in which the friction between the microsphere and the coverglass is carefully taken into account and found persistence lengths comparable to the values obtained from force versus extension measurements just using the standard quasistatic approximation, without the need of a nonequilibrium theory for the relaxation of the DNA. We also perform computer

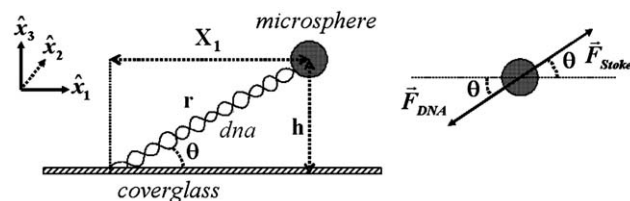


Fig. 1. Microsphere anchored to a coverglass surface by a single tethered DNA molecule.

simulations of the recoil using the corresponding Langevin equation to assure the validity of the assumptions used in the data analysis.

The balance of this paper is organized as follows. In Section 2 we describe the recoil method and the motion of the microsphere. Section 3 details the simulation of the recoil dynamics of the microsphere. The procedures adopted to obtain experimental recoil curves are described in Section 4. In Section 5 we describe the analysis of simulated and experimental recoils leading to our results. Conclusions and final remarks are presented in Section 6.

2. Experimental technique

In essence, the recoil technique introduced by Shivashankar et al. [8] is very simple. As in the force-based experiments, optical tweezers are used to find and trap a microsphere anchored to a coverglass surface through a single tethered DNA molecule. The trapped microsphere is moved, stretching the DNA molecule. The tweezers are then cut off suddenly, releasing the microsphere, which is dragged through the fluid by the recoiling DNA molecule. Following the recoil of the microsphere using videomicroscopy, we obtain a recoil curve $R(t)$, from which we can extract information about A and L .

According to Ref. [8], the recoil movement can be considered *quasistatic*, since the equilibration time for the DNA molecule is very short compared with the time scale for the motion of the microsphere. This means that, during relaxation, the DNA essentially passes through a sequence of equilibrium stretched states [12]. Because the time resolution of our videomicroscopy experiments (1/30 s) is large compared to the ratio m/γ ($\approx 10^{-7}$ s) for the microsphere, inertial effects are negligible in the analysis of the recoils. As a result, the average motion of the microsphere can be described by

$$\gamma \frac{d\langle R \rangle}{dt} = -F_{dna}(r), \quad (1)$$

where $\langle R \rangle$ is the average position of the microsphere, r is the distance between the extremities of the DNA molecule, γ is the Stokes friction coefficient and $F_{dna}(r)$ is the entropic elastic force for the DNA molecule given by the WLC model [2–4],

$$F_{dna}(r) = \frac{k_b T}{A} \left[\frac{r}{L} + \frac{1}{4(1 - \frac{r}{L})^2} - \frac{1}{4} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{r}{L} \right)^i \right], \quad (2)$$

where the final term represents the correction introduced by Bouchiat et al. [4], with $\alpha_2 = -0.5164228$, $\alpha_3 = -2.737418$, $\alpha_4 = 16.07497$, $\alpha_5 = -38.87607$, $\alpha_6 = 39.49944$ and $\alpha_7 = -14.17718$. The bouyancy force on the microsphere is $5fN$, negligible compared to F_{dna} , which is of the order of pN during most of the recoil movement.

Far from any boundary, the Stokes friction coefficient between the microsphere and the surrounding medium is

$$\gamma = 6\pi\eta a, \quad (3)$$

where η is the viscosity of the medium and a is the radius of the microsphere. There are, however, important considerations to be made regarding the use of Eq. (1). The wall-drag effect caused by the coverglass nearby changes the friction coefficient γ of the microsphere [13]. As a result, γ can no longer be considered constant and isotropic, and must continuously be corrected as the microsphere moves. This correction depends on the height h of the microsphere with respect to the coverglass below.

We can integrate Eq. (1) directly. However, we cannot obtain a simple explicit analytic expression for $R(t)$, forcing us to devise an alternative procedure to fit the experimental data. We choose to apply a discrete derivative to the experimental recoil curves, generating data that may be fit directly with Eq. (1). Since the microsphere undergoes Brownian motion while recoiling, the numerical derivative will be noisy. We therefore smooth the recoil curve, minimizing the Brownian noise, prior to performing the numerical derivative. To test the validity and effects of the adopted procedure, we compare our result with the simulated recoil dynamics of a tethered microsphere.

3. Simulation

To simulate the recoil dynamics of the microsphere we solve, numerically, the Langevin equation for the system, using F_{dna} as an external force [14,15]. In the non-inertial limit, we have

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{F_{dna}(r)}{\gamma} + \frac{\mathcal{F}(t)}{\gamma}, \quad (4)$$

where $\mathcal{F}(t)$ is the Brownian force, which has the properties $\langle \mathcal{F}(t) \rangle = 0$ and $\langle \mathcal{F}(t)\mathcal{F}(t') \rangle = \Gamma\delta(t-t')$, where $\Gamma = 2\gamma k_B T$.

The discrete form of Eq. (4) is

$$R(t + \Delta t) = R(t) - \frac{F_{dna}(r)\Delta t}{\gamma} + \frac{\sqrt{\Gamma\Delta t}}{\gamma} \zeta_n, \quad (5)$$

where ζ_n is a Gaussian random variable with $\langle \zeta_n \rangle = 0$ and $\langle \zeta_n \zeta_m \rangle = \delta_{nm}$.

Until this point, we have treated the motion of the microsphere using a reference frame directed along the force axis of the DNA molecule. This one-dimensional reference frame is not appropriate to our purposes, since it does not contain the experimental reference frame which we want to simulate, in which the microsphere undergoes three-dimensional Brownian motion. Therefore, we extend Eq. (5) to three-dimensional space, obtaining

$$X_i(t + \Delta t) = X_i(t) - \frac{F_{dna}(r)\Delta t}{\gamma} \frac{X_i(t)}{R} + \frac{\sqrt{\Gamma\Delta t}}{\gamma} \zeta_{n,i}, \quad (6)$$

with $i = 1, 2, 3$ and

$$r = \sqrt{\sum_{i=1}^{i=3} X_i^2} - a = R - a, \quad (7)$$

where the set $\{X_i\}$ represents the coordinates of the center of mass of the microsphere while r represents the relative distance between the two extremities of the DNA molecule. Since the DNA is attached to the surface of the microsphere, the two coordinate systems are connected through Eq. (7), where a is the radius of the microsphere.

3.1. Correcting γ : the wall-drag effect

Use of a constant and isotropic Stokes friction coefficient γ is justified if and only if the fluid velocity attains constant value v_0 far from the microsphere, in all directions. When an obstacle interferes with the fluid flow near the microsphere, such as the coverglass surface in the present case, this assumption is no longer valid and γ depends on the direction of motion and on the distance from the microsphere to the obstacle [13]. According to the analyses of Faxen [16], Brenner [17] and Goldman et al. [18] in the early and mid-20th century, for a microsphere of radius a whose center of mass is at a distance h from a planar surface, the friction coefficient γ is anisotropic, with

$$\gamma_{\parallel} \approx \frac{6\pi\eta a}{\left(1 - \frac{9}{16}\left(\frac{a}{h}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{a}{h}\right)^3 - \frac{45}{254}\left(\frac{a}{h}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{a}{h}\right)^5\right)} \quad (8a)$$

for motion parallel to the planar surface (xy plane), and

$$\gamma_{\perp} = 6\pi\eta a \times \left[\frac{4}{3} \sinh \alpha \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+1)}{(2n-1)(2n+3)} \times \left[\frac{2 \sinh[(2n+1)\alpha] + (2n+1) \sinh 2\alpha}{4 \sinh^2[(n+\frac{1}{2})\alpha] - (2n+1)^2 \sinh^2 \alpha} - 1 \right] \right], \quad (8b)$$

for motion perpendicular to the planar surface (z -axis), where $\alpha = \cosh^{-1}(h/a)$. The exact correction for γ_{\perp} , shown in Eq. (8b), can be replaced by a far simpler approximation, given by [17]

$$\gamma_{\perp} \approx 6\pi\eta a \left(1 + \frac{a}{h-a}\right), \quad (8c)$$

with an average error $\leq 5\%$ for $h/a > 1$. The loss of isotropy in γ alters Eq. (6), which becomes

$$X_i(t + \Delta t) = X_i(t) - \frac{F_{dna}(r)\Delta t}{\gamma_{\parallel}} \frac{X_i(t)}{R} + \frac{\sqrt{F_{\parallel}\Delta t}}{\gamma_{\parallel}} \xi_{n,i} \quad i = 1, 2, \quad (9a)$$

$$X_3(t + \Delta t) = X_3(t) - \frac{F_{dna}(r)\Delta t}{\gamma_{\perp}} \frac{X_3(t)}{R} + \frac{\sqrt{F_{\perp}\Delta t}}{\gamma_{\perp}} \xi_n, \quad (9b)$$

where Eq. (9a) generates the x and y components of the recoil curve and Eq. (9b) the z component. This equation, however, does not take into account the fact that the height h of the center of the microsphere cannot be less than its radius a , in which case the microsphere is touching the coverglass. At this point, interactions between the microsphere and the coverglass can no longer be neglected and Eq. (8) can no longer be safely used. We have nevertheless observed that, after the recoil, the microsphere exhibits Brownian motion in the plane of the coverglass for quite some time, the same behavior being observed for most of the free microspheres as well. This observation indicates that the microspheres remain hovering close to the coverglass for a period of time before sticking to it. To determine how close to the coverglass the microspheres were hovering, we prepared a sample containing only free microspheres under the same experimental conditions. After letting the sample rest on the microscope for more than 2 h, we measured the microsphere diffusion coefficient for motion parallel to the coverglass (Fig. 2). The measured value was $(0.063 \pm 0.001) \mu\text{m}^2/\text{s}$, approximately 2.75 times less than the theoretical free diffusion coefficient, $k_B T / 6\pi\eta a = 0.173 \mu\text{m}^2/\text{s}$, for $a = 1.42 \mu\text{m}$. Assuming this

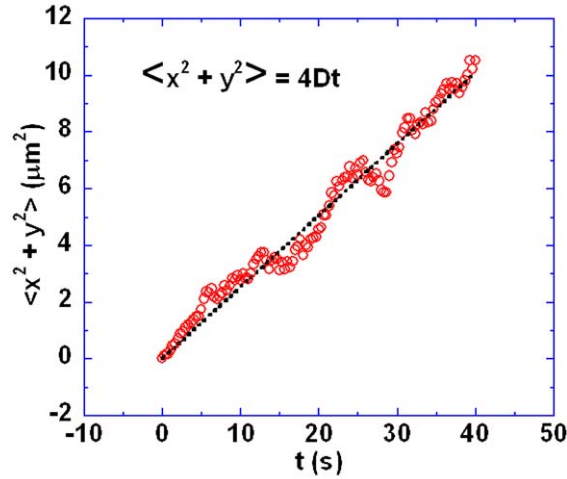


Fig. 2. Average quadratic displacement as a function of time for microspheres hovering close to the coverglass. The movements of 20 free microspheres were tracked for 40 s and combined into a single curve. The diffusion coefficient $D = (0.063 \pm 0.001) \mu\text{m}^2/\text{s}$ was obtained by fitting this curve to a two-dimensional random walk.

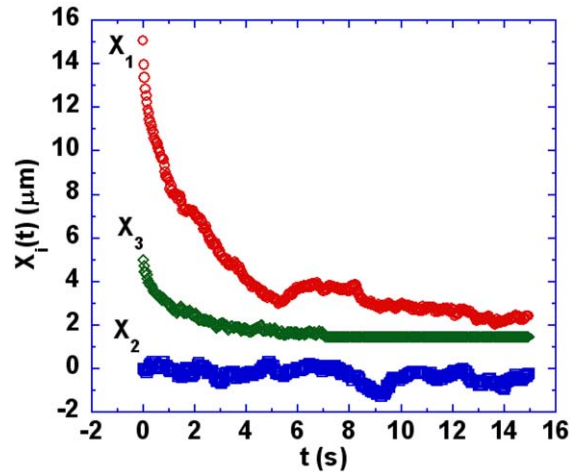


Fig. 3. A typical simulated recoil curve. The numerical solution of Eq. (9) is plotted for each direction. For this simulation we used $h_0 = 5 \mu\text{m}$, $A = 45 \text{ nm}$, $L = 17 \mu\text{m}$ and $T = 25^\circ\text{C}$.

discrepancy is caused by the increased friction close to the coverglass and applying Eq. (8a), we obtained an average hovering distance of approximately $1.47 \mu\text{m}$, indicating that the microspheres in fact were not touching the coverglass, their point of nearest approach remaining approximately $0.05 \mu\text{m}$ above it. The simulation routine was then altered to reproduce this effect, not letting h drop below its minimum value of $1.47 \mu\text{m}$ during the recoil, as observed experimentally.

The initial conditions of the microsphere for all simulated recoils are $X_1(0) = \sqrt{(0.85L + a)^2 - h_0^2}$, $X_2(0) = 0$ and $X_3(0) = h_0$, where we have assumed that the DNA molecule is at least 85% stretched, initially. The coordinate system is taken so as to place the direction of stretching in the xz plane. The time increment, Δt , was set to $(1/30)\text{s}$, matching videomicroscopy time resolution for better comparison between simulated and experimental curves (which also proved adequate for numerical convergence). A simulated recoil curve is shown in Fig. 3.

4. Experiment

4.1. Experimental setup

The experiments are made on a Nikon TE300 Eclipse inverted optical microscope coupled to two CCD cameras and a piezo-driven stage (Fig. 4). We use a SDL 5422 near infrared laser ($\lambda = 832 \text{ nm}$) focused through an infinity corrected objective lens (Nikon plan apo, DIC H, $100\times 1.4 \text{ NA}$, oil immersion) to create the optical tweezers. Imaging from CCD 1 is used to locate and move suitable microspheres into position while imaging from CCD 2, filtered from the near infrared light, is videorecorded for posterior analysis.

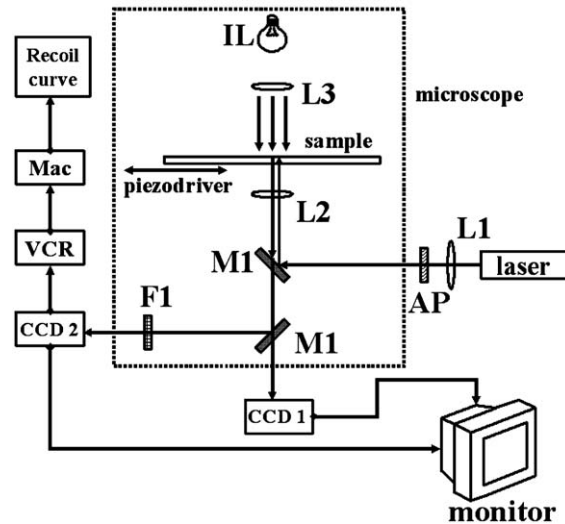


Fig. 4. Schematic of the experimental setup. (IL) light source; (L1) objective lens 20 \times ; (L2) objective lens 100 \times ; (L3) condenser; (AP) anamorphic prism; (M1) dichroic mirror; (F1) near infrared filter.

4.2. Sample preparation

Samples are prepared using the method described in Ref. [8], with slight variations. We prepare a solution containing PBS (150 mM Na⁺) pH 6 and microspheres (*Polybead Polystyrene 2.8 μ m microspheres*, $\rho = 1.05$ g/ml, $n = 1.6$). The density of microspheres in the solution is around 450/ μ l. For every 395 μ l of solution, we add 5 μ l of DNA solution (*New England Biolabs λ DNA 553 μ g/ml*), previously heated in a thermal bath at 62 $^{\circ}$ C for 5 min, mix gently and incubate together for 20 min. The solution is then pipeted into cells (≈ 4 mm radius, 3 mm height) on coverglasses and covered with cut pieces of coverglass to prevent excessive evaporation. At this pH condition, DNA molecules bind to the microspheres and to the coverglass, preferably by its extremities [19]. After 24 h of incubation at room temperature, the cells are opened and gently washed with PBS (150 mM Na⁺) pH 7.4 to remove the excess of free beads and reset the pH for the DNA. The cells are covered again and are then ready for experiments.

4.3. DNA–microsphere system selection

With the samples placed on the microscope, the optical tweezers are used to locate a microsphere bound to a single DNA molecule. Although many microspheres are attached to DNA, some judgement is needed to choose a good DNA–microsphere system, in order to avoid microspheres attached to more than one molecule, molecules bound to the coverglass at multiple locations and other possible undesirable configurations. Verifying if the selected microsphere presents radial symmetry with respect to stretching and recoiling around its apparent resting point is

the minimal required test for a good candidate. Once a suitable DNA–microsphere pair is selected, the initial height h_0 for the recoil is set by adjusting the focal distance of the tweezers. The microsphere is trapped and moved to stretch the DNA. The videorecording is started and the tweezers cut off, starting the recoil.

4.4. Data extraction

After videorecording the recoil through CCD 2, the images are analyzed using the *Image 1.62* [20] software package. The x and y coordinates of the center of mass of the microsphere are extracted from each frame and combined with the time index of the recording to give $X_1(t)$ and $X_2(t)$.

4.5. Estimate for $h(t)$

As already mentioned, the appropriate correction to the friction coefficient for the microsphere depends on the distance h of its center from the coverglass. We use the optical tweezers to set the initial height h_0 of the microsphere. During the recoil, the value of h can be measured from the defocusing of the microsphere, a very time consuming procedure. We believe that, for the recoil experiments, sufficient accuracy can be achieved by using a reasonable estimate for $h(t)$ guided by computer simulations. To obtain $h(t)$ for the experimental recoils we used averaged simulated recoils to establish how $h(t)$, which corresponds to $X_3(t)$ in the simulated recoils, was related to the horizontal component of the recoil, $X_1(t)$. We found that, because of the anisotropy in γ , $h(t)$ plotted as a function of $X_1(t)$ does not correspond to a straight line trajectory pointing to the origin of the coordinate system, as would be expected if γ_{\parallel} and γ_{\perp} were identical. Nevertheless, we observed that the average $h(t)$ can be estimated, with good agreement with the simulations (Fig. 5), by

$$h(t) = 0.925 + (h_0 - 0.925) \frac{X_1(t)}{X_1(t=0)}, \quad (10)$$

until $h(t)$ reaches $1.47 \mu\text{m}$, where the experimental evidence indicates that the microspheres interrupt, at least for a time longer than the duration of the recoil, their vertical motion. During the most relevant region of the recoil, the distance from the bottom of the microsphere to the coverglass is larger than $0.5 \mu\text{m}$, a value much larger than any roughness of such a good optical quality coverglass used.

5. Data analysis

Using the previously chosen coordinate system, in which the molecule is stretched along the xz plane, the recoil is primarily along the x -axis. We may then use the x component of Eq. (1), given by

$$\frac{dX_1}{dt} = - \frac{F_{dna}(r) X_1}{\gamma_{\parallel} R}, \quad (11)$$

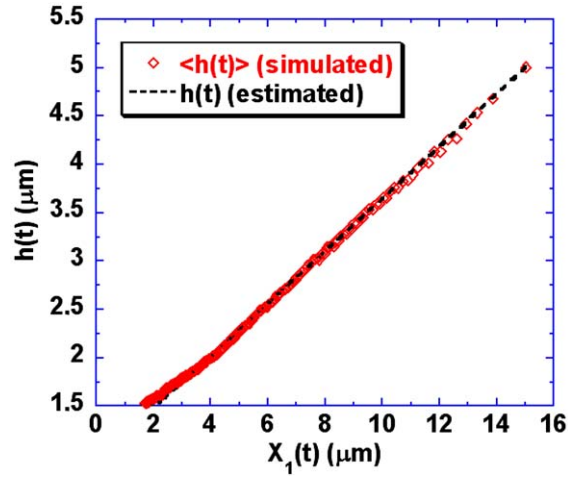


Fig. 5. The height h of the center of mass of a microsphere is plotted as a function of its horizontal position. (\diamond) Average of 250 simulated recoils showing $\langle h(t) \rangle$ as a function of the corresponding $\langle X_1(t) \rangle$. (---) Estimate for $h(t)$, given by Eq. (10). We have tested Eq. (10) with different values of h_0 , A , L and temperature and obtained similar results. Parameters: $h_0 = 5 \mu\text{m}$, $A = 45 \text{ nm}$, $L = 17 \mu\text{m}$ and $T = 25^\circ\text{C}$.

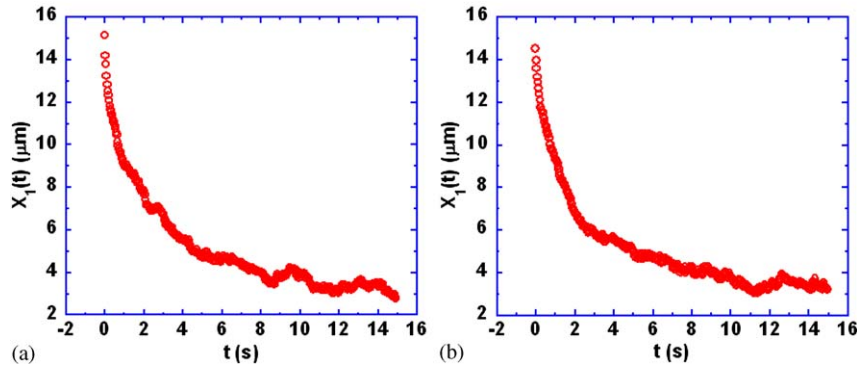


Fig. 6. Simulated (a) and experimental (b) recoil curves. The parameters of the simulated curve were chosen close to the values obtained from the analysis of the experimental recoil, in order to show that the simulated recoils are a good reproduction of the experiments. The following values were used: $A = 45 \text{ nm}$, $L = 16.5 \mu\text{m}$, $h_0 = 3 \mu\text{m}$ and $T = 23^\circ\text{C}$.

to fit our data. The y component of the recoil will fluctuate around 0, allowing us to write

$$R \approx \sqrt{X_1^2 + h^2}. \tag{12}$$

Analysis of the recoil curves (Fig. 6) consists of three steps. First, the recoil curve is smoothed using the *Stineman* smoothing function from *KaleidaGraph* [21] software package, filtering out high-frequency Brownian noise. The smoothed recoil curve is

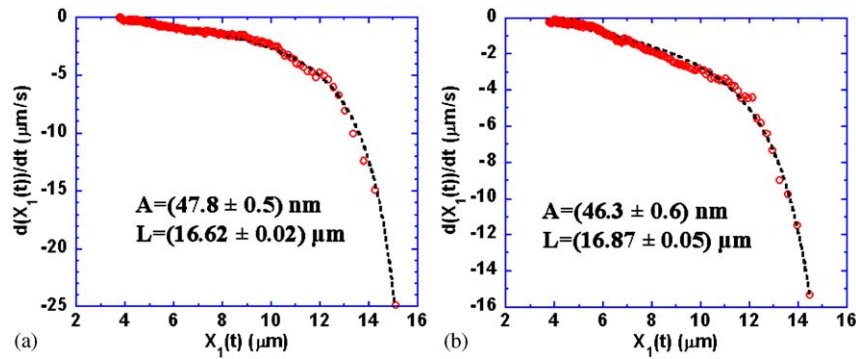


Fig. 7. Analysis of the recoils shown in Fig. 6. (a) Simulated recoil. (b) Experimental recoil. For the simulated recoils, differences between the parameters A and L used in the simulation and the values obtained from the analysis of the recoil are considered acceptable if ≤ 5 nm for A and ≤ 0.3 μm for L .

then used to evaluate the finite difference $\Delta X_1/\Delta t$. The resulting velocity data are fit according to Eq. (11).

To check the validity of the results produced by this procedure, we compared the values of A and L obtained from the analysis of several simulated recoils with the known values of A and L used as parameters in each simulation. The process was repeated several times, with different values of A , L , h_0 and T used in the simulated recoils. In most cases, there was good agreement between the values of A and L used in the simulation and the values obtained from the analysis of the recoils generated (Fig. 7). We have, however, observed that in certain cases the analysis of a simulated recoil produced results quite different than those obtained from the analysis of other recoils generated with the same parameters. We believe that such occasional discrepancies occur when a slight deviation from the average recoil trajectory is enhanced when the recoil is smoothed and its derivative evaluated. To minimize this effect in the experimental analysis, we have always recorded, analysed and compared at least 4 recoils for each DNA–microsphere complex.

We analysed 21 experimental recoils from 5 different DNA–microsphere systems in 3 different samples. The average persistence length obtained from our data was $A = (43 \pm 5)$ nm, a value well within the range obtained from other techniques [6,9,22].

6. Conclusion

In recent years, measurements of the persistence length of single DNA molecules have been made through several different methods, ranging from spectroscopic techniques to electron microscopy. Each of these approaches involves a particular set of assumptions, as pointed out by Wang et al., in Ref. [6], and is susceptible to different sources of error.

We have shown, based on simulated and experimental data, that the *recoil method*, in which we follow the recoil dynamics of a previously stretched DNA molecule through the motion of a tethered microsphere, can be used to determine the persistence length of single DNA molecules, provided that adequate correction of the friction for the microsphere is made. Although it is possible to perform the analysis of the recoil using only on the horizontal component of the movement, knowledge of the vertical dynamics of the microsphere is fundamental, since its vertical position is the critical parameter governing the friction correction. Both simulated and experimental data were treated using the quasistatic response of the DNA molecule, without considering the far from equilibrium dynamics proposed in Ref. [11]. We observe a high degree of consistency between experiment and simulation.

Acknowledgements

We acknowledge helpful discussions with G. V. Shivashankar and M. Feingold. This work was supported by the Brazilian Agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FINEP-PRONEX.

References

- [1] T. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette, D. Bensimon, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74 (2000) 115.
- [2] C. Bustamante, J.F. Marko, E.D. Siggia, *Science* 265 (1994) 1599.
- [3] J.F. Marko, E.D. Siggia, *Macromolecules* 28 (1995) 8759.
- [4] C. Bouchiat, M.D. Wang, J.-F. Allemand, T. Strick, S.M. Block, V. Croquette, *Biophys. J.* 76 (1999) 409.
- [5] A. Ashkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4853.
- [6] M.D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S.M. Block, *Biophys. J.* 72 (1997) 1335.
- [7] G.V. Shivashankar, G. Stolovitzky, A. Libchaber, *Appl. Phys. Lett.* 73 (1998) 291.
- [8] G.V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky, A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 7916.
- [9] N.B. Viana, R.T.S. Freire, O.N. Mesquita, *Phys. Rev. E* 65 (2002) 041921.
- [10] M. Feingold, *Physica E* 9 (2001) 616.
- [11] Y. Bohbot-Raviv, W. Zhao, M. Feingold, C.H. Wiggins, R. Granek, *Phys. Rev. Lett.* 92 (2004) 098101.
- [12] T.T. Perkins, S.R. Quake, D.E. Smith, S. Chu, *Science* 264 (1994) 822.
- [13] M.I.M. Feitosa, O.N. Mesquita, *Phys. Rev. A* 44 (1991) 6677.
- [14] N.G.V. Kampen, *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*, North-Holland, Amsterdam, 1981.
- [15] M. Doi, S.F. Edwards, *The Theory of Polymer Dynamics*, Oxford University Press, Oxford, 1986.
- [16] H. Faxen, *Ark. Mat. Astron. Fys.* 18 (1924) 1.
- [17] H. Brenner, *Chem. Eng. Sci.* 16 (1961) 242.
- [18] A.J. Goldman, R.G. Cox, H. Brenner, *Chem. Eng. Sci.* 22 (1967) 637.
- [19] J.-F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, V. Croquette, *Biophys. J.* 73 (1997) 2064.
- [20] NIH Image, 1.62, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>.
- [21] KaleidaGraph, 3.5, <http://www.kaleidagraph.com>.
- [22] S.B. Smith, L. Finzi, C. Bustamante, *Science* 258 (1992) 1122.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Experimental Cell Research 303 (2005) 207–217

Experimental
Cell Researchwww.elsevier.com/locate/yexcr

Real-time measurements of membrane surface dynamics on macrophages and the phagocytosis of *Leishmania* parasites

José Coelho Neto^{a,*}, Ubirajara Agero^{a,b}, Diogo C.P. Oliveira^c,
Ricardo T. Gazzinelli^{b,c}, Oscar N. Mesquita^a

^aDepartamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^bDepartamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^cCentro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, CEP 30190-002, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Received 24 June 2004, revised version received 18 August 2004

Abstract

Defocusing microscopy was used for real-time observation and quantification of membrane surface dynamics in murine bone marrow macrophages. Small random membrane fluctuations (SRMF), possibly metabolic driven, were detected uniformly over all membrane surface. Morphological and dynamical parameters of ruffles, such as shape, dimensions, and velocity of propagation, were analyzed. Optical tweezers were used to promote phagocytosis of single *Leishmania amazonensis* amastigotes by selected macrophages. Analysis of ruffling activity on the macrophages before and during phagocytosis of the parasites indicated that increased ruffling response near forming phagosomes, most likely induced by the parasite, accelerates phagocytosis. The effects of temperature decrease on the dynamics of membrane surface fluctuations and on the phagocytosis of parasites were used to determine the overall activation energies involved in these processes. The values obtained support the existence of strong correlation between membrane motility and phagocytic capacity.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Membrane motility; Membrane fluctuations; Membrane ruffles; Phagocytosis; Defocusing microscopy

Introduction

Eukaryotic cells are capable of adopting various shapes and move in a well coordinated and organized way, abilities that play important roles in many biological processes, including embryonic development, wound healing, tissue development, and immune responses. The main structure responsible for such versatility is a wide network of filamentous proteins, specially actin, which permeates the whole cell: the cytoskeleton. The continuous reorganization of the actin cytoskeleton controls the motion of the cellular membrane and is responsible for the formation of lamelli-

podia and membrane ruffles. Lamellipodia protrusion followed by adhesion of the newly extended membrane to the substratum and coupled with de-adhesion and retraction of the opposite side of the cell constitutes the basic mechanism of cell motility [1,2]. If adhesion is not successful [3,4], the extended membrane will recede, forming a ruffle that moves towards the main cell body. Ruffles are also formed over the cell membrane away from lamellipodia extension sites and have been associated with other cellular processes such as macropinocytosis and phagocytosis [5–8].

In this work, we have applied the recently developed defocusing microscopy technique [9] to make real-time measurements of membrane surface fluctuations present in murine bone marrow macrophages. Aside from ruffling activity, which generates large propagating structures, the presence of background small random membrane fluctua-

* Corresponding author. Departamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, CEP 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Fax: +55 31 3499 5600.

E-mail address: rabbit@fisica.ufmg.br (J. Coelho Neto).

tions (SRMF) was observed over the cell membrane as a whole, as reported for murine inflammatory macrophages by Agero et al. [9]. We present our results in three parts.

In the first part of our work, we characterize the two kinds of membrane fluctuations occurring on the surface of the studied macrophages at 37°C. We obtained the average decay time, correlation length, and the root mean square (rms) curvature for the SRMF and the average length, speed, frequency of occurrence, height, width, and the rms curvature of ruffles. In the second part, we combine defocusing microscopy and optical tweezers [10], allowing phagocytosis of parasites (*Leishmania amazonensis* amastigotes) to be followed in real time, along with ruffling activity over all the spread membrane of the macrophage, at 37°C. In most events, we observed an increase in ruffling activity nearby the forming phagosomes, accompanied by a decrease in the time taken to conclude the engulfment of the parasite, relative to the few events where no increase in ruffling was observed. In the final part of our work, we study the global effects of temperature decrease on the dynamics and form of SRMF and ruffles and on the phagocytosis of the parasites. We found that only dynamic parameters of the membrane fluctuations studied, such as the decay time of the SRMF and the speed of ruffles, were significantly altered. A significant increase in the time taken to engulf each parasite was also observed. We show that all the changes observed apparently obey Arrhenius-like activated processes involving the same activation energy, which are possibly related to actin dynamics within the cell.

Materials and methods

Macrophages

Bone marrow was washed from femurs of 4–6 weeks old C57BL/6 mice with DMEM supplemented with gentamicin. Cells were washed, resuspended in marrow culture medium, and plated on 100-mm nontissue plastic petri dishes. After 5–6 days of culture at 37°C, 5% CO₂, plates were gently washed with marrow medium and dispensed on single well plates made of Plexiglas and microscope cover slips containing $4\text{--}6 \times 10^4$ cells on 1 ml of medium. Cells were allowed to adhere at 37°C, 5% CO₂ for 3–24 h before experiments. Marrow culture medium consisted of DMEM supplemented with 10% FCS, 1% gentamicin, and 30% of supernatant from confluent cultures of L929 fibroblasts, as a source of macrophage-CSF.

Parasites

Leishmania amazonensis amastigotes (strain IFLA/BR/67/PH8) were harvested from infected footpads of C57BL/6 mice. Excised tissue from lesions was homogenized in Grace's Insect Medium containing 20% FCS. The suspension was centrifuged at $50 \times g$ for 4 min. The resulting

supernatant was centrifuged at $1450 \times g$ for 15 min. The final pellet was resuspended in Grace medium and used in the experiments.

Defocusing microscopy

Membrane dynamics were observed by defocusing microscopy technique [9]. Unlike phase contrast and DIC microscopy techniques, which generate images showing the thickness and the thickness gradient of the objects visualized, respectively, defocusing microscopy generates an image showing the curvatures present over the surface of the object. Since any deformation over the membrane will produce curvature changes, defocusing microscopy can be used to detect and quantify such deformations. Although the same information can be obtained from the other techniques mentioned, analysis of the data obtained through the use of defocusing microscopy is far more simple, as seen from Eq. (1) (see Appendix A). This argument, combined with the fact that defocusing microscopy can be used in almost any optical microscope without the need of filters, phase plates, special prisms, or compensators, makes it ideal for studying membrane motility and other systems with similar characteristics.

Experiments were made on a Nikon TE300 inverted microscope with oil immersion objective (Nikon Plan APO DIC H, 100 \times , 1.4NA). Sample temperature was controlled by heating the objective. Images of single spread macrophages were captured with a CCD camera (Dage MTI 72) and recorded on tape for later digitalization and analysis. Each cell studied was filmed for at least 10 min. Video system gray levels as a function of light intensity has to be calibrated in order to translate gray level contrast to light intensity contrast. The calibration procedure is described in the Appendix A.

Real-time phagocytosis assays

Using an optical tweezers [10] generated by a near-infrared laser diode (SDL 5422, $\lambda = 832$ nm) connected to the microscope, single amastigote leishmanias were captured, one at a time, and put into contact with a selected macrophage. Once the amastigote was adhered to the macrophage, the tweezers were removed. This procedure allowed real-time observation of the engulfment of parasites by the macrophage. Ruffling activity nearby the forming phagosome was monitored during each phagocytosis and compared with measurements taken before the parasite was put into contact with the macrophage.

Image analysis

Recorded images of macrophages were digitalized as 8-bit grayscale movies and analyzed with the NIH-ImageJ [11] program. Decay time, correlation length, and the rms curvature for the background random fluctuations were

determined from temporal and spatial autocorrelation contrast functions and the contrast probability distribution function (PDF) for the pixels of the images taken from the macrophages. Longitudinal contrast profiles of ruffles were used to obtain their shape, height, width, and speed. Ruffles lengths and frequency of occurrence were measured directly from the recorded movies. During phagocytosis of parasites, the amount of ruffling in a given region of membrane was determined from the mean squared curvature for that region (see Appendix A).

Results

Characterization of the SRMF and membrane ruffles at 37°C

Although the spread membrane of macrophages is transparent when observed through the use of conventional bright field microscopy, the defocusing technique allows membrane deformations and inhomogeneities to be spotted and analyzed since they will appear as darker and lighter regions. If we consider the refractive index of the spread membrane constant and homogeneous, the contrast observed on the defocused images is a measurement of the local curvature of the membrane. Analysis of the observed curvatures allow quantitative characterization of membrane deformations, such as SRMF and ruffles. A typical image from a spread macrophage is shown in Fig. 1.

Contrast produced by SRMF is significantly lower than that generated by ruffles, as illustrated in Fig. 1a. This

occurs because their curvature amplitudes are small compared to the curvature amplitudes present in ruffles. Because of their low contrast, direct observation of SRMF is difficult. Therefore, SRMF characterization is made from temporal and spatial autocorrelation functions (see Appendix A) along the membrane (Fig. 2). From the time autocorrelation function, we obtain the decay time τ , which provide information about the duration of the fluctuations. From the spatial autocorrelation function, we obtain their correlation length ζ . Typical values for ζ are, however, of the same order of the optical resolution for the objective used. Therefore, the values obtained represent an upper limit for the length of SRMF. The rms curvature generated by this kind of fluctuation is obtained from the autocorrelation functions amplitudes. Their size a_0 is estimated based on the measured length and curvature. Typical parameters obtained for the SRMF are shown in Table 1.

Ruffles can be described as the result of a significant increase in the curvature of the membrane, caused by a burst of actin polymerization, concentrated in a relatively small region. As sites of increased curvature, ruffles are easily visualized with defocusing microscopy, appearing as regions of high contrast (Fig. 1b). They can be classified in two kinds according to their site of origin: cell edge ruffles and dorsal surface ruffles [8,12]. Edge ruffles, originated from receding lamellipodia, form linear structures bordering the cell and tend to move towards its center. Dorsal ruffles, which include all ruffles of nonlamellipodial origin, form disordered structures, randomly placed over the membrane, commonly associated to macropinocytotic activity. Longitudinal contrast profiles crossing the ruffles

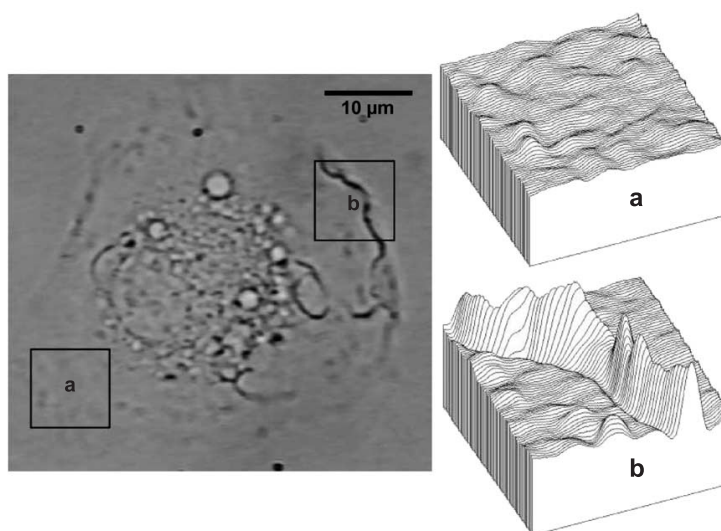


Fig. 1. Typical image of a spread macrophage obtained with defocusing microscopy. Cell nucleus is located southwest of the central region. The large light circles in the image are macropinosomes formed from ruffles. The squares delimit portions of the membrane where the observed contrast patterns indicate the presence of membrane fluctuations. (a) Contrast pattern indicating the presence of SRMF. (b) Contrast pattern indicating the presence of a ruffle. The amount of defocusing is 1 µm. A movie of a spread macrophage (macrophage.mpg), accelerated $\approx 16\times$, and a 3D animation of observed contrast/curvature fluctuations (curvatures.mpg) are provided as supplementary material (see Appendix B).

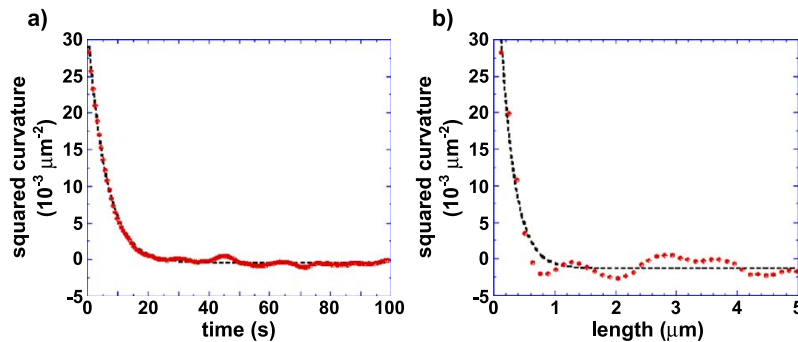


Fig. 2. Characterization of SRMF is made from temporal and spatial autocorrelation functions obtained for the spread membrane of macrophages. (a) Temporal autocorrelation function (decay time $\tau = 6$ s, rms curvature $k = 0.2 \mu\text{m}^{-1}$). (b) Spatial autocorrelation function (correlation length $\zeta = 0.2 \mu\text{m}$, rms curvature $k = 0.2 \mu\text{m}^{-1}$). The rms curvatures k are obtained from the amplitude of the autocorrelation functions.

and parallel to their motion were used to track their mechanics in real time. From these profiles, we extracted information of ruffles shapes, heights, widths, and speed. Ruffles presented two main profile types: hyperbolic (Fig. 3a) and gaussian (Fig. 3c) similar to those found in inflammatory macrophages [9]. Most edge ruffles characterized started showing hyperbolic profiles, which grew in size with time, but changed to gaussian ones as they left the border of the cell behind to dissipate into the membrane. Our observations indicate that hyperbolic ruffles represent an early, unstable, form of ruffle that evolves into more stable gaussian ones. They also can be associated with the border of the cell when ruffles are created. Therefore, the correspondent membrane profile of a hyperbolic ruffle, shown in Fig. 3b, represents only a first approximation to a possible early form of membrane ruffle, reason why it does not conform exactly to the type of structures usually seen on scanning electron microscopy in other works, like gaussian ruffles do. The two types of curvature profile can be found at the same time along the same ruffle. Although both edge and dorsal ruffles presented the same characteristic curvature profiles, most of the structures quantified corresponded to edge ruffles since their long linear length facilitates obtaining good curvature profiles when compared to the disordered shapes of dorsal ruffles. The linear length and frequency of occurrence of ruffles are obtained directly from the filmed images of the macrophages. The frequency of occurrence of ruffles represents the number of structures formed at the same region of the membrane per minute and not the total number of ruffles formed throughout the entire cell per unit of time. Usually, each region analyzed corresponded to one quarter of cell surface. Typical parameters obtained for the ruffles are shown in Table 2.

The relative proportion of ruffles to SRMF was determined from the analysis of the probability distribution function (PDF) for the contrasts observed over all membrane surface available (see Appendix A). We found that ruffles represent, in average, $3 \pm 2\%$ of the fluctuations present over the surface of the macrophages studied. The rms curvatures obtained for each kind of fluctuation from the analysis of the PDF were $k = 0.25 \pm 0.04 \mu\text{m}^{-1}$ for SRMF and $k = 0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}^{-1}$ for ruffles.

Phagocytosis events

During phagocytosis, the membrane of the phagocytic cell must completely surround the target object being engulfed to close into a phagosome. This requirement, however, does not impose restrictions to the amount and intensity of membrane bending and neither limits the location of the bending sites, as long as there are enough to subdue the target. Such liberty allows that cells perform phagocytosis in different ways [5–8,13–19]. Using optical tweezers to set the proper initial conditions, as described early in the text, we observed that phagocytosis of the leishmanias occurred in two forms (Fig. 4). In one form, which correspond to approximately 80% of the events, once the ingestion of the parasite has started, ruffling activity was significantly increased not only in the region closely adjacent to the forming phagosome but also in a larger area of membrane surrounding it. The increased ruffling activity at these regions usually persisted for a while even after the parasite had been engulfed, returning to the levels observed before the macrophage had contact with the leishmania after 1–2 min more (Fig. 5a). In the other form, the engulfment of the parasite occurs with no visible signs of ruffling activity

Table 1
SRMF characteristics at 37°C

Decay time	Length	Curvature	Size
$\tau = 7 \pm 2$ s	$\zeta = 0.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$	$\kappa = 0.2 \pm 0.1 \mu\text{m}^{-1}$	$1 \leq a_0 \leq 30$ nm

The size range was estimated from the measured values of length and curvature.

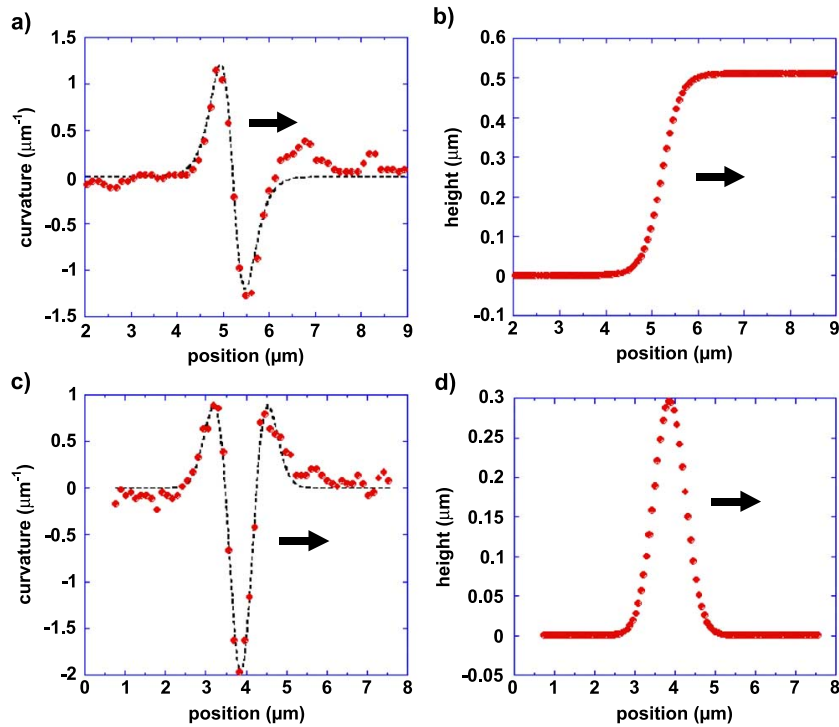


Fig. 3. Curvature profiles of edge ruffles and the corresponding membrane profiles. (a) Curvature profile of a hyperbolic ruffle and (b) the corresponding membrane profile. (c) Curvature profile of a gaussian ruffle and (d) the corresponding membrane profile. Most edge ruffles start and grow showing hyperbolic profiles, which change into gaussian ones before the ruffle dissipates into the membrane. The arrows indicate the direction of motion of the profiles and the corresponding ruffles.

outside the immediate vicinity of the forming phagosome. Ruffling activity in the surrounding regions remained unchanged before, during, and after the phagocytosis event (Fig. 5c). We found that the time taken to engulf the parasites could be related to the increase in ruffling activity nearby the forming phagosomes during each phagocytosis event. Plotting the phagocytosis time against the increase in the amount of ruffling in the area surrounding the phagosome, we observed that phagocytosis occurring in regions where there were no increase in ruffling activity took approximately twice the time of those occurring in regions showing increased ruffling activity during the event (Fig. 6).

Effects of temperature decrease on the SRMF, membrane ruffles, and phagocytosis events

Temperature decrease can be used as a reversible method to inhibit phagocytosis without the use of drugs,

which may alter normal cell functioning [15]. Evidence of similar effects on membrane fluctuations such as ruffles also exists [20]. We conducted quantitative analysis of both cases. The influence of temperature on the dynamics and form of both SRMF and ruffles and on the phagocytosis of the parasites was studied in the range of 24–37°C, well within temperature limits where phagocytosis occurs [21].

For the SRMF, the averaged length ξ and the rms curvature k remained unchanged within the error bars for all temperatures tested (Table 1). Since the amplitude a_0 of this kind of fluctuation is estimated based on these values, it also remained unchanged, ranging from 1 to 30 nm. In contrast, the decay time, which represent the average duration of the SRMF, was significantly altered, as shown in Table 3. The changes observed fit well to an Arrhenius-like activated process, commonly used to describe the temperature-dependent behavior of chemical

Table 2
Ruffle characteristics at 37°C

Height	Width	Length	Speed	Frequency
$0.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$	$0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$	$13 \pm 4 \mu\text{m}$	$6 \pm 2 \mu\text{m}/\text{min}$	$0.5 \pm 0.2 \text{ ruffles}/\text{min}$

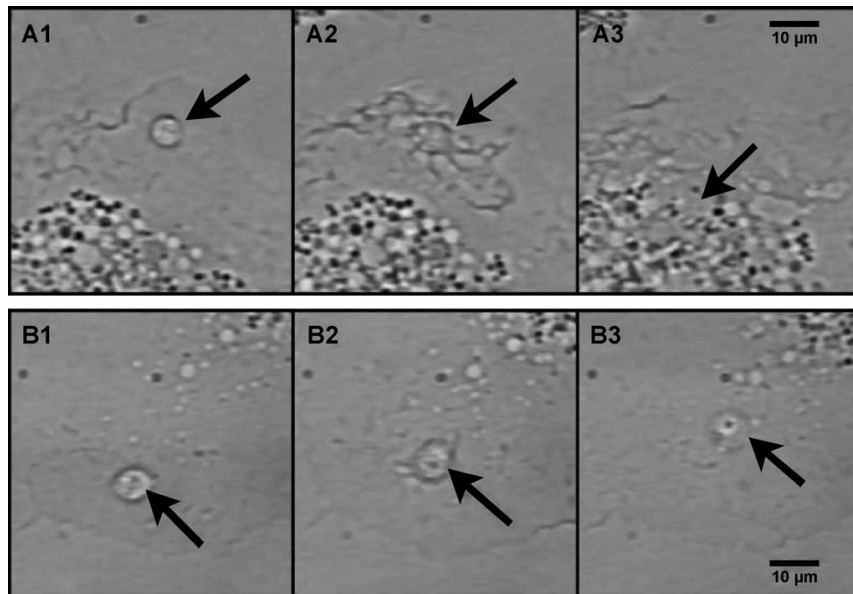


Fig. 4. Phagocytosis of the leishmanias occurred in two forms. (A) Phagocytosis showing increased ruffling activity ($\approx 80\%$ of events): (A1) before adhesion of the parasite, the membrane of the macrophage showed low (normal) levels of ruffling activity. (A2) After adhesion of the parasite, ruffling activity increased significantly over a large portion of the membrane. (A3) About 2 min after the ingestion of the parasite was completed, ruffling activity over the membrane returned to normal levels. (B) Phagocytosis showing constant (low) levels of ruffling activity ($\approx 20\%$ of events): (B1) before adhesion of the parasite, the membrane of the macrophage showed low (normal) levels of ruffling activity. (B2) After adhesion of the parasite, ruffling activity outside the immediate vicinity of the forming phagosome remained unchanged. (B3) After the ingestion of the parasite was complete, the level of ruffling activity was still unaltered. The arrows indicate the position of the parasite. A movie showing a *Leishmania* being engulfed (phagocytosis.mpg), accelerated $\approx 16\times$, is provided as supplementary material (see Appendix B).

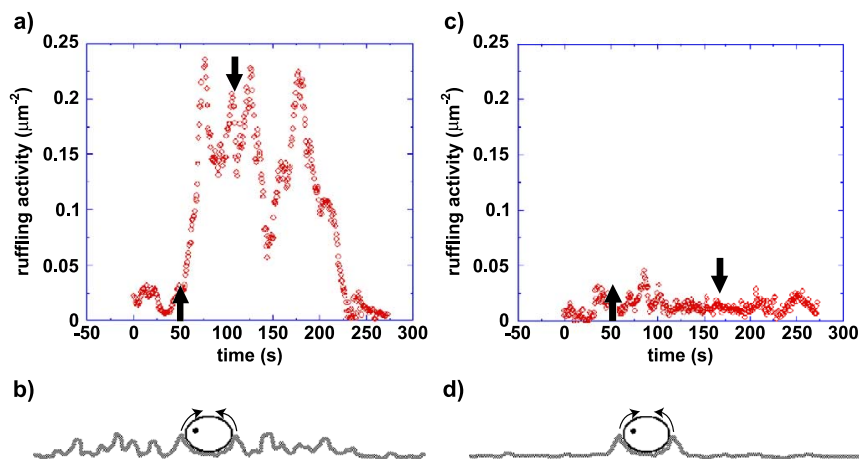


Fig. 5. (a) Membrane activity in the region surrounding the phagosome as a function of time during phagocytosis showing increased ruffling activity ($\approx 80\%$ of events). The parasite was totally engulfed in ≈ 60 s. Ruffling activity returned to previous levels approximately 2 min after parasite engulfment. The arrows mark when engulfment started (up arrow) and ended (down arrow). (b) Membrane conformation around the phagosome for phagocytosis showing increased ruffling activity. The parasite (center) is engulfed as the membrane moves up to close around it (arrows). A great number of ruffles are present in all directions. (c) Same as panel a for phagocytosis showing constant (low) levels of ruffling activity ($\approx 20\%$ of events). The parasite was totally engulfed in ≈ 120 s. Ruffling activity remained low at all times. (d) Same as panel b for phagocytosis showing constant (low) levels of ruffling activity. No ruffles are present outside the contact zone between the parasite and the membrane.

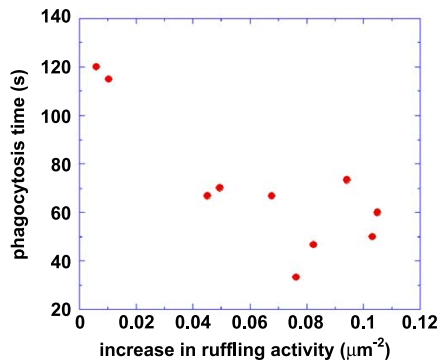


Fig. 6. Phagocytosis time as a function of the average change in ruffling activity near the site of phagocytosis. Events occurring at regions showing increased ruffling activity are concluded in shorter times than those occurring in areas of constant (low) ruffling activity.

reactions. The activation energy found, $E_a = 33 \pm 2 k_B T$ (Fig. 7a), corresponds to the energy barrier that has to be overcome for producing SRMF. Similarly, for the ruffles, the linear length L and the width w were unaltered by the decrease in temperature (Table 2). There was no significant change in the height of ruffles from one temperature to another. The overall averaged value was $h = 0.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$. The frequency of occurrence of these structures varied from 0.2 ruffles/min at 24°C to 0.5 ruffles/min at 37°C and the average value was 0.3 ± 0.1 ruffles/min. On both cases, the small changes observed were considered of minor significance, as they remained within the experimental error bars. On the other hand, the speed of ruffle propagation was considerably affected by the decrease in temperature, as shown in Table 3. As the decay time of SRMF, the changes observed fit well to an Arrhenius-like activated process, with activation energy $E_a = 36 \pm 5 k_B T$ (Fig. 7b).

Analysis of the PDF showed no significant change in the relative proportion between ruffles and SRMF at lower temperatures. The rms curvatures produced by each kind of fluctuation were also not altered in the range of temperatures analyzed (Fig. 7c). These observations indicate that the amount and size of fluctuations are not affected by temperature. In contrast, their dynamics are significantly affected, as we can see by the changes in the decay time of SRMF and in the speed of propagation of ruffles. The relative proportion of ruffles, averaged over all temperatures tested, was $2.7 \pm 0.6\%$. The rms curvatures for each kind of fluctuation, also averaged over all temperatures, were $0.20 \pm 0.03 \mu\text{m}^{-1}$ for SRMF and $0.51 \pm 0.05 \mu\text{m}^{-1}$ for ruffles.

In the phagocytosis assays, the temperature decrease led to a considerable increase in the time taken to engulf the parasites (Table 4). The few events observed occurred according to the more common (and typically faster) mechanism observed at 37°C, where ruffling activity nearby the forming phagosome was significantly increased. Again, the changes observed due to lowering the temperature fit well to an Arrhenius-like activated process, with activation energy $E_a = 38 \pm 4 k_B T$ (Fig. 7d).

All changes observed, both for membrane fluctuations and phagocytosis, indicated an overall reduction in membrane motility, a property directly related to the actin cytoskeleton dynamics.

Discussion

We have applied the recently developed defocusing microscopy technique to characterize membrane surface fluctuations in murine bone marrow macrophages. The defocusing technique, which allows direct, real-time, observation and quantification of membrane surface dynamics from a simple bright field microscope, proved to be an useful and powerful new tool to study cell membrane motility. Two kinds of membrane fluctuations were detected and analyzed quantitatively. The first kind of fluctuation, detected uniformly over all membrane surface at all times, generates small membrane displacements in the range of 1–30 nm with average lifetime of 7 ± 2 s, which correspond to frequencies ranging from 0.1 to 0.2 Hz. These small random membrane fluctuations (SRMF) seem to share the same characteristics of the cell membrane fluctuations (CMF) reported to occur in several types of cells, including erythrocytes, lymphocytes, fibroblasts, monocytes, and cardiomyocytes [22–24]. In all cases reported, CMF maximum amplitudes were found when the membrane area probed was limited to values in the order of $0.2 \mu\text{m}^2$, indicating that single fluctuations are confined to that area. Therefore, CMF have linear dimension around $0.4 \mu\text{m}$, a value compatible with the $0.2 \mu\text{m}$ found for the correlation length of SRMF obtained with defocusing microscopy, which indicates that these domains are statistically independent for these fluctuations. These observations support the fact that the cellular membrane is bound to the actin meshwork just below it for distances around 0.2–0.3 μm , producing two-dimensional membrane compartmentalization, as demonstrated by Fujiwara et al. [25], thus confining single fluctuations. The second kind of fluctuation, detected sporadically over the membrane, form large structures, commonly referred as

Table 3
Decay time of SRMF and speed of propagation of ruffles at different temperatures

Temperature (°C)	24	27	29	31	33	35	37
Decay time (s)	32 ± 4	25 ± 4	19 ± 3	16 ± 2	12 ± 1	9.4 ± 1.6	7.9 ± 0.6
Speed ($\mu\text{m}/\text{min}$)	1.0 ± 0.4	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.4	2.5 ± 1.0	2.6 ± 1.4	3.1 ± 1.0	4.2 ± 1.0

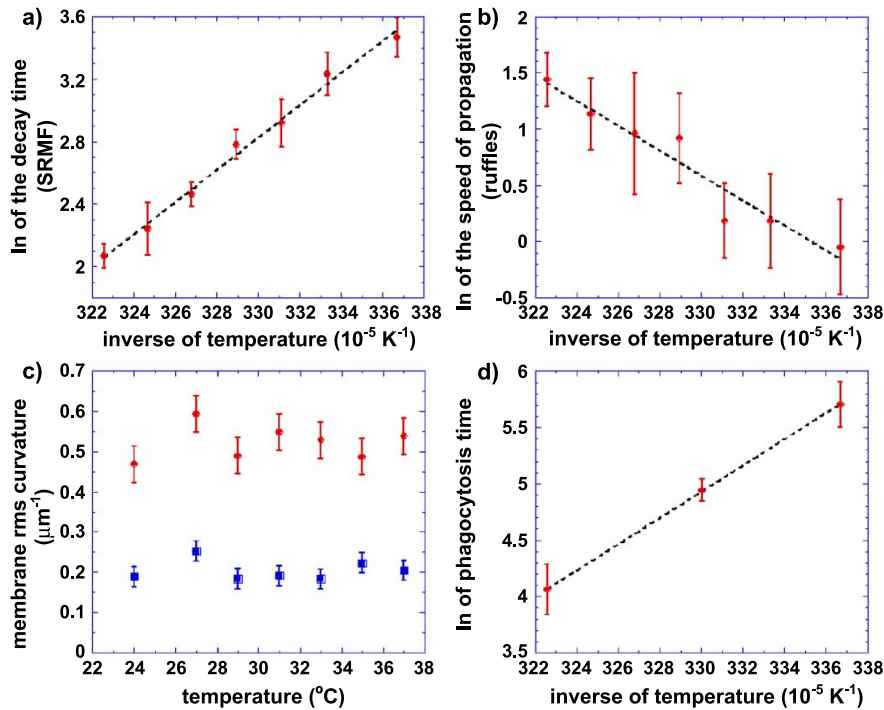


Fig. 7. (a) Arrhenius plot for the changes in the decay time of SRMF as a function of temperature (activation energy $E_a = 33 \pm 2 \kappa_B T$). (b) Arrhenius plot for the changes in ruffle speed as a function of temperature (activation energy $E_a = 36 \pm 5 \kappa_B T$). (c) Characteristic rms curvatures produced by SRMF (■) and ruffles (●) as a function of temperature. (d) Arrhenius plot for the phagocytosis time as a function of temperature (activation energy $E_a = 38 \pm 4 \kappa_B T$).

membrane ruffles, which can propagate, usually moving from the borders to the center of the cell and are associated with macropinocytosis and phagocytosis [5–8]. The data extracted from the analysis of these structures, such as length, speed, height, and frequency of occurrence, are well within the range of values obtained from other techniques and other cell types [20,26].

The combined use of defocusing microscopy and optical tweezers allowed real-time observation of single phagocytosis events. We observed two distinct forms of engulfment occurring under the same conditions, both for macrophages and parasites. Quantitative analysis of the phagocytosis events revealed that faster engulfments were associated to a significant increase in membrane ruffling in a large area around the forming phagosome. Since *Leishmania* is an obligatory intracellular parasite that resides inside macrophage lysosomes, the increase in ruffling activity could be induced by the parasite as an attempt to accelerate engulfment and facilitate infection [5,27,28]. According to other studies regarding the phagocytosis of *Leishmania*

parasites [29–32], the uptake of amastigotes by macrophages seems to be an Fc receptor-mediated process, driven by actin polymerization. Nevertheless, other entry routes may exist [31]. It is possible that the two distinct forms of parasite uptake observed in the present study represent two distinct entry routes. Better understanding of the data shown in Figs. 4–6, however, will require more detailed experiments.

Temperature decrease had none or little effect on structural parameters of the analyzed fluctuations, such as length, curvature, and amplitude ranges. Dynamic parameters, such as duration of SRMF, speed of ruffles, and phagocytosis time of parasites, however, were significantly altered. Such behavior can be understood if we consider that, although cell metabolism could be reduced by lowering the temperature, slowing down all dynamic parameters analyzed, all major biological functions involved in membrane surface dynamics, including actin polymerization, remained still active, thus maintaining the overall structure of the fluctuations, as indicated by the experimental data. These observations support the idea that both SRMF and ruffles are connected to cytoskeleton dynamics and therefore could not be purely thermally induced phenomena. In fact, the amount of energy spent to form a single ruffle has been estimated around 100 times the thermal energy [9]. As for the SRMF, studies of similar small membrane fluctuations (CMF) on

Table 4
Phagocytosis time at different temperatures

Temperature (°C)	24	30	37
Phagocytosis time (s)	300 ± 60	140 ± 14	58 ± 13

other cell types also indicated a relation between cytoskeleton dynamics and this kind of fluctuation [23,24,33,34]. On both cases, however, the exact mechanisms behind the formation of these fluctuations are yet unknown. The striking observation was that all dynamic parameters affected were changed according to an Arrhenius-like activated process with approximately the same activation energy, around $36 k_B T$. Actin polymerization involves an activation energy of $25 k_B T$ [35]. The viscosity of the cytoplasm for an actin monomer is two to eight times that of water [36,37]. Assuming this proportionality holds in the range from 24 to 37°C, the diffusion constant of actin monomers will be reduced due to the increase in the viscosity of the cytoplasm at lower temperatures. The activation energy associated with the diffusion of actin monomers can be estimated around $6 k_B T$, totalizing $31 k_B T$ for actin dynamics within the cell. This value is close to the activation energy of $30 k_B T$ reported for pinocytosis in fibroblasts [38]. Analysis of these energy values supports the well-known fact that all processes involving metabolic driven creation/dissociation of membrane fluctuations involves mainly actin polymerization. Also, the observed increase in the activation energy from SRMF to ruffles and phagocytosis suggests that more complex phenomena involves processes other than actin polymerization and diffusion.

In conclusion, we showed that defocusing microscopy is a powerful technique for quantitative characterization of cell membrane motility. We provide evidence of how the dynamics and amount of these fluctuations are closely related to phagocytosis and that actin polymerization is the main driving force behind these processes.

Acknowledgments

We would like to thank Denise Fonseca Cortes (Laboratório de Nutrição e Gnotobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG) for kindly providing the parasites used in the experiments. This work was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), FINEP-PRONEX, CNPq/FAPEMIG-PRONEX, and Instituto do Milênio de Nanociência-MCT.

Appendix A

Converting image contrast to curvature

According to the defocusing microscopy theory [9], the contrast along the surface of the membrane of the macrophages is

$$C(x,y) = \frac{I - I_0}{I_0} = \Delta n \Delta f \nabla^2 h(x,y), \tag{1}$$

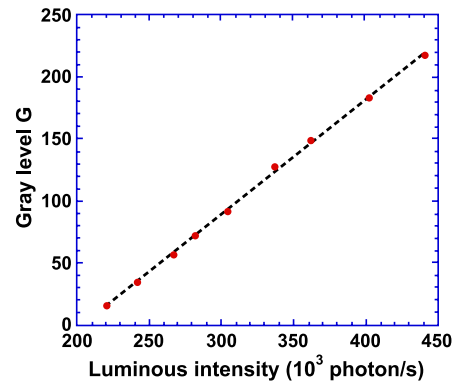


Fig. 8. Calibration of the gray levels as a function of the luminous intensity for our setup. From the fit of these data by Eq. (2), we obtained $\alpha = 0.93 \pm 0.01 \times 10^{-3}$ s/photons and $\beta = -191 \pm 4$.

where I and I_0 represent the luminous intensity at x, y and the background luminous intensity, respectively, Δn is the difference between refractive indexes of the macrophage and the surrounding medium, Δf is the amount of defocusing, and $h(x, y)$ is the local thickness of the membrane. The local curvature is approximated by $k \approx -\nabla^2 h(x, y)$. Using Eq. (1) and this approximation, we are able to convert the contrast of any point over the spread membrane of the macrophages in the local curvature k . For all experiments, we have used $\Delta n \sim 0.1$ and $\Delta f \sim 1 \mu\text{m}$ [9].

Calibration of video system gray levels

The gray level G displayed by the video system, which is what is actually measured, is related to the luminous intensity I by

$$G = \alpha I + \beta, \tag{2}$$

where α and β are constants, which depend on the camera settings and whose values are obtained by plotting the gray level observed for different luminous intensities and adjusting the data according to Eq. (2), as shown in Fig. 8.

Gray level contrast of the digitized images is defined as

$$C_G(x,y) = \frac{G - G_0}{G_0}, \tag{3}$$

where G and G_0 represent the grey level at x, y and the background gray level of the image, respectively. Combining Eqs. (1)–(3), we obtain the expression translating the gray level contrast obtained from the digitalized images to luminous intensity contrast, as required by Eq. (1),

$$C(x,y) = \Delta n \Delta f \nabla^2 h(x,y) = \frac{G_0}{G_0 - \beta} C_G. \tag{4}$$

Autocorrelation functions

Temporal and spatial autocorrelation contrast functions over the surface of the macrophage are reasonably well fit by single exponentials,

$$\langle C(\rho, t) \times C(\rho, t + \tau) \rangle = A_0 e^{-\frac{t}{\tau}} + B_0 \quad (5)$$

and

$$\langle C(\rho, t) \times C(\rho + \xi, t) \rangle = A_0 e^{-\frac{\rho}{\xi}} + B_0, \quad (6)$$

where τ and ξ represent the decay time and the correlation length for the SRMF, respectively. The constant A_0 gives the squared amplitude of curvature of the fluctuations and B_0 is an offset constant.

Probability distribution function (PDF) for the contrast/curvature

The probability distribution function (PDF) for the contrast/curvature C over the surface of the macrophage is well described by

$$P_C = \frac{A_0}{\sqrt{2\pi}} \left(\frac{e^{-\frac{(C-\sigma_0)^2}{2\sigma^2}}}{\sigma} + \alpha \frac{e^{-\frac{(C-\mu_0)^2}{2\mu^2}}}{\mu} \right), \quad (7)$$

where the first gaussian represents the distribution of the random small surface fluctuations and the second the distribution of ruffles. Since the contrast generated by ruffles are much higher than that generated by the SRMF, we can assign a gaussian distribution to each kind of fluctuation. The widths σ and μ give the rms curvature of each kind of surface fluctuation, averaged over the whole membrane surface available for analysis. The parameters σ_0 and μ_0 are the points at which each distribution is centered. A_0 represents the number of points considered in the statistics and α stands for the relative proportion between the amount of small fluctuations and ruffles.

Appendix B. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.yexcr.2004.09.002](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.09.002).

References

[1] J.V. Small, T. Stradal, E. Vignal, K. Rottner, The lamellipodium: where motility begins, Trends Cell Biol. 12 (3) (2002) 112–120.
 [2] T.D. Pollard, G.G. Borisy, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, Cell 112 (2003) 453–465.
 [3] K.A. DeMali, C.A. Barlow, K. Burridge, Recruitment of the arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion, J. Cell Biol. 159 (5) (2002) 881–891.
 [4] S.W. Craig, H. Chen, Lamellipodia protrusion: moving interactions of vinculin and arp2/3, Curr. Biol. 13 (2003) R236–R238.

[5] C.L. Francis, T.A. Ryan, B.D. Jones, S.J. Smith, S. Falkow, Ruffles induced by salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria, Nature 364 (1993) 639–642.
 [6] C.M. Alpuche-Aranda, E.L. Racoosin, J.A. Swanson, S.I. Miller, Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes, J. Exp. Med. 179 (1994) 601–608.
 [7] J.A. Swanson, S.C. Baer, Phagocytosis by zippers and triggers, Trends Cell Biol. 5 (1995) 89–93.
 [8] J.A. Swanson, C. Watts, Macropinocytosis, Trends Cell Biol 5 (1995) 424–428.
 [9] U. Agero, C.H. Monken, C. Ropert, R.T. Gazzinelli, O.N. Mesquita, Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy, Phys. Rev., E 67 (5) (2003) 051904.
 [10] A. Ashkin, Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 4853–4860.
 [11] ImageJ 1.32, <http://rsb.info.nih.gov/ij>.
 [12] N. Araki, T. Hatae, T. Yamada, S. Hirohashi, Actinin-4 is preferentially involved in circular ruffling and macropinocytosis in mouse macrophages: analysis by fluorescence ratio imaging, J. Cell Sci. 113 (2000) 3329–3340.
 [13] F.M. Griffin, S.C. Silverstein, Segmental response of the macrophage plasma membrane to a phagocytic stimulus, J. Exp. Med. 139 (1974) 323–326.
 [14] F.M. Griffin, C. Bianco, S.C. Silverstein, Characterization of the macrophage receptor for complement and demonstration of its functional dependence from the receptor for the Fc portion of immunoglobulin G, J. Exp. Med. 141 (1975) 1269–1277.
 [15] F.M. Griffin, J.A. Griffin, J.E. Leider, S.C. Silverstein, Studies on the mechanism of phagocytosis I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane, J. Exp. Med. 142 (1975) 1263–1282.
 [16] F.M. Griffin, J.A. Griffin, S.C. Silverstein, Studies on the mechanism of phagocytosis II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes, J. Exp. Med. 144 (1976) 788–809.
 [17] M.A. Horwitz, Phagocytosis of the legionnaire's disease bacterium (Legionella pneumophila) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil, Cell 36 (1994) 27–33.
 [18] M.G. Rittig, J.C. Jagoda, B. Wilske, R. Murgia, M. Cinco, R. Repp, G.R. Burmester, A. Krause, Coiling phagocytosis discriminates between different spirochetes and is enhanced by phorbol myristate acetate and granulocytemacrophage colony-stimulating factor, Infect. Immun. 66 (2) (1998) 627–635.
 [19] M.G. Rittig, K. Schröppel, K.-H. Seak, U. Sander, E.-N. N'Diaye, I. Maridonnet-Parini, W. Solbach, C. Bogdan, Coiling phagocytosis of tripanosomatids and fungal cells, Infect. Immun. 66 (9) (1998) 4331–4339.
 [20] S. Felder, E.L. Elson, Mechanics of fibroblast locomotion: quantitative analysis of forces and motions at the leading lamellas of fibroblasts, J. Cell Biol. 111 (6) (1990) 2513–2526.
 [21] S.C. Silverstein, R.M. Steinman, Z.A. Cohn, Endocytosis, Annu. Rev. Biochem. 46 (1977) 669–722.
 [22] A.J. Krol, M.G. Grinfeldt, S.V. Levin, A.D. Smilgavichus, Local mechanical oscillations of the cell surface within range 0.2–30 Hz, Eur. Biophys. J. 19 (1990) 93–99.
 [23] L. Mittelman, S. Levin, R. Korenstein, Fast cell membrane displacements in B lymphocytes, FEBS 293 (1–2) (1991) 207–210.
 [24] S. Levin, R. Korenstein, Membrane fluctuations in erythrocytes are linked to MgATP-dependent dynamic assembly of the membrane skeleton, Biophys. J. 60 (1991) 733–737.
 [25] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, A. Kusumi, Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane, J. Cell Biol. 157 (6) (2002) 1071–1081.
 [26] C. Ballestrem, B. Wehrle-Haller, B. Hinz, B.A. Imhof, Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration, Mol. Biol. Cell 11 (2000) 2999–3012.

- [27] A. Aderem, D.M. Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 593–623.
- [28] D.M. Underhill, A. Ozinsky, Phagocytosis of microbes: complexity in action, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 825–852.
- [29] R.A. Guy, M. Belosevic, Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages, *Infect. Immun.* 61 (4) (1993) 1553–1558.
- [30] D.C. Love, M. Mentink Kane, D.M. Mosser, *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages, *Exp. Parasitol.* 88 (1998) 161–171.
- [31] J. Alexander, A.R. Satoskar, D.G. Russel, *Leishmania* species: models of intracellular parasitism, *J. Cell Sci.* 112 (1999) 2993–3002.
- [32] N. Courret, C. Fréhel, N. Gouhier, M. Pouchelet, E. Prina, P. Roux, J.-C. Antonine, Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 2303–2316.
- [33] S. Tuvia, S. Levin, R. Korenstein, Oxygenation-deoxygenation cycle of erythrocytes modulates submicron cell membrane fluctuations, *Biophys. J.* 63 (1992) 599–602.
- [34] S. Tuvia, A. Almagor, A. Bitler, S. Levin, R. Korenstein, S. Yedgar, Cell membrane fluctuations are regulated by medium macroviscosity: evidence for a metabolic driving force, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 5045–5049.
- [35] D.J. Gordon, Y.-Z. Yang, E.D. Korn, Polymerization of *Acanthamoeba* actin, *J. Biol. Chem.* 251 (23) (1976) 7474–7479.
- [36] Y.-L. Wang, F. Lanni, P.L. McNeil, B.R. Ware, D.L. Taylor, Mobility of cytoplasmic and membrane-associated actin in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (1982) 4660–4664.
- [37] A.M. Mastro, M.A. Babich, W.D. Taylor, A.D. Keith, Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (1984) 3414–3418.
- [38] R.M. Steinman, J.M. Silver, Z.A. Cohn, Pinocytosis in fibroblasts: quantitative studies in vitro, *J. Cell Biol.* 63 (1974) 949–969.

Lista de Figuras

1.1	O macrófago assassino gigante	2
2.1	O processo de fagocitose	4
2.2	Maturação dos macrófagos	5
2.3	O citoesqueleto	6
2.4	Organização do citoesqueleto	8
2.5	Estrutura dos filamentos intermediários	9
2.6	Estrutura dos microtúbulos	11
2.7	Estrutura dos filamentos de actina	12
2.8	Ruffles em um fibroblasto	13
3.1	Estrutura do córtex celular	16
3.2	Modelo para o ciclo da actina dentro da célula	19
3.3	Mecanismo da catraca browniana	21
3.4	Diagrama das transições possíveis entre as populações de filamentos de actina	22
3.5	Geometria dos filamentos de actina na catraca browniana elástica	24
3.6	A catraca browniana elástica com filamentos aderidos	27
4.1	Princípio do pinçamento óptico	33
4.2	Diagrama da montagem experimental.	34
5.1	Padrões de contraste sobre a membrana de um macrófago desfocalizado	44
5.2	Comportamento típico da função $F_t(t)$	45
5.3	Comportamento típico da função $F_e(\rho)$	45

5.4	Perfis de curvatura dos ruffles: perfil hiperbólico	48
5.5	Perfis de curvatura dos ruffles: perfil gaussiano	48
5.6	Formato aproximado dos ruffles de perfil hiperbólico	49
5.7	Formato aproximado dos ruffles de perfil gaussiano	49
5.8	Distribuição das curvaturas da membrana a $37^{\circ}C$	51
5.9	Ajuste do comportamento do tempo de relaxação τ das FAC em função da temperatura	57
5.10	Ajuste do comportamento da velocidade de propagação v dos ruffles em função da temperatura	58
5.11	Curvaturas rms médias características das FAC e dos ruffles em diferentes temperaturas	58
5.12	Comportamentos observados nos macrófagos durante a fago- citose de leishmanias amastigotas	60
5.13	Evolução temporal da curvatura da membrana dos macrófagos durante um evento de fagocitose com aumento da quantidade de ruffles	61
5.14	Evolução temporal da curvatura da membrana dos macrófagos durante um evento de fagocitose sem alteração da quantidade de ruffles	62
5.15	Tempo de fagocitose em função do aumento observado na cur- vatura quadrática média da região da membrana periférica ao fagosomo	63
5.16	Ajuste do comportamento do tempo de fagocitose em função da temperatura	65
A.1	Princípio do método de recuo	77
C.1	Calibração do sistema de vídeomicroscopia	83

Lista de Tabelas

2.1	Características dos filamentos do citoesqueleto	7
3.1	Taxas de crescimento das extremidades de filamentos de actina	17
3.2	Algumas proteínas associadas à actina	18
5.1	Características das FAC a $37^{\circ}C$ obtidas a partir das funções $F_t(t)$ e $F_e(\rho)$	46
5.2	Características médias dos ruffles a $37^{\circ}C$	50
5.3	Parâmetros característicos da distribuição das curvaturas da membrana a $37^{\circ}C$	52
5.4	Concentrações finais dos fármacos utilizados nos experimentos	53
5.5	Comportamento dos macrófagos submetidos à ação de fárma- cos e outros tratamentos	53
5.6	Características médias dos <i>ruffles</i> a $37^{\circ}C$ em macrófagos tra- tados com PMA e macrófagos privados de CSF	54
5.7	Curvaturas médias típicas geradas pelas FAC e pelos ruffles a $37^{\circ}C$ em macrófagos tratados com PMA e macrófagos privados de CSF	54
5.8	Tempo de relaxação τ médio das FAC e velocidade de propa- gação v média dos ruffles em diferentes temperaturas	56
5.9	Tempo de fagocitose dos parasitas em diferentes temperaturas	64

Referências Bibliográficas

- [1] **Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S.**, Cellular and Molecular Immunology, pp. 15–33. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 3rd ed. (1997).
 - [2] **Stossel, T. P.**, “PHAGOCYTOSIS (First of Three Parts).” *New Engl. J. Med.* 290 (13), 717–723 (1974).
 - [3] **Stossel, T. P.**, “PHAGOCYTOSIS (Second of Three Parts).” *New Engl. J. Med.* 290 (14), 774–780 (1974).
 - [4] **Stossel, T. P.**, “PHAGOCYTOSIS (Third of Three Parts).” *New Engl. J. Med.* 290 (15), 833–839 (1974).
 - [5] **Rabinovitch, M.**, “Professional and non-professional phagocytes: an introduction.” *Trends Cell Biol.* 5, 85–87 (1995).
 - [6] **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D.**, Molecular Biology of the Cell, pp. 787–861. Garland Publishing, Inc., New York, 3rd ed. (1994).
 - [7] **Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., and Rottner, K.**, “The lamellipodium: where motility begins.” *Trends Cell Biol.* 12 (3), 112–120 (2002).
 - [8] **Pollard, T. D. and Borisy, G. G.**, “Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments.” *Cell* 112, 453–465 (2003).
 - [9] **DeMali, K. A., Barlow, C. A., and Burridge, K.**, “Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion.” *J. Cell Biol.* 159 (5), 881–891 (2002).
-

-
- [10] **Craig, S. W. and Chen, H.**, “Lamellipodia Protrusion: Moving Interactions of Vinculin and Arp2/3.” *Curr. Biol.* 13, R236–R238 (2003).
- [11] **Francis, C. L., Ryan, T. A., Jones, B. D., Smith, S. J., and Falkow, S.**, “Ruffles Induced by Salmonella and Other Stimuli Direct Macropinocytosis of Bacteria.” *Nature* 364, 639–642 (1993).
- [12] **Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swanson, J. A., and Miller, S. I.**, “*Salmonella* Stimulate Macrophage Macropinocytosis and Persist within Spacious Phagosomes.” *J. Exp. Med.* 179, 601–608 (1994).
- [13] **Swanson, J. A. and Baer, S. C.**, “Phagocytosis by zippers and triggers.” *Trends Cell Biol.* 5, 89–93 (1995).
- [14] **Swanson, J. A. and Watts, C.**, “Macropinocytosis.” *Trends Cell Biol.* 5, 424–428 (1995).
- [15] **Small, J. V., Herzog, M., and Anderson, K.**, “Actin Filament Organization in the Fish Keratocyte Lamellipodium.” *J. Cell Biol.* 129 (5), 1275–1286 (1995).
- [16] **Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., MacQuade, K. M., and Borisy, G. G.**, “Analysis of the Actin-Myosin II System in Fish Epidermal Keratocytes: Mecanism of Cell Body Translocation.” *J. Cell Biol.* 139 (2), 397–415 (1997).
- [17] **Mullins, R. D., Heuser, J. A., and Pollard, T. D.**, “The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6181–6186 (1998).
- [18] **Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D.**, “Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells.” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576 (2000).
- [19] **Pollard, T. D.**, “Rate Constants for the Reactions of ATP- and GDP-Actin with the Ends of Actin Filaments.” *J. Cell Biol.* 103 (6), 2747–2754 (1986).
-

- [20] **Gordon, D. J., Yang, Y.-Z., and Korn, E. D.**, “Polymerization of *Acanthamoeba* Actin.” *J. Biol. Chem.* 251 (23), 7474–7479 (1976).
- [21] **Peskin, C. S., Odell, G. M., and Oster, G. F.**, “Cellular Motions and Thermal Fluctuations: The Brownian Ratchet.” *Biophys. J.* 65, 316–324 (1993).
- [22] **Mogilner, A. and Oster, G.**, “The physics of lamellipodial protrusion.” *Eur. Biophys. J.* 25, 47–53 (1996).
- [23] **Mogilner, A. and Oster, G.**, “Cell Motility Driven by Actin Polymerization.” *Biophys. J.* 71, 3030–3045 (1996).
- [24] **Mogilner, A. and Oster, G.**, “Force Generation by Actin Polymerization II: The Elastic Ratchet and Tethered Filaments.” *Biophys. J.* 84, 1591–1605 (2003).
- [25] **Cameron, L. A., Svitkina, T. M., Vignjevic, D., Theriot, J. A., and Borisy, G. G.**, “Dendritic organization of actin comet tails.” *Curr. Biol.* 11, 130–135 (2001).
- [26] **Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., and Kusumi, A.**, “Phospholipids Undergo Hop Diffusion in Compartmentalized Cell Membrane.” *J. Cell Biol.* 157 (6), 1071–1081 (2002).
- [27] **Agero, U.**, “Microscopia de Desfocalização Aplicada ao Estudo de Fagocitose por Macrófagos.” Tese de Doutorado, Departamento de Física, ICEX, UFMG (2003).
- [28] **Agero, U., Monken, C. H., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Cell Surface Fluctuations Studied With Defocusing Microscopy.” *Phys. Rev. E* 67 (5), 051904 (2003).
- [29] **Ashkin, A.**, “Optical Trapping and Manipulation of Neutral Particles Using Lasers.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4853–4860 (1997).
- [30] **Araki, N., Hatae, T., Yamada, T., and Hirohashi, S.**, “Actinin-4 is preferentially involved in circular ruffling and macropinocytosis in
-

- mouse macrophages: analysis by fluorescence ratio imaging." *J. Cell Sci.* 113, 3329–3340 (2000).
- [31] **Rabinovitch, M.**, "THE DISSOCIATION OF THE ATTACHMENT AND INGESTION PHASES OF PHAGOCYTOSIS BY MACROPHAGES." *Exp. Cell Res.* 46, 19–28 (1967).
- [32] **Rabinovitch, M. and De Stefano, M. J.**, "PHAGOCYTOSIS OF ERYTHROCYTES BY *ACANTHAMOEBA* SP." *Exp. Cell Res.* 64, 275–284 (1971).
- [33] **Mantovani, B., Rabinovitch, M., and Nussenzweig, V.**, "PHAGOCYTOSIS OF IMMUNE COMPLEXES BY MACROPHAGES: Different Roles of the Macrophage Receptor Sites for Complement (C3) and for Immunoglobulin (IgG)." *J. Exp. Med.* 135, 780–792 (1972).
- [34] **Griffin, F. M. and Silverstein, S. C.**, "Segmental Response of the Macrophage Plasma Membrane to a Phagocytic Stimulus." *J. Exp. Med.* 139, 323–326 (1974).
- [35] **Griffin, F. M., Griffin, J. A., Leider, J. E., and Silverstein, S. C.**, "STUDIES ON THE MECHANISM OF PHAGOCYTOSIS I. Requirements for Circunferential Attachment of Particle-Bound Ligands to Specific Receptors on the Macrophage Plasma Membrane." *J. Exp. Med.* 142, 1263–1282 (1975).
- [36] **Griffin, F. M., Griffin, J. A., and Silverstein, S. C.**, "STUDIES ON THE MECHANISM OF PHAGOCYTOSIS II. The Interaction of Macrophages with Anti-Immunoglobulin IgG-Coated Bone Marrow-Derived Lymphocytes." *J. Exp. Med.* 144, 788–809 (1976).
- [37] **Horwitz, M. A.**, "Phagocytosis of the Legionnaire's Disease Bacterium (*Legionella pneumophila*) Occurs by a Novel Mechanism: Engulfment within a Pseudopod Coil." *Cell* 36, 27–33 (1994).
- [38] **Rittig, M. G., Jagoda, J. C., Wilske, B., Murgia, R., Cinco, M., Repp, R., Burmester, G. R., and Krause, A.**, "Coiling Phagocytosis Discriminates between Different Spirochetes and is Enhanced
-

- by Phorbol Myristate Acetate and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor.” *Infect. Immun.* 66 (2), 627–635 (1998).
- [39] **Rittig, M. G., Schröppel, K., Seak, K.-H., Sander, U., N’Diaye, E.-N., Maridonneau-Parini, I., Solbach, W., and Bogdan, C.**, “Coiling Phagocytosis of Trypanosomatids and Fungal Cells.” *Infect. Immun.* 66 (9), 4331–4339 (1998).
- [40] **Silverstein, S. C., Steinman, R. M., and Cohn, Z. A.**, “Endocytosis.” *Ann. Rev. Biochem.* 46, 669–722 (1977).
- [41] **Krol, A. J., Grinfeldt, M. G., Levin, S. V., and Smilgavichus, A. D.**, “Local Mechanical Oscillations of the Cell Surface within range 0.2 – 30 Hz.” *Eur. Biophys. J.* 19, 93–99 (1990).
- [42] **Mittelman, L., Levin, S., and Korenstein, R.**, “Fast Cell Membrane Displacements in B Lymphocytes.” *FEBS* 293 (1-2), 207–210 (1991).
- [43] **Levin, S. and Korenstein, R.**, “Membrane Fluctuations in Erythrocytes are Linked to MgATP-dependent Dynamic Assembly of the Membrane Skeleton.” *Biophys. J.* 60, 733–737 (1991).
- [44] **Helfrich, W.**, “Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments.” *Z. Naturforsch.* 28c, 693–703 (1973).
- [45] **Bloom, M., Evans, E., and Mouritsen, O.**, “Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective.” *Q. Rev. Biophys.* 24 (3), 293–397 (1991).
- [46] **Fournier, J.-B., Ajdari, A., and Peliti, L.**, “Effective-Area Elasticity and Tension of Micromanipulated Membranes.” *Phys. Rev. Lett.* 86 (21), 4970–4973 (2001).
- [47] **Zhelev, D. V., Needham, D., and Hochmuth, R. M.**, “Role of the Membrane Cortex in Neutrophil Deformation in Small Pipets.” *Biophys. J.* 67, 696–705 (1994).
-

- [48] **Simson, R., Wallraff, E., Faix, J., Niewöhner, J., Gerisch, G., and Sackmann, E.**, “Membrane Bending Modulus and Adhesion Energy of Wild-Type and Mutant Cells of *Dictyostelium* Lacking Talin or Cortexillins.” *Biophys. J.* 74, 514–522 (1998).
- [49] **Schneider, M. B., Jenkins, J. T., and Webb, W. W.**, “Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles.” *J. Phys.* 45, 1457–1472 (1984).
- [50] **Brochard, F. and Lennon, J. F.**, “FREQUENCY SPECTRUM OF THE FLICKER PHENOMENON IN ERYTHROCYTES.” *J. Phys.* 36 (11), 1035–1047 (1975).
- [51] **Valbert, P. A. and Albertini, D. F.**, “Cytoplasmic Motions, Rheology, and Structure Probed by a Novel Magnetic Particle Method.” *J. Cell Biol.* 101, 130–140 (1985).
- [52] **Valberg, P. A. and Feldman, H. A.**, “MAGNETIC PARTICLE MOTIONS WITHIN LIVING CELLS.” *Biophys. J.* 52, 551–561 (1987).
- [53] **Nemoto, I., Ogura, K., and Toyotama, H.**, “Estimation of the Energy of Cytoplasmic Movements by Magnetometry: Effects of Temperature and Intracellular Concentration of ATP.” *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 36 (6), 598–607 (1989).
- [54] **Bausch, A. R., Ziemann, F., Boulbitch, A. A., Jacobson, K., and Sackmann, E.**, “Local Measurements of Viscoelastic Parameters of Adherent Cell Surfaces by Magnetic Bead Microrheometry.” *Biophys. J.* 75, 2038–2049 (1998).
- [55] **Bausch, A. R., Möller, W., and Sackmann, E.**, “Measurement of Local Viscoelasticity and Forces in Living Cells by Magnetic Tweezers.” *Biophys. J.* 76, 573–579 (1999).
- [56] **Felder, S. and Elson, E. L.**, “Mechanics of Fibroblast Locomotion: Quantitative Analysis of Forces and Motions at the Leading Lamellas of Fibroblasts.” *J. Cell Biol.* 111 (6), 2513–2526 (1990).
-

- [57] **Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B., and Imhof, B. A.**, “Actin-dependent Lamellipodia Formation and Microtubule-dependent Tail Retraction Control-directed Cell Migration.” *Mol. Biol. Cell* 11, 2999–3012 (2000).
- [58] **Borm, B., Requardt, R. P., Herzog, V., and Kirfel, G.**, “Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament organization.” *Exp. Cell. Res.* 302 (1), 83–95 (2005).
- [59] **Mosser, D. M. and Rosenthal, L. A.**, “Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses.” *Semin. Cell. Biol.* 4, 315–322 (1993).
- [60] **Cunningham, A. C.**, “Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania.” *Exp. Mol. Pathol.* 72, 132–141 (2002).
- [61] **Aderem, A. and Underhill, D. M.**, “Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages.” *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623 (1999).
- [62] **Underhill, D. M. and Ozinsky, A.**, “PHAGOCYTOSIS OF MICROBES: Complexity in Action.” *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825–852 (2002).
- [63] **Guy, R. A. and Belosevic, M.**, “Comparison of Receptors Required for Entry of *Leishmania major* Amastigotes into Macrophages.” *Infect. Immun.* 61 (4), 1553–1558 (1993).
- [64] **Love, D. C., Mentink Kane, M., and Mosser, D. M.**, “*Leishmania amazonensis*: The Phagocytosis of Amastigotes by Macrophages.” *Exp. Parasitol.* 88, 161–171 (1998).
- [65] **Alexander, J., Satoskar, A. R., and Russel, D. G.**, “*Leishmania* species: models of intracellular parasitism.” *J. Cell Sci.* 112, 2993–3002 (1999).
- [66] **Tuvia, S., Levin, S., and Korenstein, R.**, “Oxygenation-Deoxygenation Cycle of Erythrocytes Modulates Submicron Cell Membrane Fluctuations.” *Biophys. J.* 63, 599–602 (1992).
-

-
- [67] **Tuvia, S., Almagor, A., Bitler, A., Levin, S., Korenstein, R., and Yedgar, S.**, “Cell Membrane Fluctuations are Regulated by Medium Macroviscosity: Evidence for a Metabolic Driving Force.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5045–5049 (1997).
- [68] **Steinman, R. M., Silver, J. M., and Cohn, Z. A.**, “PINOCYTOSIS IN FIBROBLASTS: Quantitative Studies In Vitro.” *J. Cell Biol.* 63, 949–969 (1974).
- [69] **Wang, Y.-L., Lanni, F., McNeil, P. L., Ware, B. R., and Taylor, D. L.**, “Mobility of Cytoplasmic and Membrane-Associated Actin in Living Cells.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4660–4664 (1982).
- [70] **Mastro, A. M., Babich, M. A., Taylor, W. D., and Keith, A. D.**, “Diffusion of a Small Molecule in the Citoplasm of Mammalian Cells.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3414–3418 (1984).
- [71] **Coelho Neto, J.**, “Medida da Elasticidade Entrópica de Uma Molécula de DNA.” Dissertação de Mestrado, Departamento de Física, ICEx, UFMG (2001).
-