
**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ÓPTICAS EM
AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

Camilla Karla Brites Queiroz Martins de Oliveira

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ÓPTICAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Camilla Karla Brites Queiroz Martins de Oliveira

Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Co-orientador: Dr. Ubirajara Agero Batista

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

Belo Horizonte

Abril de 2008

"Estou preso à vida e olho meus companheiros. Estão taciturnos mas nutrem grandes esperanças."

Mãos Dadas - Carlos Drummond de Andrade

Sumário

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	x
1 Introdução	1
2 Macrófagos e Motilidade Celular	3
2.1 Os macrófagos	3
2.2 Actina e a Polimerização	4
2.3 Modelo da Catraca Browniana	7
3 Experimentos e Discussões I: Macrófagos	11
3.1 Microscopia de Desfocalização Aplicada ao Estudo dos Macrófagos	11
3.2 Espalhamento de Luz e Correlação de Fótons	14
3.3 Comparação entre a Microscopia de Desfocalização e o Espalhamento de Luz na Membrana dos Macrófagos	15
3.4 Metodologias Experimentais	16
3.4.1 Montagem Experimental	17
3.4.2 Porta-Amostras	18
3.4.3 Preparação das Células	18
3.4.4 Experimento Realizado	19
3.5 Resultados e Discussões	20
3.5.1 Análise de Dados	20
3.5.2 Resultados Obtidos	20

3.6	Conclusões Parciais	21
4	Estudo da Membrana das Hemácias	24
4.1	As hemácias	24
4.1.1	O citoesqueleto das hemácias	25
4.1.2	As mudanças de forma da hemácia	26
4.2	Energia das Flutuações em Membranas	27
4.2.1	Energia Livre das Flutuações Térmicas	27
4.2.2	Alturas e as Flutuações Normais	29
4.2.3	A Membrana das Hemácias	30
5	Experimentos e Discussões II: Hemácias	34
5.1	Microscopia de Desfocalização Aplicada ao Estudo da Hemácia	34
5.2	Microscopia de Desfocalização: Limite de $\Delta f \rightarrow \infty$	36
5.3	Metodologias Experimentais	37
5.3.1	Montagem Experimental	37
5.3.2	Porta-Amostras	37
5.3.3	Preparação das Células	38
5.3.4	Experimento Realizado	38
5.4	Resultados e Discussões	39
5.5	Conclusões Parciais	44
6	Conclusões e perspectivas	45
A	Protocolo para manutenção da cultura celular	47
B	Calibração das medidas de espalhamento usando microesferas de poliestireno: medidas do raio	49
	Lista de Figuras	52
	Lista de Tabelas	55
	Referências Bibliográficas	56

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, fonte de toda a inspiração e idealizador desse grande mistério que tentamos desvendar todos os dias em nossos laboratórios.

À meus pais, Joana e Carlos e irmãos Léo e Michelle por serem a base da minha existência. Cada passo dado nessa pequena estradinha já percorrida foi contando sempre com a certeza de ter vocês ao meu lado. Amo vocês com todas minhas forças. Aos outros membros da família, cunhado/estrupício Leonardo, tios, tias, meus avôs e avós, primos, especialmente o Luquinhas, obrigada pela força. Em especial ao tio Chico e a tia Tânia, sem os quais os primeiros passos não teriam sido possíveis.

Ao meu orientador Prof. Oscar. Por ser exemplo de paixão pela ciência, nos inspirando sempre a buscar o conhecimento com olhar crítico e a mente aberta a todas as possibilidades. Obrigada pela orientação sempre presente. E obrigada também por ter aberto as portas de sua casa; obrigada Eda e Nara pela amizade.

Ao Bira, pela co-orientação. Mesmo distante, você fez o que estava ao seu alcance para que esse trabalho fosse possível. Obrigada pela amizade.

Ao Mário, companheiro. "Eu carrego seu coração, carrego-o dentro do meu coração". Muito obrigada pelos momentos de apoio, de (muita) paciência e por me lembrar sempre o quanto é importante esse tijolinho. Ao Mário, professor. Você tem sido exemplo de força, competência e humildade. Eu te admiro todos os dias.

À família do Laboratório: Bira, Márcio, Clarinha (você sempre será parte desse lugar...), Lili, Henrico, Giuseppe e José Coelho. Mesmo com todas as dificuldades e diferenças conseguimos transformar nosso lab em um ambiente de muito sucesso. A minha pequena vitória é parte desse grande trabalho

que estamos realizando todos os dias. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Aos primeiros companheiros de caminhada: Ana Paula (quantas pedras e piadas ruins, hein Zezé???), Além (meu grande amigo e irmão), Bretas, Léo Gabriel, Lucas, Henrique Di Lorenzo, Wendell, Caio, Fred Sacramento, Léo Guillen (você será sempre um de nós, e um grande amigo). Valeu amigos!

Às "meninas da Física": Lili, Jú, Bob, Ive, Anapola, Monquinha (que deu várias pequenas colaborações nesse trabalho, mostrando que os mesmo os menores passos podem levar a grandes caminhadas!!!), Rosinha, Clara, Bruna. Adoro vocês!!

Ao outros (mas não menos importantes) amigos que fiz na física: Fred Lima (que saudades!), tio Júlio Lana, Marcos Henrique/estrupício, Dudu, Miquita (meu primeiro amigo no quarto andar), Marcelo (Coisa), Gisele, Nathan (e o seu aluno, Bruno, que me receberam tão bem quando estive no Rio e me ajudaram muito nesse trabalho), Lele (outra carregadora de pedras!) e o Elemento Sidney, Joice, João Francisco, Márcio Luneta, Fafá (Gordim), Profs. Luiz Cury, Rodrigo Gribel, Zé Marcos, e a todos que provavelmente esqueci aqui... Meu desagrado ao pamonha do Fábio pela sua exsitência...

Aos colaboradores do Instituto de Ciências Biológicas, principalmente o grupo do Prof. Ricardo Gazzinelli e do Prof. Mauro Martins Teixeira, por toda colaboração oferecida.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa concedida e as outras agências de financiamento: CNPq, FAPEMIG, Instituto Milênio de Nanotecnologia, Instituto Milênio de Óptica Não-Linear, Fotônica e Biofotônica.

Resumo

No presente trabalho utilizamos duas técnicas ópticas para caracterização *in vivo* de amostras biológicas: a Microscopia de Desfocalização e o Espalhamento Quase-Elastico de Luz. As amostras biológicas estudadas foram os macrófagos, que são células do sistema imune inato, e as hemácias, as células vermelhas do sangue. As flutuações na membrana dos macrófagos foram caracterizadas através da Microscopia de Desfocalização e a Espectroscopia de Correlação de Fótons da luz retroespalhada pela membrana foi utilizada para observação dos tempos característicos para as flutuações. Os resultados foram usados em uma tentativa de testar um modelo para motilidade celular, o Modelo da Catraca Browniana. A Microscopia de Desfocalização, no limite de grandes desfocalizações, foi também utilizada para medidas das propriedades mecânicas da membrana e do citoesqueleto das hemácias. Utilizando um modelo de membranas acopladas, foram obtidos os módulos de curvatura para a membrana, o módulo de cisalhamento do citoesqueleto e o potencial de confinamento do conjunto membrana-citoesqueleto.

Abstract

In the present work, we use two optical techniques for *in vivo* characterization of biological samples: the Defocusing Microscopy and Light Scattering. The studied samples were macrophages, cells of innate immune system, and the red blood cell (RBC). Membrane Fluctuations in macrophage cells were characterized through Defocusing Microscopy and Photon Correlation Spectroscopy of the backscattered light from the membrane was used to observe the characteristic time of the fluctuations. The results were used to test a motility model, the Brownian Ratchet Model. Defocusing Microscopy, in the limit which defocusing is large, was also used for measurements of the mechanical properties of the membrane and cytoskeleton for RBC. Using a coupled membrane model, the bending modulus for membrane, the shear modulus for cytoskeleton and the pinning term of the membrane-cytoskeleton was measured.

Capítulo 1

Introdução

A tendência atual da física é buscar problemas ainda não solucionados em outras áreas criando linhas de pesquisa interdisciplinares. Um desses campos, e talvez o mais promissor atualmente, é a Física de Sistemas Biológicos. Nesse campo buscamos respostas para completar o entendimento dos seres vivos já obtido por anos de estudos da biologia.

O objetivo desse trabalho é dar uma contribuição ao estudo da biologia quantitativa. Físicos possuem ferramentas que podem ajudar os biólogos a otimizar seus métodos de análise e, com isso, obter dados mais precisos a respeito de organismos importantes. Além disso, na física procuram-se mecanismos gerais sobre o comportamento da matéria (orgânica e inorgânica), que, uma vez entendidos, permitem fazer previsões e até mesmo controlá-la.

Dividimos o trabalho em duas grandes partes: a primeira, que engloba os capítulos 2 e 3 é dedicada aos estudos com os macrófagos; a segunda, que contém os capítulos 4 e 5 é dedicada aos experimentos realizados com as hemácias. Mais detalhadamente, essa dissertação foi organizada como segue.

No capítulo 2, apresentamos os macrófagos, sua origem, função no organismo. Descrevemos, com detalhe, o citoesqueleto e apresentamos um modelo de motilidade celular, que é uma das motivações desse estudo. Já no capítulo 3, descrevemos os experimentos realizados com os macrófagos e apresentamos os resultados obtidos. Todo o procedimento experimental, bem como a descrição das técnicas utilizadas, estão apresentados detalhadamente nesse capítulo.

As hemácias, sua função e citoesqueleto estão apresentados no capítulo 4. Nesse capítulo abordamos os principais aspectos da teoria da energia elástica de membranas e apresentamos uma revisão sobre a aplicação dessa teoria à membrana das hemácias. O capítulo 5 é dedicado aos experimentos realizados com as hemácias. A teoria para a Microscopia de Desfocalização no limite de grandes desfocalizações é apresentada, assim como os detalhes do procedimento experimental e a discussão dos resultados.

Concluimos o trabalho no capítulo 6 e discutimos algumas perspectivas para dar continuidade ao mesmo.

Além dos capítulos, algumas informações estão contidas em apêndices, na seguinte ordem: no apêndice *A*, descrevemos o protocolo de manutenção da cultura dos macrófagos, um procedimento necessário para a conservação da cultura celular; no apêndice *B*, apresentamos medidas de raio de microesferas de poliestireno realizadas para a "calibração" do experimento realizado com os macrófagos.

Capítulo 2

Macrófagos e Motilidade Celular

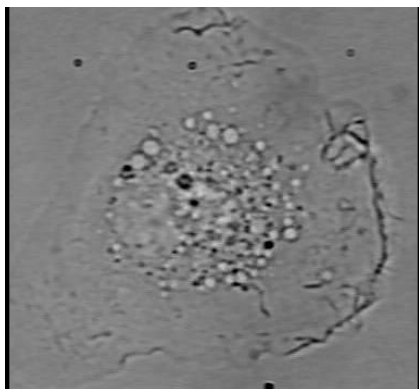
2.1 Os macrófagos

Todos os indivíduos nascem com uma resposta imunitária inata, ou seja, que não possui caráter adaptativo. Os componentes do sistema imune que participam da imunidade inata são os macrófagos e os neutrófilos. O macrófago (figura 2.1) é uma célula que surge da diferenciação dos monócitos (as células brancas do sangue) quando esses migram para os tecidos. Essas células brancas são originadas de células-tronco na medula óssea, onde também se originam os outros componentes do sangue.

Assim como todas as células eucariotas, os macrófagos são constituídos de uma membrana plasmática, um citoesqueleto protéico, citoplasma (no qual estão imersas principalmente as organelas) e o núcleo.

A maioria dos macrófagos está presente em pontos estratégicos onde invasões de patógenos ou inflamações ocorrem com mais facilidade, sendo que cada um deles recebe um nome de acordo com a sua localização (tabela 2.1).

Sendo células do sistema imunológico, a função primária dos macrófagos é realizar a fagocitose, um processo no qual a célula é capaz de destruir, através do envolvimento completo pela membrana plasmática (em estruturas chamadas de pseudópodes), os organismos invasores e digerir células mortas ou doentes do próprio organismo [1].



Localização	Nome da célula
Pulmões	Macrófagos Alveolares
Fígado	Células de Kupffer
Tecidos Nervosos	Micróglias
Ossos	Osteoclastos
Rins	Células Mesagliais

Figura 2.1: O macrófago é uma célula do sistema imune inato, cuja principal função é realizar a fagocitose. Essa célula está presente em vários tecidos e recebe nomes específicos de acordo com a sua localização. Imagem feita por Microscopia de Desfocalização.

2.2 Actina e a Polimerização

O citoesqueleto celular é um emaranhado de proteínas que se estende através do citoplasma e é existente somente nas células eucariotas [2]. A presença desse citoesqueleto foi, provavelmente, um dos passos cruciais na evolução das células, tanto animais quanto vegetais.

A morfologia e as propriedades mecânicas das células estão fortemente ligadas às propriedades mecânicas e a organização do citoesqueleto. Essa relação é especialmente verdadeira nas células animais, que não possuem parede celular e possuem uma membrana plasmática incapaz de suportar a complexa morfologia celular [3].

Geralmente, o citoesqueleto é composto de três proteínas: *actina*, *microtúbulos* e os *filamentos intermediários*. Separadamente, cada filamento do citoesqueleto desempenha uma função:

filamentos intermediários: usados para sustentar forças de tensão mecânica;

microtúbulos: são capazes de sustentar compressões e organizam a movimentação interna de diversos componentes celulares;

filamentos de actina: controlam a movimentação da membrana, desempenhando um papel importante na movimentação celular.

Vamos concentrar nossa atenção somente nos filamentos de actina, visto

que esta é a principal proteína do citoesqueleto. A actina é uma proteína globular composta de um cadeia polipeptídica de 375 aminoácidos e com peso molecular de cerca de 42kDa^* . Os filamentos de actina (chamados *F-actina*) formam uma dupla hélice (assim como na molécula de DNA), cujo passo é de 37 nm , na qual cada monômero de actina se encontra com quatro outros. A subunidade de actina é também conhecida por *actina globular* ou *G-actina* e possui cerca de $2,77\text{ nm}$ de diâmetro [2]. Um esquema da estrutura da actina pode ser vista na figura 2.2.

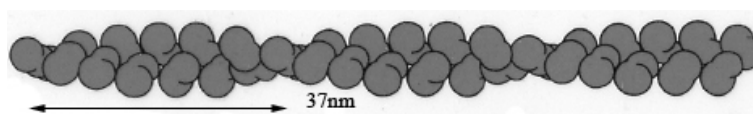


Figura 2.2: Esquema do filamento de actina: cada monômero de actina se encontra com quatro outros e o filamento se forma em dupla hélice cujo passo é de 37 nm .

A actina é mais concentrada na região periférica à membrana plasmática, formando uma camada em volta da célula, conhecida como *córtex celular*. É graças a esse córtex de actina que uma célula animal pode produzir as extensões da sua superfície para engolfar partículas, além de permiti-la mudar sua forma como acontece no momento da divisão celular [2]. A estrutura básica do córtex é constituída de cadeias paralelas de filamento que se cruzam quase ortogonalmente, formando grades bidimensionais que se superpõem umas as outras [1].

A actina, assim como as outras proteínas do citoesqueleto, forma filamentos lineares através da *polimerização*, um processo importante para a organização em todas as formas de vida celular. O mecanismo da polimerização da actina pode ser dividido em dois estágios [2]: (1) o mais lento, caracterizado pela formação de pequenos oligômeros que agem como um núcleo para a adição de mais monômeros; (2) uma vez formados os núcleos, os monômeros de actina podem ser adicionados seqüencialmente em cada uma das extremidades para gerar um longo filamento.

A taxa de crescimento dos filamentos é dada pela diferença entre a taxa de adição de um monômero e a taxa de perda [2], ou seja:

*Um Dalton D corresponde a $\sim 1,660 \times 10^{-27}\text{ kg}$.

$$T = K_{on} \times M - K_{off} \quad (2.1)$$

em que, K_{on} é a taxa de incorporação de monômeros que depende também da concentração M de monômeros livres na solução e K_{off} é a taxa de perda (independente de M). Quanto maior a concentração de monômeros de actina no início do processo, mais rapidamente eles formam o filamento. A reação de polimerização ocorre até que a concentração de monômeros alcance a chamada *concentração crítica* que é dada por:

$$T = 0 \Rightarrow K_{on} \times M - K_{off} = 0 \Rightarrow C_c = \frac{K_{off}}{K_{on}} \quad (2.2)$$

Como os monômeros são assimétricos e as subunidades estão arranjadas no modo "cauda-cabeça" em filamentos paralelos, o filamento de actina é polar [3]. Uma consequência dessa polaridade é o fato de que as extremidades do filamento são diferentes e, com isso, as taxas de associação e dissociação são muitas vezes superiores na extremidade chamada positiva do que na extremidade chamada negativa. Os valores típicos para essas taxas estão na tabela 2.1:

Taxa	<i>Extremidade Negativa</i>	<i>Extremidade Positiva</i>
K_{on}	$1,4 (\mu\text{Ms})^{-1}$	$11,6 (\mu\text{Ms})^{-1}$
K_{off}	$0,8 \text{ s}^{-1}$	$1,4 \text{ s}^{-1}$
C_c	$0,6 \mu\text{m}$	$0,12 \mu\text{m}$

Tabela 2.1: Valores das constantes de associação (K_{on}), dissociação (K_{off}) e concentração crítica (C_c) para as duas extremidades distintas dos filamentos de actina [1].

É importante notar que os filamentos continuarão crescendo até que a concentração de monômeros chegue abaixo da concentração crítica para a extremidade negativa. Nesse ponto, essa extremidade começa um processo de despolimerização, enquanto a extremidade positiva continua crescendo [2,4]. Com isso, observamos um movimento dos monômeros dentro do filamento, chamado *treadmilling*: uma molécula adicionada na extremidade positiva será eliminada do filamento na extremidade negativa.

2.3 Modelo da Catraca Browniana

Podemos definir motilidade celular como sendo um *movimento direcionado realizado com o consumo de algum tipo de energia* [5]. Existem modelos para explicar a motilidade celular, e alguns deles são baseados na pressão exercida pelos filamentos de actina contra a membrana plasmática. Ou seja, a força é gerada pelo crescimento dos filamentos via polimerização. Um fato que parece comprovar essa idéia é que, na região mais próxima da membrana, a grande maioria dos filamentos (cerca de 80%) tem sua extremidade positiva apontadas para a membrana [1].

Iremos tratar do modelo mais simples para explicar a motilidade celular: **Modelo da Catraca Browniana**, proposto por *Oster e Peskin* em 1993 [6]. Esse modelo usa o movimento browniano como retificador de processos que transformam a energia química em movimento direcionado.

A energia química que é transformada em energia mecânica está armazenada na diferença de potencial químico - ou seja, *Energia Livre de Gibbs* - entre a forma de monômero e a forma de filamento [4]. Mas a polimerização da actina consegue prover força suficiente para empurrar a membrana plasmática?

Se tentarmos mover uma membrana de uma distância de $5\mu\text{m}$, são gastos cerca de $2 \times 10^4 k_B T^*$ e se temos um monômero de $2,5\text{ nm}$ são necessários cerca de 2000 monômeros. Sendo $\Delta G \sim -14k_B T/\text{monômero}$ a energia livre que acompanha a polimerização, temos que a energia total fornecida é de $2,8 \times 10^4 k_B T$. Vemos então que sobram cerca de $8 \times 10^3 k_B T$ de energia mostrando que o processo é capaz de fornecer energia suficiente para empurrar a bicamada lipídica com cerca de 60% de eficiência [6].

A maior limitação da força induzida pela polimerização é o fato de que, quando um polímero está em equilíbrio, ele é incapaz de realizar trabalho e nenhuma energia pode ser extraída, logo nenhuma força pode mais ser gerada.

O funcionamento da catraca Browniana é bastante simples. Considere que temos uma barreira, que nesse caso é a membrana celular, cujo movimento será descrito pelo seu coeficiente de difusão D . Sabemos que na região

*À temperatura ambiente ($T \simeq 300\text{ K}$) temos $1 k_B T = 4 \times 10^{-21}\text{ J}$.

próxima a membrana, vários filamentos de actina são criados via polimerização. Nesse modelo, trataremos a polimerização como uma simples associação linear dos monômeros dispersos na solução e que os polímeros formados são rígidos. Assim, o mecanismo da catraca é a intercalação dos monômeros entre a ponta do filamento e a barreira. Sempre que a membrana flutua termicamente, um espaço x será aberto permitindo ou não a entrada de mais um monômero, cujo tamanho denotaremos por δ . É importante notar que, como os filamentos estão arranados em dupla hélices, modelamos a catraca usando uma distância que é metade do tamanho do monômero.

Sempre que ocorrer uma flutuação na membrana, grande o suficiente para que um monômero seja adicionado, o movimento de retorno da membrana a sua posição original estará impedido. Ou seja, a membrana terá uma nova posição de equilíbrio a partir da qual pode novamente flutuar, repetindo o processo. Este processo, que funciona como retificador do movimento Browniano da membrana, continua até que uma força restauradora $-f$ (agindo sobre a membrana) seja suficiente para impedir sua difusão para longe da extremidade do filamento. Um esquema simplificado pode ser visto na figura 2.3.

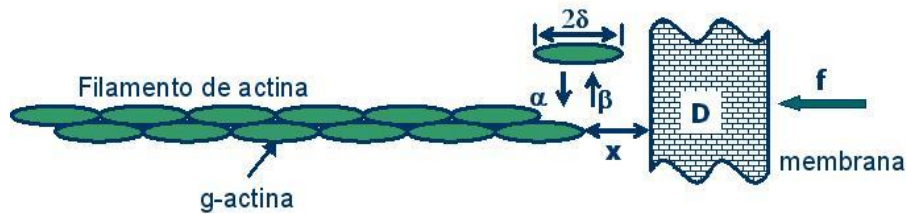


Figura 2.3: Esquema de funcionamento da catraca Browniana (figura da referência [1]). Temos uma membrana cujo coeficiente de difusão é dado por D em um campo de força $-f$. O filamento de actina se encontra a uma distância x da membrana. Nesse caso, temos que α e β são as taxas de adição e remoção para o monômero, de tamanho 2δ , respectivamente.

Podemos definir uma função $p_n(x, t)$ como a descrição do comportamento estatístico do sistema filamento e membrana, de modo que $p_n(x, t)$ é uma densidade de filamentos que se encontram a uma distância x da barreira no instante de tempo t . Considerando as condições necessárias para que o

modelo funcione, $p_n(x, t)$ deve obedecer a seguinte equação:

$$\begin{aligned}
\frac{\partial p_n(x, t)}{\partial t} &= -\frac{\partial J_n}{\partial x}(x, t) - K_{on}M [p_n(x, t)H(x - \delta) - p_{n-1}(x + \delta, t)] \\
&\quad + K_{off} [p_{n+1}(x - \delta, t) - p_n(x, t)] \quad n \geq 1 \\
J_n(x, t) &= -D \frac{\partial p_n}{\partial x}(x, t) - \frac{fD}{K_B T} p_n(x, t) \quad n \geq 0 \\
\frac{\partial p_0(x, t)}{\partial t} &= -\frac{\partial J_0}{\partial x}(x, t) - K_{on}M [p_0(x, t)H(x - \delta)] + K_{off} [p_1(x - \delta, t)]
\end{aligned} \tag{2.3}$$

em que $H(x - \delta)$ é a função degrau de Heavside ($= 0$ se $x < \delta$ e $= 1$ se $x > \delta$). Essa equação é uma descrição completa do processo de polimerização na presença de forças externas (como é o caso de f tomada como positiva quando se opõe ao movimento) e forças térmicas. O terceiro e quarto termos da primeira equação correspondem à cinética de polimerização e despolimerização da extremidade do filamento. O primeiro e o segundo termos da terceira equação correspondem, respectivamente, à contribuição do movimento difusivo da membrana e da força restauradora e a componente de fluxo J vem da difusão do objeto [1].

A solução de estado estacionário para 2.3 nos dá a relação de força-velocidade se definirmos a velocidade da catraca por:

$$\nu = \delta \frac{K_{on}M \int_{\delta}^{\infty} p(x)dx - K_{off} \int_0^{\infty} p(x)dx}{\int_0^{\infty} p(x)dx} \tag{2.4}$$

Se as velocidades de polimerização e de despolimerização forem muito menores do que a velocidade de uma catraca ideal*, ou seja, $K_{on}M \times \delta$, $K_{off} \times \delta \ll (2D/\delta)$, então a equação 2.4 pode ser resolvida explicitamente:

$$\nu = \delta [K_{on}M e^{-\omega} - K_{off}] \tag{2.5}$$

em que ω é um trabalho adimensional feito contra a barreira quando ocorre a adição do monômero:

*Para uma catraca ideal temos que o tempo para difusão a uma distância δ é $T_{\delta} = \delta^2/2D$. Então o tempo para a difusão de uma distância $L = N \times \delta$ é simplesmente $N \times T_{\delta}$: $T = L(\delta/2D)$. Sendo a velocidade média da partícula $\nu \equiv L/T$, temos então: $\nu = (2D/\delta)$.

$$\omega = f \times \frac{\delta}{K_B T} \quad (2.6)$$

Podemos notar que, nesse limite, a velocidade da catraca não depende do coeficiente de difusão da barreira. A força necessária para parar a catraca é obtida fazendo $\nu = 0$, que leva à seguinte equação:

$$\frac{K_{off}}{K_{on}M} = \exp\left(-f \times \frac{\delta}{K_B T}\right) \Rightarrow f_0 = -\frac{K_B T}{\delta} \ln\left(\frac{K_{off}}{K_{on}M}\right) \quad (2.7)$$

As forças associadas à polimerização podem ser grandes. No caso da actina, como a concentração é cerca de $100\times$ a concentração crítica, $12 \mu m$, temos uma força de cerca de 7 pN [3]. Quando comparamos o comportamento de um filamento real do citoesqueleto com o modelo dos polímeros temos que: (i) a força de equilíbrio é independente da polimerização; (ii) a força máxima exercida por um polímero real será menor ou igual a força de equilíbrio.

Porém, o Modelo da Catraca Browniana possui algumas limitações: (i) como os filamentos são considerados rígidos e inflexíveis, temos que o intervalo depende somente da difusão da barreira; porém como os monômeros de actina, na realidade, são flexíveis o movimento Browniano irá induzir modos internos que irão contribuir para o tamanho do intervalo; (ii) interação de somente um filamento com a membrana: na situação biológica o que realmente acontece é que temos múltiplos filamentos interagindo com a mesma barreira. Por isso, em 1996, *Mogilner et al.* [7] generalizou o modelo de Oster para incluir a elasticidade dos polímeros e para levar em conta o fato de que nem todos os filamentos são perpendiculares à membrana e, com essas considerações, obteve uma nova expressão para a velocidade de polimerização dos filamentos.

Capítulo 3

Experimentos e Discussões I: Macrófagos

Nesse capítulo apresentaremos os experimentos realizados utilizando os macrófagos. Descreveremos os aspectos teóricos das técnicas experimentais utilizadas, a preparação das amostras e discutiremos os principais resultados obtidos.

3.1 Microscopia de Desfocalização Aplicada ao Estudo dos Macrófagos

A Microscopia de Desfocalização é uma técnica recentemente desenvolvida que permite observarmos facilmente objetos de fase, ou seja, objetos capazes de modificar somente a fase da luz que os atravessa, não alterando sua intensidade [8].

A técnica foi desenvolvida aplicando a teoria de desfocalização em um microscópio com óptica corrigida no infinito* e utilizando o formalismo de propagação do espectro angular, que é a transformada de Fourier do campo elétrico, para descrever a propagação da luz em um microscópio desfocalizado [9,10]. O formalismo foi desenvolvido dentro dos limites da óptica coerente pois, mesmo utilizando uma lâmpada de espectro largo, os objetos observados

*Na óptica corrigida no infinito, a objetiva conjuga a imagem do objeto no infinito e uma lente de tubo focaliza os raios no plano focal para formar a imagem.

são muito pequenos (da ordem de micrômetros) de modo que garantimos estar em uma área de coerência. Usando a aproximação paraxial $|\vec{q}| \ll |\vec{k}|$ em que k é o vetor de onda da luz, a teoria desenvolvida para explicar a Microscopia de Desfocalização prevê que o contraste de uma imagem é proporcional ao laplaciano bidimensional da espessura do objeto de fase e no limite de pequenas desfocalizações $\Delta f q_0^2 / 2k \ll 1$ em que q_0 é o maior vetor de onda do objeto, e, se estivermos tratando de objetos finos, podemos escrever:

$$C = \frac{I - I_0}{I_0} = \Delta f \frac{\Delta n}{n} \nabla^2 h(x, y) \quad (3.1)$$

em que C é o contraste da imagem, I é a intensidade luminosa no objeto e I_0 a intensidade luminosa em uma região fora do objeto (referência), Δn é a diferença de índice de refração entre a amostra e o meio em que está imersa, Δf é a quantidade que foi desfocalizada, sendo que o plano focal é medido em relação à lâmina de vidro onde está a amostra, e $h(x, y)$ é a espessura da amostra.

Como a membrana dos macrófagos aderidos a uma superfície é transparente à luz visível* e seu índice de refração é próximo ao do meio de cultura em que está armazenada, essas células podem ser tratadas como objetos de fase.

Em trabalhos recentemente desenvolvidos [9,11], foram observados dois tipos de flutuações na membrana dos macrófagos, mostradas na figura 3.1:

Pequenas Flutuações Aleatórias: possivelmente de origem térmica e que trataremos pela sigla SRMF (do inglês, Small Random Membrane Fluctuations);

Ruffles: grandes ondas coerentes que se propagam das bordas em direção ao núcleo e que são responsáveis pela estruturas formadas durante a fagocitose;

Além das flutuações, foram caracterizados também eventos de fagocitoses em tempo real. Essa caracterização das flutuações da membrana é importante para a modelagem da motilidade celular.

*A parte aderida dos macrófagos são constituídas basicamente de membrana plasmática e do córtex celular [1].

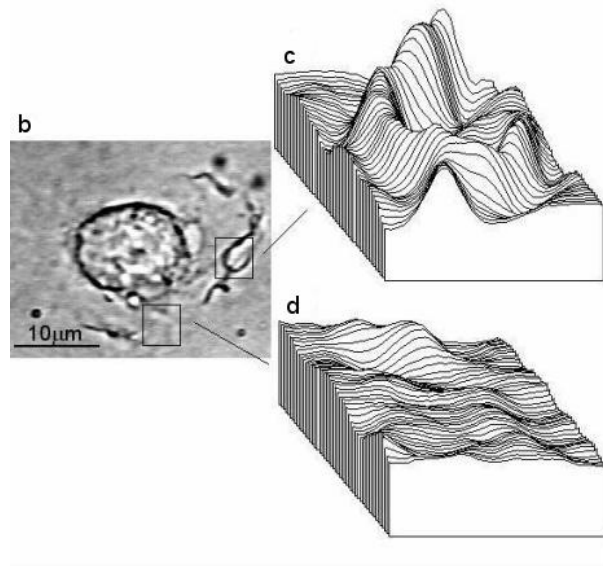


Figura 3.1: (b) Macrófago aderido em uma lâmina de vidro; (c) *Ruffles*: grandes ondas coerentes que se propagam das bordas em direção ao núcleo; (d) *Pequenas Flutuações Aleatórias*: possivelmente de origem térmica. Figura da referência [12].

Usando funções de autocorrelação temporal* ajustadas por uma exponencial simples, obteve-se os tempos de relaxação para as SRMF e usando funções de autocorrelação espacial† também ajustadas por uma exponencial simples, obteve-se o comprimento de correlação para essas flutuações. Foram obtidos também, nesses mesmos trabalhos [9,11], o desvio quadrático médio (rms) da curvatura para as pequenas flutuações aleatórias; o comprimento médio, velocidade, frequência de ocorrência, altura, largura dos *ruffles*.

*A função de autocorrelação temporal era obtida do contraste de cada pixel em tempos diferentes, com uma média sobre vários pixels de uma região escolhida. A escala usada era de $\frac{1}{30}$ s [9].

†A função de autocorrelação espacial era obtida do valor simultâneo do contraste de diferentes pixels e a média é feita sobre vários frames do vídeo. A escala utilizada era 0,13 μ m, que é o tamanho de um pixel para a câmera CCD utilizada [9].

3.2 Espalhamento de Luz e Correlação de Fótons

Ao se incidir luz em um meio material qualquer, além da luz refletida e transmitida, pode ser também observada luz espalhada em todas as direções [13]. Se o meio através do qual a onda eletromagnética está passando é uniforme nas suas propriedades, então a onda passa sem distúrbios e sem deflexões. Se, entretanto, existirem variações espaciais (ou temporais) nas propriedades eletromagnéticas do meio, a onda é espalhada [14].

Se não há absorção da radiação pelo sistema então a luz espalhada terá o mesmo comprimento de onda da luz incidente e o espalhamento é *elástico*; se, por outro lado, há alguma absorção, o espalhamento é dito *inelástico* [15].

Nos experimentos de espalhamento de luz, ao invés de tentarmos obter informações através da análise do campo espalhado pela amostra, é mais simples obtermos as informações através da variação da intensidade espalhada com o tempo [15]. Da análise dessa luz espalhada, chamada de Espectroscopia de Correlação de Fótons, podemos obter informações dos tempos característicos dos processos de flutuação presentes na amostra [13]. Essa técnica tornou-se importante, após a invenção do laser, para análise de fenômenos de espalhamento de luz dinâmico na faixa de Hertz ou Megahertz.

Como estamos interessados em estudar variações da intensidade, precisaremos descrever as pequenas flutuações em torno de seu valor médio. Além disso, estamos considerando que essas flutuações são somente temporais. Se pensarmos que o valor da intensidade em um certo tempo t e no tempo $t+\tau$ estão relacionadas, podemos definir a função de autocorrelação temporal como sendo [16]:

$$C(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x(t) x(t + \tau) dt = \langle x(t) x(t + \tau) \rangle \quad (3.2)$$

A esta média atribuímos a idéia estatística habitual, ou seja, a média sobre as probabilidades de todos os valores que a grandeza x pode possuir no instante t e $t + \tau$ [17]. Podemos considerar a função de correlação temporal com uma representação matemática da persistência temporal de uma flutuação antes dessa ir a zero [16].

Para os processos aleatórios estacionários, esta média pode ser substituída por uma média temporal sobre todos os termos t com um dado τ (teorema ergódico) [17]. Assim, a distribuição de probabilidade depende somente da diferença $\tau = t_1 - t_2$ e não dos valores de t_1 e t_2 [16]. Temos ainda:

$$\begin{aligned} \tau \rightarrow 0, \langle x(t + \tau) x(t) \rangle &\rightarrow \langle |x(t)|^2 \rangle \\ \tau \rightarrow \infty, \langle x(t + \tau) x(t) \rangle &\rightarrow 0 \end{aligned} \quad (3.3)$$

Vemos, assim, que a função de autocorrelação tem as propriedades que concordam com a noção de tempo de persistência: a função tem um valor máximo igual a variância do sinal quando $\tau = 0$, e vai a zero quando $\tau = \infty$ (se assumimos que o sinal tem $\langle x \rangle = 0$) [3].

A função de autocorrelação de intensidades, $I(t)$, relevante nos experimentos de espalhamento de luz, relaciona-se com o campo espalhado de acordo com a expressão [15]:

$$\langle I(0) I(t) \rangle = \langle |E(0)|^2 |E(t)|^2 \rangle$$

É possível mostrar [15,17] que, em alguns casos, a função de autocorrelação para a intensidade tem o decaimento exponencial, dado por:

$$\langle I(0)I(t) \rangle = B + A e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.4)$$

3.3 Comparação entre a Microscopia de Desfocalização e o Espalhamento de Luz na Membrana dos Macrófagos

De acordo com o Modelo da Catraca Browniana descrito na seção 2.3, a membrana da célula possui, a grosso modo, dois movimentos distintos: uma flutuação, caracterizada pelo seu coeficiente de difusão e que permite, sob as condições necessárias, que ocorra a adição de uma g-actina ao filamento; e um movimento de retorno, sempre que o filamento sofrer uma despolimerização.

Para ambas as extremidades do polímero, temos que as taxas de adição e remoção são diferentes, sendo que a de remoção é a menor entre elas.

Então, se considerarmos o Modelo da Catraca, uma função de autocorrelação temporal dessas flutuações deveria apresentar dois tempos característicos, relacionados com os dois movimentos possíveis da membrana. Podemos estimar estes tempos uma vez que temos os dados da actina. Usando uma concentração de actina de $10\mu\text{M}$, e os valores para as taxas de polimerização dadas na tabela 2.1 para a extremidade positiva, pois como descrito anteriormente, a maioria dos filamentos tem essa extremidade apontada para a membrana, podemos calcular o tempo característico de polimerização (dado pelo inverso da taxa de polimerização):

$$\tau_p = \frac{1}{K_{on} \times C} = \frac{1}{11,6 \mu\text{M} \times 10 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}} = \frac{1 \text{ s}}{116} = 8,6 \text{ ms} \quad (3.5)$$

ou seja, para incorporar um monômero gasta-se em torno de 8,6 ms. Também podemos fazer uma estimativa do tempo mais lento usando as taxas de despolimerização:

$$\tau_d = \frac{1}{K_{off}} = \frac{1}{1,4 \text{ s}^{-1}} = 0,7 \text{ s} \quad (3.6)$$

Tentativamente interpretamos que os tempos obtidos nos experimentos usando a Microscopia de Desfocalização estão relacionados com o tempo de retorno da membrana. Porém, a videomicroscopia não nos permite acessar os tempos mais rápidos, pois nosso limite é de $\frac{1}{30}$ segundos. Então, nossa proposta é aplicar a técnica de Espalhamento de Luz na membrana dos macrófagos, pois com essa técnica conseguiremos obter os tempos da ordem de milissegundos, associado às flutuações térmicas da membrana, caso estejam presentes.

3.4 Metodologias Experimentais

Descreveremos a montagem utilizada, a preparação das amostras e os experimentos realizados.

3.4.1 Montagem Experimental

A montagem experimental disponível no Laboratório de Física de Sistemas Biológicos atualmente está representada na figura 3.2. A montagem é feita sobre um microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) com uma objetiva de imersão à óleo (CFI Plan Apochromat 100 \times oil) com aumento de 100 \times e abertura numérica de 1,4. Duas das saídas do microscópio estão acopladas a câmeras CCD (Dage MTI 72). As imagens captadas são gravadas em vídeo através de um VCR (Sony Hi8, EVO9650 / Sony DVCAM, DSR20) que conectado a uma das câmeras CCD e são analisadas posteriormente.

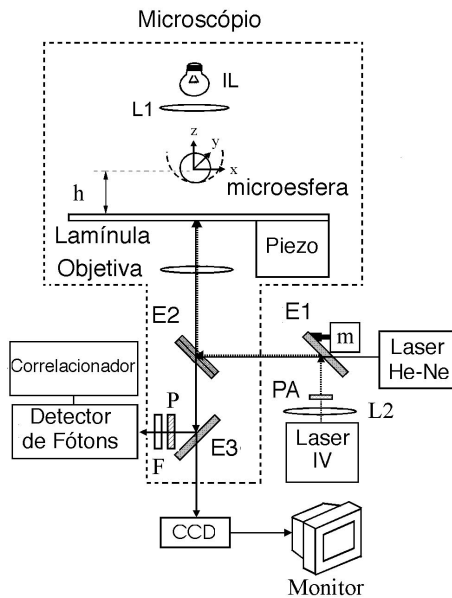


Figura 3.2: Montagem experimental utilizada nos experimentos. A linha pontilhada mostra o microscópio invertido e a microesfera representa as amostras. As imagens gravadas usando a câmera CCD são enviadas posteriormente para o computador. O laser de He-Ne é usado nos experimentos de espalhamento no qual a luz retroespalhada é coletada no detetor de fótons e enviada a um correlacionador digital que está acoplado a um computador.

Para os experimentos realizados com os macrófagos devemos manter nossa amostra aquecida e o controle de temperatura é feito por um sistema de circulação de água ligado a um banho térmico (LAUDA Compact Low-Temperature Thermostats, RC 6/RCS 20) e acoplado a objetiva do microscó-

pio e mantendo a mesma aquecida a $37^{\circ}C^*$.

Para realizarmos o espalhamento de luz, usamos um laser de He - Ne (modelo SP- 127, $\lambda = 632,8$ nm). A objetiva é também usada para coletar a luz espalhada pelo laser. Na saída restante do microscópio, conectamos um detetor de fótons (EG&G - Photon Count Module, SPCM-200-PQ-F500) montado sobre deslocadores da Newport para ser posicionado com precisão. Para cada fóton que chega ao detetor, um pulso de largura de 10 ns é enviado ao correlacionador digital Brookhaven BI9000AT que mede as correlações temporais entre os pulsos originados da luz espalhada pela amostra. Temos ainda um deslocador piezoelétrico (PI Digital Piezo Controller, Modelo E-710.3CD) que nos permite deslocar a amostra com precisão submicrométrica.

3.4.2 Porta-Amostras

O porta-amostra usado para os macrófagos é uma cubeta especialmente feita para a medida. Essas cubetas feitas de plexyglas são coladas às lâminas de vidro (Corning) com Torr Seal (Varian Vacuum Products) depois de serem lavadas e esterilizadas. Cada cubeta suporta 1,5 ml de solução. Cerca de 20 minutos antes da preparação das amostras, o porta-amostras era levado à capela para esterilização com luz ultravioleta.

3.4.3 Preparação das Células

Os macrófagos usados nesse trabalho são de uma cultura da linhagem RAW 264.7 e são obtidos através de indução de leucemia em camundongos machos. Esses macrófagos possuem a capacidade de se multiplicarem e desse modo conseguimos manter a cultura ativa por algum tempo. Essas células são mantidas em uma estufa a $37^{\circ}C$ e 5% de CO_2 e estão em meio de cultura DMEM (Dulbecos Modified Eagle Medium, Sigma) suplantado 10% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico (para evitar contaminação do meio).

*Devido à perda de calor na lâmina e a pequena área de transferência de calor temos que a temperatura no aquecedor deve estar em torno de $51^{\circ}C$ para obtermos a temperatura correta na amostra [12].

Para controlarmos a multiplicação dessas células, duas vezes na semana devemos *repicá-las* (protocolo descrito no Apêndice A) e depois desse procedimento retiramos as células que serão usadas no próximo experimento. Essas células, na quantidade de 2×10^5 macrófagos/ml de meio são mantidas no porta-amostras, dentro da estufa, por cerca de 18 horas para os macrófagos aderirem ao vidro. Uma vez aderidas, as células podem estender sua membrana facilmente sobre a lâmina, permitindo que as estruturas possam ser observadas.

3.4.4 Experimento Realizado

O experimento era realizado em três etapas. Na primeira, fazemos o espalhamento em bolinhas de poliestireno de 85 nm de diâmetro, com o objetivo de ajustar os equipamentos para a medida com o macrófago, como descrito no apêndice B.

Posteriormente, fazemos a caracterização do macrófago através da Microscopia de Desfocalização, e depois realizamos o Espalhamento de Luz usando o laser de He-Ne. Após ligarmos todos os equipamentos, ajustamos a temperatura do banho térmico e colocamos o porta-amostras com os macrófagos no microscópio. Focalizamos a amostra e deixamos em repouso por cerca de 10 minutos para atingir o equilíbrio térmico. Depois desse tempo, escolhemos um macrófago bem aderido para o experimento.

O macrófago escolhido é desfocalizado cerca de $1 \mu\text{m}$ e filmado durante pelo menos 10 minutos. Depois de terminarmos o filme, escolhemos uma porção da membrana e focalizamos o laser de He-Ne nessa posição, que incide perpendicularmente na amostra.

Cada medida de espalhamento tem a duração de 20 a 30 minutos (para obtermos uma boa relação sinal-ruído) e as curvas de correlação temporal que foram obtidas no correlacionador são gravadas no computador.

Um ponto importante é que pelo fato de estarmos trabalhando com imagens, a escala do nível de cinza deve ser calibrada com frequência conforme o procedimento descrito em [1].

3.5 Resultados e Discussões

3.5.1 Análise de Dados

O processo de digitalização das imagens é bastante simples. Após gravarmos os experimentos em uma fita específica para o nosso videocassete, conectamos o vídeo ao nosso computador que tem uma placa de captura. Usando um programa chamado *Windv** conseguimos transferir esses filmes para o computador. Para fazermos um primeiro processamento das imagens, usamos outro software chamado *Virtualdub*†. Nesse programa podemos fazer a descompactação do vídeo. O arquivo que sai de ambos programas está no formato *.avi*.

O último programa que utilizamos é o ImageJ‡, um programa de domínio público. Esse programa converte nossa imagem para 8-bit (que significa uma imagem com 256 níveis de cinza variando de preto ou 0 a 255 ou completamente branco) além de permitir a mudança de formato para *.tiff*. É também no ImageJ que fazemos as análises das funções de autocorrelação espaciais e temporais através de rotinas adicionais (pluggins) implementados no mesmo§.

Tanto as funções de autocorrelação temporal obtidas nas imagens digitalizadas quanto as funções de autocorrelação temporal obtidas através da correlação de fótons são analisadas no programa *KaleidaGraph*.

3.5.2 Resultados Obtidos

Para que o modelo da Catraca possa ser considerado, o tempo característico mais rápido não pode ser maior que o tempo para a polimerização de um monômero de actina e, de fato, tem que ser muito próximo. Portanto, devemos ajustar nossas funções de correlação usando a seguinte equação:

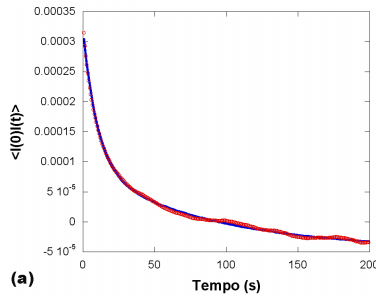
$$C(t) = A e^{-\frac{t}{\tau_1}} + B e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad (3.7)$$

*<http://windv.mourek.cz>

†<http://virtualdub.sourceforge.net/>

‡rsb.info.nih.gov/ij/

§Exemplos dessas rotinas para o cálculo das funções de autocorrelação temporais e espaciais podem ser obtidos em [12].



a) Função de Autocorrelação do contraste obtida pela Microscopia de Desfocalização: $\tau_1 = (10 \pm 2) \text{ s}$ e $\tau_2 = (87 \pm 5) \text{ s}$.

Usando a técnica de Microscopia de Desfocalização estudamos as flutuações da membrana dos macrófagos e através das funções de autocorrelação temporal obtida do contraste das imagens conseguimos obter os tempos de relaxação para as pequenas flutuações aleatórias observadas. Os valores obtidos para o contraste foram multiplicados pelo fator de correção dado pela calibração do sistema de vídeo. Na figura 3.3a temos uma função de autocorrelação cujo ajuste é feito usando a equação 3.7. Os tempos obtidos através desse ajuste são: $\tau_1 = (10 \pm 2) \text{ s}$ e $\tau_2 = (87 \pm 5) \text{ s}$.

O objetivo das medidas de Espalhamento de Luz na membrana era obter preferencialmente o tempo mais rápido que não conseguimos medir usando as técnicas de análise de imagens. Na figura 3.3b mostramos uma curva de autocorrelação obtida através de correlação de fótons também ajustada com duas exponenciais. Já na figura 3.3c, temos o logaritmo da curva de autocorrelação obtida pela correlação de fótons, mostrando a qualidade do ajuste obtido. Os tempos obtidos através desse ajuste são: $\tau_1 = (20 \pm 3) \text{ ms}$ e $\tau_2 = (8 \pm 2) \text{ s}$.

Nas figuras 3.4 a,b e c, temos outras funções de autocorrelação obtidas para outro macrófago.

3.6 Conclusões Parciais

Nossa proposta, se o Modelo da Catraca Browniana é razoável, é que deveríamos observar dois tempos característicos nas funções de autocorrelação temporal, um tempo rápido correspondente ao tempo de flutuação da membrana livre e conseqüentemente relacionado à polimerização da actina; e outro lento, correspondente ao processo de despolimerização dos filamentos.

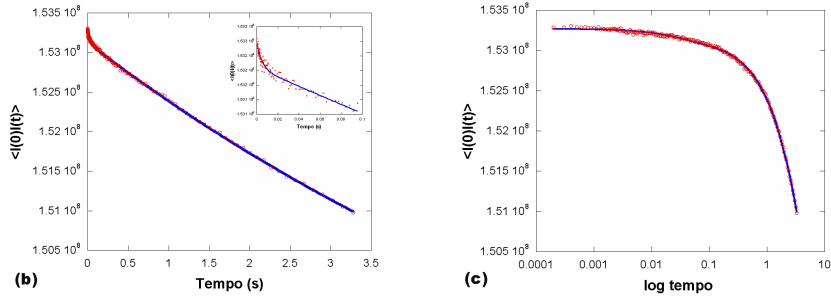
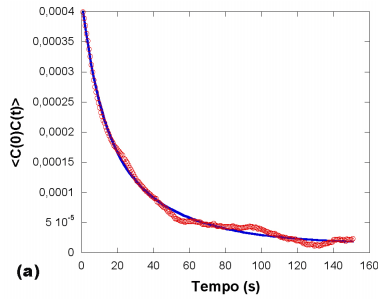


Figura 3.3: (b) Função de Autocorrelação temporal obtida pela Espectroscopia de Correlação de Fótons: $\tau_1 = (20 \pm 3) \text{ ms}$ e $\tau_2 = (8 \pm 2) \text{ s}$; *inset*: 0, 1 s iniciais. (c) Logaritmo da curva de autocorrelação temporal (b).



(a): Função de Autocorrelação do contraste obtida pela Microscopia de Desfocalização: $\tau_1 = (11 \pm 1) \text{ s}$ e $\tau_2 = (39 \pm 4) \text{ s}$.

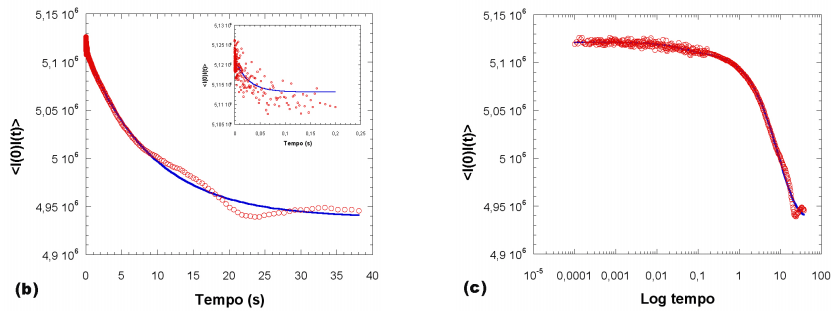


Figura 3.4: (b) Função de Autocorrelação temporal obtida pela Espectroscopia de Correlação de Fótons: $\tau_1 = (40 \pm 6) \text{ ms}$ e $\tau_2 = (9 \pm 1) \text{ s}$; *inset*: 0, 1 s iniciais. (c) Logaritmo da curva de autocorrelação temporal (b).

Foram analisadas cerca de 80 curvas de diversos macrófagos e da análise dos tempos obtidos podemos concluir que o tempo curto é comparável ao tempo de polimerização e que, portanto, esta dinâmica pode estar sendo observada. Por outro lado, os tempos longos são bem maiores do que o esperado para a simples despolimerização, sugerindo que a dinâmica pode ser ditada por motores protéicos (como as miosinas - 2), conforme sugerido em [18], além de efeitos cooperativos agindo dentro do citoesqueleto. Na tabela 3.1, apresentamos uma comparação dos dados obtidos nos experimentos usando a Microscopia de Desfocalização e a Espectroscopia de Correlação de Fótons.

Apesar dos resultados obtidos apontarem na direção correta, ainda nos resta comprovar se a luz espalhada que estamos analisando vem da superfície e não do volume da célula, ou seja, se temos contribuições das outras estruturas da célula. Acreditamos que uma maneira de resolver isso é realizar medidas variando a espessura da área analisada. À medida que nos aproximamos da região do núcleo celular, a espessura da região fica maior. Se a luz espalhada foi proveniente somente da membrana, esse aumento de espessura não terá influência sobre os resultados; caso contrário, quanto maior a espessura, maior o volume da região, intensificando o sinal recebido pelo correlacionador. Essas medidas não foram realizadas por problemas de contaminação na cultura celular.

Microscopia de Desfocalização	
τ_1	τ_2
(10 ± 2) s	(87 ± 5) s
(11 ± 1) s	(39 ± 4) s
Espectroscopia de Correlação de Fótons	
τ_1	τ_2
(20 ± 3) ms	(8 ± 2) s
(40 ± 6) ms	(9 ± 1) s

Tabela 3.1: Dados obtidos para os tempos característicos das flutuações na membrana dos macrófagos usando a Microscopia de Desfocalização e a Espectroscopia de Correlação de Fótons.

Capítulo 4

Estudo da Membrana das Hemácias

Nesse capítulo trataremos da segunda amostra biológica utilizada nesse trabalho: as hemácias. Apresentaremos um breve resumo sobre a teoria do cálculo da energia elástica de membranas em geral e posteriormente mostraremos uma aplicação dessa teoria ao conjunto membrana-citoesqueleto da hemácia.

O objetivo deste e do próximo capítulo é mostrar que através da Microscopia de Desfocalização podemos estudar as flutuações das interfaces de hemácias e obter as propriedades elásticas da membrana e do citoesqueleto.

4.1 As hemácias

O tecido sanguíneo é composto de um líquido amarelado, denominado plasma, no qual estão suspensos as plaquetas, os glóbulos brancos e os glóbulos vermelhos. Estamos interessados somente nas propriedades das células vermelhas, também conhecidas como eritrócitos ou hemácias (figura 4.1).

As hemácias são produzidas em um tecido especial que se localiza na medula óssea, o tecido hematopoiético, e as células velhas são destruídas e removidas pelo baço liberando bilirrubina. Durante cerca de 120 dias (tempo de vida dessa célula), uma hemácia humana percorre cerca de 483 km dentro dos vasos sanguíneos [2]. Elas são produzidas na velocidade de 2 milhões por

segundo e com isso temos cerca de 5 milhões de células por mm^3 de sangue, em condições normais.

Os eritrócitos são constituídos principalmente por hemoglobina, uma molécula complexa, composta de quatro agrupamentos *heme* que possuem ferro. Os átomos de ferro presentes nesses grupos *heme* são capazes de se ligar ao oxigênio, permitindo que o gás seja transportado pelo corpo. A hemoglobina também consegue transportar uma parte do gás carbônico produzido no corpo para fora dos tecidos. Além disso, esses grupos *heme* são responsáveis pela cor das hemácias.

A hemácia é otimizada para que a troca de oxigênio com o meio seja bastante eficiente. Além de não possuir núcleo e nem organelas citoplasmáticas, ela possui uma forma bicôncava (discóide), com cerca de $8\ \mu\text{m}$ de diâmetro, e é flexível o suficiente para percorrer até mesmo os menores vasos sanguíneos do organismo.

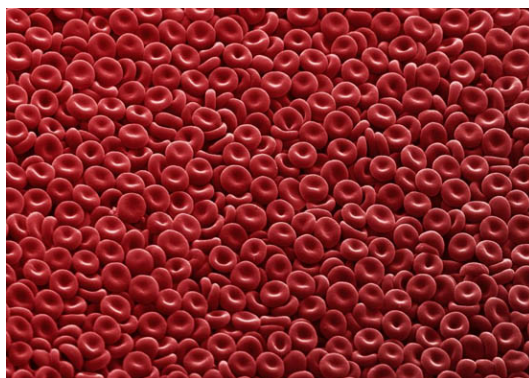


Figura 4.1: As hemácias são as células vermelhas do sangue e a sua principal função é fazer o transporte de oxigênio através do organismo. Foto: Dave McCarthy and Annie Cavanagh/Wellcome Trust.

4.1.1 O citoesqueleto das hemácias

O córtex das hemácias é uma das associações mais bem caracterizadas da actina com a membrana plasmática [2]. O citoesqueleto da hemácia é um emaranhado de proteínas, cujo principal componente é a *spectrina* [19], que tem a morfologia de uma molécula extensa e flexível. A estrutura desse

citoesqueleto é bidimensional, levemente triangular e está ligado à membrana em pontos discretos. Pode ser descrito como um conjunto de molas entrópicas, de tamanho $L \sim 80$ nm, com uma constante de mola efetiva $\sim 4 \times 10^{-6}$ J/m² [20].

O citoesqueleto das hemácias é essencial para a sobrevivência da célula durante a circulação sanguínea, além de permitir que a célula passe por uma deformação completa sem uma mudança significativa de área. É também devido à presença desse citoesqueleto que os eritrócitos são capazes de manter sua integridade, sua forma discóide e sua elasticidade [21].

A espectrina é uma molécula formada de duas subunidades distintas, chamadas α e β que são alinhadas lateralmente - α -espectrina com 280 kDa e a β -espectrina com 246 kDa. Essas subunidades se repetem formando uma cadeia com cerca de 160 aminoácidos, ou seja, com aproximadamente 200–260 nm em comprimento. Além disso, os dímeros se associam formando tetrâmeros cujas extremidades estão ligados a pequenos pedaços de filamentos de actina, cada um contendo cerca de 12 monômeros [2]. A importância da espectrina foi revelada pelo número de desordens genéticas decorrentes de mudanças estruturais dessas proteínas, como as anemias hemolíticas hereditárias [19].

4.1.2 As mudanças de forma da hemácia

A hemácia sofre algumas mudanças em sua forma dependendo do meio em que estiver imersa: em solução hipertônica (muito concentrada) as hemácias perdem água e murcham, adquirindo uma forma cheia de estruturas similares à espinhos e denominada equinócita; quando imersas em solução hipotônica, a água entra nas hemácias, que adquirem uma forma esférica até o momento em que se rompem. Essas duas formas não ocorrem normalmente no organismo.

Uma tentativa de explicar a mudança de forma da hemácia é através da hipótese de bicamada acoplada, proposta por Sheetz, Singer e Evans [22]. De acordo com essa hipótese, qualquer fator que leve a uma expansão da camada externa da membrana, em relação à camada interna, produz uma tendência de formar estruturas convexas, como as da forma equinócita. Alternativamente, qualquer expansão da camada interna, relativa à externa, favorece a

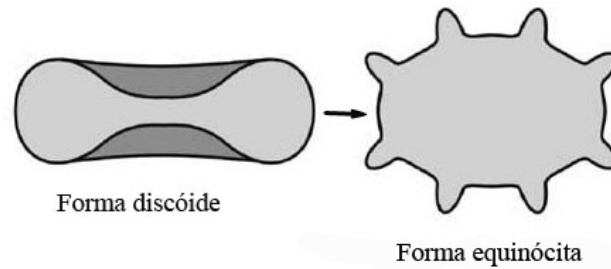


Figura 4.2: *Direita:* hemácia em sua forma natural conhecida com discóide; *Esquerda:* se a hemácia discóide for imersa em uma solução muito concentrada, ela sofre uma mudança obtendo uma forma chamada de equinócita.

formação de cavidades para acomodar a área extra.

4.2 Energia das Flutuações em Membranas

Nessa seção, discutiremos alguns conceitos em física estatística de superfícies e membranas, visto que alguns termos da energia dessas dependem da área (como a tensão superficial) e a curvatura (como a energia de curvatura). O desenvolvimento dessa seção é uma compilação da teoria apresentada no livro de S. Safran, "Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces, and Membranes" [23].

4.2.1 Energia Livre das Flutuações Térmicas

Iremos tratar de flutuações cuja origem é térmica, por se tratar do caso mais simples. Nesse caso, a amplitude quadrática média é então proporcional a temperatura relativa à energia de tensão.

Considere as flutuações da interface definidas na representação de Monge, descrita em [23], como $z = h(x, y)$. A área da superfície plana é denotada por A . Para flutuações variando lentamente da forma plana ($h = h_0$, em que h_0 é uma constante) a energia livre adicional da interface ondulada em relação a plana vale aproximadamente:

$$\Delta F_s = F_s - \gamma A = \frac{1}{2} \gamma \int dx dy (h_x^2 + h_y^2) \quad (4.1)$$

em que γ é chamado de tensão superficial*. Nas coordenadas de Fourier, podemos definir:

$$\begin{aligned} h(\vec{\rho}) &= \frac{1}{\sqrt{A}} \sum_{\vec{q}} h(\vec{q}) e^{i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \\ h(\vec{q}) &= \frac{1}{\sqrt{A}} \int d\vec{\rho} h(\vec{\rho}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{\rho}} \end{aligned}$$

em que $\vec{\rho}$ e \vec{q} são bidimensionais. Obtemos, portanto, uma expressão para a energia da superfície:

$$\Delta F_s = \frac{1}{2} \gamma \sum_{\vec{q}} q^2 |h(\vec{q})|^2 \quad (4.2)$$

Tratando ΔF_s como um Hamiltoniano de uma variável que flutua $h(\vec{q})$, temos, de acordo com [23], que o coeficiente $G(\vec{q})$ de $|h(\vec{q})|^2$ vale:

$$G(\vec{q}) = \gamma q^2$$

Sendo assim, o valor quadrático médio de cada modo de Fourier no equilíbrio térmico é dado por:

$$\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{k_B T}{G(\vec{q})} = \frac{k_B T}{q^2 \gamma} \quad (4.3)$$

O valor quadrático médio das flutuações no espaço real são dadas por:

$$\begin{aligned} \langle h(\vec{r})^2 \rangle &= \frac{1}{A} \sum_{\vec{q}} \langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{1}{(2\pi)^2} \int d\vec{q} \langle |h(\vec{q})|^2 \rangle \\ &= \frac{1}{(2\pi)^2} \int d\vec{q} \frac{k_B T}{q^2 \gamma} \end{aligned} \quad (4.4)$$

*Na expressão 4.1, temos que $h_x \equiv \frac{\partial h}{\partial x}$ e $h_y \equiv \frac{\partial h}{\partial y}$.

4.2.2 Alturas e as Flutuações Normais

Enquanto uma deformação geral de uma membrana envolve tanto mudança de volume quanto de curvatura, temos que as deformações de menor energia usualmente envolvem somente a curvatura. Considere uma membrana sem curvatura espontânea, descrita pela equação de energia livre de curvatura, por unidade de área

$$f_c = \frac{1}{2} k_c (h_{xx} + h_{yy})^2 \quad (4.5)$$

em que estamos usando a transformação de Monge, na aproximação de pequenas curvaturas*. Temos ainda, que $h(x, y)$ descreve a altura da membrana. No espaço de Fourier ($\vec{q} = (\vec{q}_x, \vec{q}_y)$), a equação 4.5 torna-se:

$$f_c = \frac{1}{2A} k_c \sum_q q^4 |h_q|^2$$

onde A é a área no plano $x - y$. Note que a energia de curvatura, que é proporcional a q^4 por modo, é mais suave em grandes comprimentos de onda do que àquela correspondente a tensão superficial dada pela equação 4.2.

Então esperamos que o efeito das flutuações térmicas nessas membranas seja ainda mais significativo do que o problema de deformações térmicas devido à presença da tensão superficial. Novamente, temos que:

$$G(\vec{q}) = k_c q^4$$

E assim,

$$\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{k_B T}{G(\vec{q})} = \frac{k_B T}{k_c q^4} \quad (4.6)$$

O valor quadrático médio das flutuações no espaço real são dadas por:

*Na expressão 4.5, temos que $h_{xx} \equiv \frac{\partial^2 h}{\partial x^2}$ e $h_{yy} \equiv \frac{\partial^2 h}{\partial y^2}$.

$$\begin{aligned}
\langle h(\vec{r})^2 \rangle &= \frac{1}{A} \sum_{\vec{q}} \langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{1}{(2\pi)^2} \int d\vec{q} \langle |h(\vec{q})|^2 \rangle \\
&= \frac{1}{(2\pi)^2} \int d\vec{q} \frac{k_B T}{k_c q^4}
\end{aligned} \tag{4.7}$$

Se a membrana estiver sujeita a um potencial externo, caracterizado por V_0 , que pode estar relacionado com as interações da membrana, a energia livre pode ser escrita:

$$\Delta F_s = \frac{1}{2} k_c \left[\int dx dy (h_x^2 + h_y^2) + V_0 \int d\vec{r} h^2(\vec{r}) \right] \tag{4.8}$$

que pode ser reescrita:

$$\Delta F_s = \frac{1}{2} k_c \int dx dy [(h_x^2 + h_y^2) + \xi_0^{-4} h^2] \tag{4.9}$$

em que o comprimento de persistência $\xi_0 \sim (k_c/V_0)^{\frac{1}{4}}$ corresponde ao comprimento no qual os q 's pequenos são cortados. Como a distribuição de probabilidade continua gaussiana, o fator $G(\vec{q})$ é então:

$$G(\vec{q}) = k_c (q^4 + \xi_0^{-4})$$

O espectro das flutuações passa a ser então:

$$\langle |h(\vec{q})|^2 \rangle = \frac{k_B T}{G(\vec{q})} = \frac{k_B T}{k_c} \frac{1}{(q^4 + \xi_0^{-4})} \tag{4.10}$$

4.2.3 A Membrana das Hemácias

A aplicação da teoria elástica à membrana das hemácias foi realizada por *Nir Gov et al.* em 2003 [20] e revisada em 2007 [24]. Faremos nessa seção um breve resumo dos modelos apresentados.

No modelo apresentado em [20], o citoesqueleto de espectrina é tratado como uma camada infinitamente rígida, localizado a uma distância fixa d , em

relação a membrana, cujas conexões espaçadas com a membrana* resultam em uma alta tensão superficial efetiva σ e o confinamento total é modelado como um potencial harmônico, caracterizado por γ .

A escala de comprimentos, devido ao confinamento, está relacionada com um comprimento de persistência da membrana que, por sua vez, está relacionado com o comprimento de onda no qual as flutuações da membrana são confinadas. Então, pode-se dizer que o potencial de confinamento está relacionado com a dureza da rede de espectrina.

No modelo revisado, apresentado em [24], a teoria vai além de duas membranas acopladas através de um potencial harmônico, utilizando um modelo microscópico que leva em conta o volume excluído das duas membranas à uma distância fixa, mantida por uma pressão externa homogênea. Assim, é obtido um potencial harmônico de interação que depende de um termo de interação constante, do módulo de curvatura da membrana k e/ou do módulo de cisalhamento do citoesqueleto μ , bem como da distância entre as membranas d .

As duas membranas que interagem nesse caso formam uma membrana composta de uma parte fluida e outra sólida: o citoesqueleto de espectrina é modelado como uma membrana sólida e a bicamada lipídica como uma membrana fluida. A arquitetura de uma membrana composta é usada pelas células para prover estabilidade mecânica; isso é realmente necessário para as hemácias, pois elas são constantemente expostas a um estresse mecânico nos vasos sanguíneos.

O modelo prevê que para flutuações com comprimentos de onda maiores que 400 nm as flutuações são bem descritas por uma *única* membrana com uma curvatura efetiva. Essas flutuações são governadas pela curvatura da membrana lipídica e um módulo de cisalhamento bidimensional que vem do citoesqueleto de espectrina. O acoplamento curvatura-cisalhamento traz uma contribuição tipo tensão superficial e um termo de potencial de confinamento que devem ser adicionados ao módulo de curvatura da bicamada. O funcional contínuo para a energia livre será:

*A área de contato dos pontos de ligação do citoesqueleto com a membrana é pequena (~ 1 nm) quando comparada com a distâncias entre esses nós (~ 100 nm).

$$F \simeq \int dS \left[\frac{1}{2} \alpha_p (\nabla h)^2 + \frac{1}{2} k (\nabla^2 h)^2 + \frac{1}{2} \gamma h^2 \right] \quad (4.11)$$

em que α_p é o termo que surge do acoplamento dos módulos de curvatura da membrana e de cisalhamento do citoesqueleto e γ é o coeficiente que caracteriza o potencial harmônico de confinamento. A curvatura efetiva pode ser escrita, por:

$$K_C(q) = k_b + \alpha_p q^{-2} + \gamma q^{-4}$$

Considerando essa curvatura efetiva, as funções de correlação espacial serão dadas por:

$$\langle h_q h_{-q} \rangle = \frac{k_B T}{q^4 [k_b + \alpha_p q^{-2} + \gamma q^{-4}]} = \frac{k_B T}{q^4 K_c(q)} \quad (4.12)$$

em que $k_b \simeq 25 k_B T$ é o módulo de curvatura de uma bicamada lipídica. Espera-se que o valor constante da curvatura da membrana lipídica seja independente da forma da hemácia.

Como $\mu \approx k_B T / l^2$, isso leva a um módulo de curvatura constante para o emaranhado de espectrina que é menor quando comparado com o da membrana lipídica. Usando um módulo de cisalhamento típico para o conjunto de espectrinas da hemácia temos $\mu = 10^{-2} k_B T \text{ nm}^{-2}$ e obtemos $k_c = (0, 1 - 0, 6) k_B T$. A presença de uma curvatura média não-nula de uma membrana sólida age como um potencial de confinamento:

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

que depende da curvatura local média H e a curvatura local Gaussiana K , e é determinada por uma média sobre a área da membrana A .

Através do ajuste dos espectros das flutuações dos dados experimentais obtidos por [25] e [26], os parâmetros elásticos da membrana e do citoesqueleto foram obtidos. A princípio, todos os parâmetros podem ser medidos de

maneira independente em experimentos diferentes. Essas constantes elásticas variam para diferentes células e dependem fortemente das condições experimentais.

As discrepâncias entre os valores obtidos são resolvidas levando em conta as diferentes "temperaturas efetivas" das células, dada por T_{ef} , devido à atividade celular. A temperatura efetiva foi usada como conceito fenomenológico para quantificar as flutuações não-térmicas e ativas. Essa temperatura é maior que a temperatura real devido a transdução de energia química em energia mecânica. O teorema da Equipartição vale considerando $1/2 k_B T_{ef}$ para cada grau de liberdade. Assim, renormaliza-se os valores do módulo de curvatura para serem maiores do que os obtidos nos ajustes por um fator de T_{ef}/T [24].

Capítulo 5

Experimentos e Discussões II: Hemácias

5.1 Microscopia de Desfocalização Aplicada ao Estudo da Hemácia

Uma outra aplicação recente para a Microscopia de Desfocalização foi no estudo das hemácias. A hemácia é um objeto de fase por ser transparente à luz visível vermelha e pelo fato de que algumas de suas partes estarem sempre desfocalizadas [27]. Além de ser um objeto mais complexo que os macrófagos, a motivação para o uso das hemácias era o estudo das vibrações (*flickering*) presentes em sua membrana e também de suas propriedades ópticas e mecânicas.

Em 1890, Browicz descreveu o movimento vibratório em hemácias humanas e essas observações foram confirmadas em 1949 por Pulvertaft com o uso de um microscópio de Contraste de Fase [28]. Em 1975, Brochard e Lennon [29] mostraram que essas vibrações eram causadas por flutuações térmicas da espessura da hemácia e apresentaram um estudo do espectro dessas flutuações.

Ao contrário do que acontecia para os macrófagos, as hemácias são objetos de fase que possuem uma certa espessura que deve ser levada em conta. Então a expressão para o contraste é escrita como [27]:

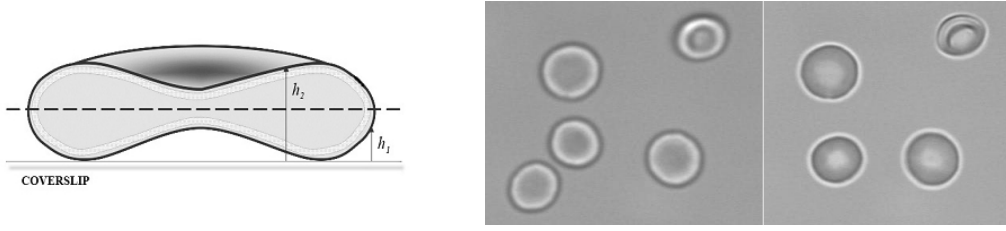


Figura 5.1: (a) Definições de h_1 e h_2 em um corte em uma hemácia. (b) Hemácia desfocalizada: o centro da célula aparece preto se o plano focal está abaixo da metade da hemácia e branco se o plano focal está acima da metade da célula.

$$C(r) = \frac{I(r) - I_0}{I_0} = 2 \frac{\Delta n}{n} \left(\Delta f - \frac{h_2(r) + h_1(r)}{2} \right) \nabla^2 h_2(r) \quad (5.1)$$

em que $C(r)$ é o contraste da imagem, $I(r)$ e I_0 são a intensidade luminosa na hemácia e no background, respectivamente; $h_1(r)$ e $h_2(r)$ são as alturas da superfície superior e inferior da hemácia em relação à lâmina de vidro (figura 5.1a) em que a amostra está e $\Delta n = n_H - n_{meio}$, cujo sinal dependerá se a luz está entrando na célula ou saindo dela. Ou seja, a equação mostra que o contraste de uma hemácia desfocalizada é proporcional a curvatura. Vemos que se $\Delta f = (h_1 + h_2)/2$, o contraste se anula e essa posição é o meio da hemácia. Se o plano focal está em alguma posição acima ou abaixo do meio da hemácia, o seu centro aparece branco ou preto (figura 5.1b). Temos também, que $h_2(r) + h_1(r)$ tem um valor constante que corresponde a altura da parte mais espessa da célula.

A partir do contraste médio das imagens, foi possível obter a forma, o tamanho e o índice de refração em [27]. Além disso, das flutuações do contraste, pelo fenômeno de *flickering*, o módulo de curvatura e a viscosidade do citoplasma também foram obtidos.

5.2 Microscopia de Desfocalização: Limite de

$$\Delta f \rightarrow \infty$$

Nessa seção mostraremos a uma expressão que nos permitirá obter mais facilmente o módulo de curvatura efetivo $K_c(q)$ da hemácia através da Microscopia de Desfocalização, no limite de grandes desfocalizações. Na tese de Doutorado de Giuseppe Glionna desenvolvida em nosso laboratório, obteve-se a seguinte expressão para a função de autocorrelação espacial do contraste:

$$\begin{aligned} \langle C(0)C(r) \rangle &= \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_0^k dq q J_0(qr) \left[\langle |h_1(q)|^2 \rangle \text{sen}^2\left(\frac{q^2(\Delta f - p_1)}{2k}\right) \right. \\ &\quad \left. + \langle |h_2(q)|^2 \rangle \text{sen}^2\left(\frac{q^2(\Delta f - p_2)}{2k}\right) \right] \end{aligned} \quad (5.2)$$

na qual, $\langle |h_1(q)|^2 \rangle$, $\langle |h_2(q)|^2 \rangle$ são os espectros espaciais das flutuações das interfaces superior e inferior, localizadas em p_1 e p_2 , respectivamente. Podemos reescrever o termo $\text{sen}^2 x$ como:

$$\begin{aligned} \text{sen}^2\left(\frac{q^2(\Delta f - p_1)}{2k}\right) &= \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos\left(\frac{q^2(\Delta f - p_1)}{k}\right) \\ \text{sen}^2\left(\frac{q^2(\Delta f - p_2)}{2k}\right) &= \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos\left(\frac{q^2(\Delta f - p_2)}{k}\right) \end{aligned}$$

Para Δf muito grande, que no caso da hemácia é $\Delta f > 3\mu m$, as integrais com cossenos tendem a zero e a equação 5.2 pode ser escrita como:

$$\langle C(0)C(r) \rangle_{\Delta f \rightarrow \infty} = \frac{(\Delta n k_0)^2}{2\pi} \int_0^k dq q (\langle |h_1(q)|^2 \rangle + \langle |h_2(q)|^2 \rangle) J_0(qr) \quad (5.3)$$

Do modelo de acoplamento de uma membrana sólida e outra fluida [24], descrito na seção 4.2.3, temos que os espectros das flutuações são dados por:

$$\begin{aligned} \langle |h_1(q)|^2 \rangle &= \frac{k_B T}{k_c q^4 + \alpha_1 q^2 + \gamma_1} \\ \langle |h_2(q)|^2 \rangle &= \frac{k_B T}{k_c q^4 + \alpha_2 q^2 + \gamma_2} \end{aligned} \quad (5.4)$$

No limite de $\Delta f \rightarrow \infty$, não é possível distinguir as duas interfaces, pois o valor de $\langle |h_1(q)|^2 \rangle$ é muito próximo do valor de $\langle |h_2(q)|^2 \rangle$. Assim,

$$\langle |h_1(q)|^2 \rangle \approx \langle |h_2(q)|^2 \rangle \simeq \langle |h(q)|^2 \rangle$$

e a função de correlação será:

$$\langle C(0)C(r) \rangle \simeq \frac{(\Delta n k_0)^2}{\pi} \int_0^k dq q \langle |h(q)|^2 \rangle J_0(qr) \quad (5.5)$$

Através da transformada de Hankel da função de autocorrelação podemos obter uma expressão para $\langle |h(q)|^2 \rangle$:

$$\langle |h(q)|^2 \rangle \simeq \frac{\pi}{(\Delta n k_0)^2} \int dr r J_0(qr) \langle C(0)C(r) \rangle \quad (5.6)$$

De posse da equação para $\langle |h(q)|^2 \rangle$ podemos definir a curvatura pela seguinte expressão:

$$\frac{1}{K_c(q)} = q^4 \langle |h(q)|^2 \rangle \equiv \frac{\pi q^4}{(\Delta n k_0)^2} \int dr r J_0(qr) \langle C(0)C(r) \rangle \quad (5.7)$$

5.3 Metodologias Experimentais

5.3.1 Montagem Experimental

A montagem experimental utilizada no estudo das hemácias foi a mesma descrita em 3.4.1.

5.3.2 Porta-Amostras

Para as hemácias, o porta-amostras é uma pequena lâmina de vidro (Corning) de aproximadamente 15 mm de espessura e um O-ring de borracha de cerca de 1,5 mm de diâmetro colado na superfície através de parafina (cera de vela) derretida. Esse porta-amostra também é levado à capela para esterilização antes do experimento.

5.3.3 Preparação das Células

As amostras de hemácias são preparadas no momento do experimento. O sangue, retirado do nosso próprio dedo, é diluído em uma solução de PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH 7.4) com BSA (Bovine Serum Albumin), na concentração de 1 mg/ml. O BSA faz com as hemácias mantenham a sua forma discóide durante o experimento [27].

5.3.4 Experimento Realizado

Após preparada a solução com a células, preenchemos um o-ring com essa solução, colocamos no microscópio, focalizamos e esperamos as hemácias decantarem para começarmos o experimento. Usando o deslocador piezoelétrico, podemos fazer a desfocalização de maneira controlada. Ajustamos o meio da hemácia (posição na qual o meio da célula e o background tem o mesmo nível de cinza) e deslocamos o eixo z do deslocador de $3\mu m$, deixando a imagem desfocalizada. Normalmente, usamos um pedaço de lâmina para tampar a amostra, mas nesse caso estamos querendo que a solução evapore para observamos as mudanças na forma da hemácia. Usamos também um filtro vermelho, que transmite a luz com comprimentos de onda maiores que 590 nm, para evitar a absorção, de modo que somente efeitos da desfocalização são observados [27]. Fizemos filmes de 5 minutos das hemácias escolhidas, com intervalo de 10 minutos entre eles, até que a hemácia ficasse na forma equinócita (figura 5.2).

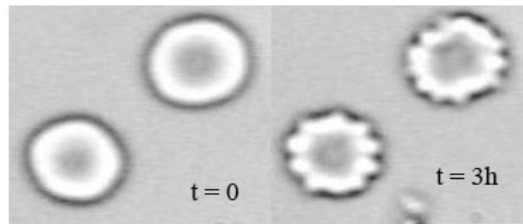


Figura 5.2: Mudança na forma da hemácia durante o experimento. O tempo $t = 0$ é o momento de início do experimento que tem a duração de cerca de $3h$. A imagem foi feita por Microscopia de Desfocalização.

5.4 Resultados e Discussões

As imagens obtidas durante os experimentos passaram pelo mesmo processo de digitalização descrito em 3.5.1. Estamos interessados em obter as funções de autocorrelação espaciais para as flutuações que ocorrem no centro das hemácias. Essas funções de correlação foram obtidas através de um programa desenvolvido em nosso laboratório em rotina *Delphi* que nos permite calcular a função em uma área (formando um círculo), melhorando assim a estatística dos dados obtidos. Obtivemos as funções de correlação espacial para vários tempos, acompanhando a mudança de forma na hemácia, partindo da forma discóide até a forma equinócita.

Vemos nas figuras 5.3a e 5.3b, uma função de correlação para a hemácia, respectivamente na forma discóide e equinócita, em função do raio*.

Através do programa *Mathcad*, fizemos as transformadas de Hankel das funções de autocorrelação. A transformada é obtida da seguinte expressão [30]:

$$H\{\langle C(0)C(r) \rangle\} = \frac{\int_0^a dr r \langle C(0)C(r) \rangle J_0(qr)}{\frac{a^2}{2} J_1^2(qa)} = \frac{\pi}{(\Delta n k_0)^2} \langle |h(q)|^2 \rangle$$

em que a são as raízes da função de Bessel de ordem zero J_0 . Ao multiplicarmos a função de saída da transformada por q^4 , obtemos $\frac{1}{K_C}$, vista nas figuras 5.4a e 5.4b.

De acordo com [24], temos:

$$\langle |h(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_C q^4 + \alpha q^2 + \gamma} \Rightarrow q^4 \langle |h(q)|^2 \rangle = \frac{1}{\frac{k_C}{k_B T} + \frac{\alpha}{k_B T q^2} + \frac{\gamma}{k_B T q^4}} \equiv \frac{1}{K_C(q)}$$

O termo α é muito menor que os outros e não contribui significativamente e, assim, ajustamos nossos dados usando uma curvatura efetiva, dada por:

$$K_C(q) = \frac{k_C}{k_B T} + \frac{\gamma}{k_B T q^4} \quad (5.8)$$

*O raio é dado pelo número de pixels da linha utilizada para gerar a curva multiplicado pelo tamanho do pixel, que é de 0,13 μm .

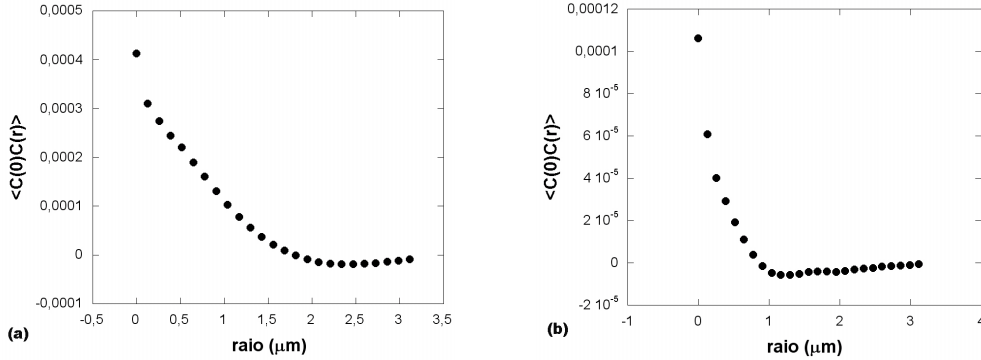


Figura 5.3: (a): Função de autocorrelação em função do raio para uma hemácia na forma discóide. (b) Função de autocorrelação em função do raio para uma hemácia na forma equinócita.

Fazendo o ajuste das curvas 5.4a e 5.4b usando a expressão 5.8, obtemos os valores para $k_c/k_B T$ e para $\gamma/k_B T$.

Conforme mencionado em 4.2.3, o potencial de confinamento está relacionado ao módulo de cisalhamento μ do citoesqueleto. No nosso experimento, a expressão que relaciona essas grandezas é:

$$\gamma = 4\mu \frac{1}{A} \int dA \kappa^2(r) = 4\mu \frac{2}{R^2} \int_0^R dr r \kappa^2(r) = 4\mu f_A$$

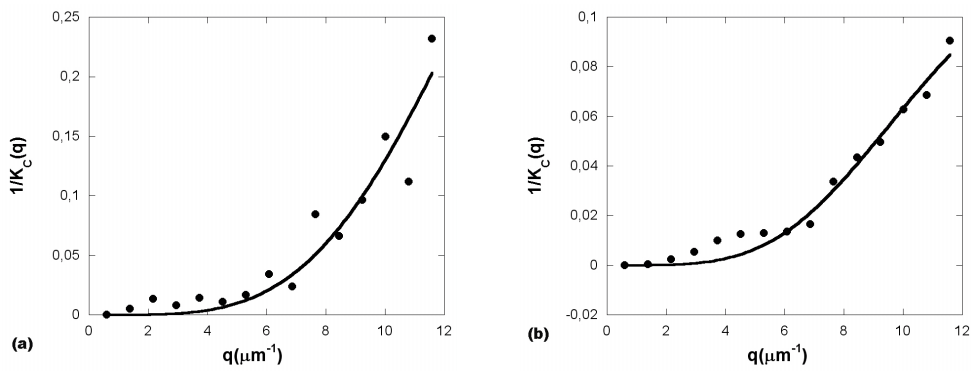
em que $\kappa(r)$ é a curvatura local da hemácia. Do contraste médio das imagens obtemos $\kappa(r)$, através da seguinte expressão:

$$\langle C \rangle = 2 \frac{\Delta n}{n} \left(\Delta F - \frac{h_1 + h_2}{2} \right) \kappa(r)$$

De [27], temos que $\Delta n/n = 0,042$ e nos nossos experimentos $\Delta F - (h_1 + h_2/2) = 3 \mu m$. Assim, κ é dado por:

$$\kappa(r) = \frac{\langle C \rangle}{6 \times 0,042}$$

Nas figuras 5.5 e 5.6 apresentamos os gráficos de $\kappa^2(r) \times r$ para as hemácias na forma discóide e equinócita, respectivamente. Para obtermos o valor de



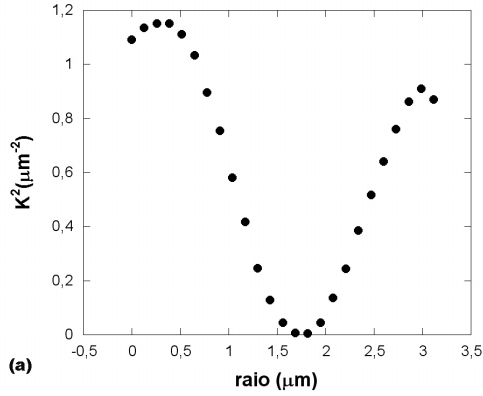
$$\frac{k_c}{k_B T} = (1,5 \pm 1,1)$$

$$\frac{\gamma}{k_B T} = (62 \pm 14) \times 10^3 \mu\text{m}^{-4}$$

$$\frac{k_c}{k_B T} = (7 \pm 1,1)$$

$$\frac{\gamma}{k_B T} = (90 \pm 11) \times 10^3 \mu\text{m}^{-4}$$

Figura 5.4: (a) Curva para a $(\frac{1}{K_C}) \times q$ para a hemácia na forma *discóide*. No gráfico, os pontos correspondem aos dados experimentais e a linha corresponde ao ajuste. Os dados obtidos no ajuste estão ao lado da curva. (b) Curva para a $(\frac{1}{K_C}) \times q$ para a hemácia na forma *equinócita*. No gráfico, os pontos correspondem aos dados experimentais e a linha corresponde ao ajuste. Os dados obtidos no ajuste estão ao lado da curva.



$$\begin{aligned}\mu &= \frac{\gamma}{4f_A} = \frac{(62 \pm 14) \times 10^3 k_B T}{4 \times 0,50} \mu m^{-2} \\ &= (3,1 \pm 0,7) \times 10^{-2} k_B T \mu m^{-2}\end{aligned}$$

Figura 5.5: Curva para $\kappa^2(r) \times r$ para a hemácia *discóide*. O raio é dado pelo número de pixels da linha utilizada para gerar a curva multiplicado pelo tamanho do pixel, que é de $0,13 \mu m$. A partir da curvatura podemos obter o valor para o módulo de cisalhamento μ do citoesqueleto.

κ , devemos saber o nível de cinza médio do background, que nesse caso é $\langle N_{bkg} \rangle = 198,91$. Para a hemácia com a qual estamos trabalhando, temos que a função f_A é dada por:

$$f_A = \frac{2}{(3,12)^2} \int_0^{3,12} dr r \kappa^2(r)$$

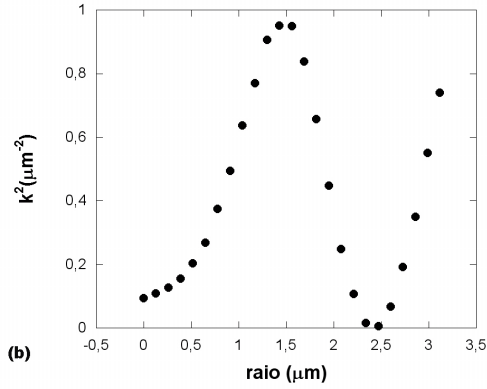
A integral de $\kappa^2(r) dr$ é feita numericamente usando o *KaleidaGraph* e, nesse caso, temos:

$$\int_0^{3,12} dr r \kappa^2(r) = 2,41 \Rightarrow f_A = \frac{2}{(3,12)^2} \times 2,41 = 0,50 \mu m^{-2}$$

De posse do valor de f_A e dos ajustes obtidos para a transformada da correlação, podemos calcular o módulo de cisalhamento:

$$\begin{aligned}\gamma = 4\mu f_A \Rightarrow \mu &= \frac{\gamma}{4f_A} = \frac{(62 \pm 14) \times 10^3 k_B T}{4 \times 0,50} \mu m^{-2} \\ &= (3,1 \pm 0,7) \times 10^{-2} k_B T \mu m^{-2}\end{aligned}$$

Repetimos o mesmo procedimento para essa hemácia na forma equinócita. Fizemos a transformada da função da figura 5.3b, e do ajuste (usando a equação 5.8), obtemos os seguintes valores:



$$\begin{aligned}\mu &= \frac{\gamma}{4f_A} = \frac{(90 \pm 11) \times 10^3 k_B T}{4 \times 0,41} \mu m^{-2} \\ &= (5,5 \pm 0,7) \times 10^{-2} k_B T \mu m^{-2}\end{aligned}$$

Figura 5.6: Curva para $\kappa^2(r) \times r$ para a hemácia *equinócita*. O raio é dado pelo número de pixels da linha utilizada para gerar a curva multiplicado pelo tamanho do pixel, que é de $0,13 \mu m$. A partir da curvatura podemos obter o valor para o módulo de cisalhamento μ do citoesqueleto.

$$\frac{k_C}{k_B T} = (7 \pm 1) \quad \frac{\gamma}{k_B T} = (90 \pm 11) \times 10^3 \mu m^{-4}$$

A curva de $\kappa^2(r) \times r$ é vista na figura 5.6. Como o background é um pouco diferente nesse caso, $\langle N_{bkg} \rangle = 201,2$, temos um $f_A = 0,41$. Desse modo, o módulo de cisalhamento será:

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{\gamma}{4f_A} = \frac{(90 \pm 11) \times 10^3 k_B T}{4 \times 0,41} \mu m^{-2} \\ &= (5,5 \pm 0,7) \times 10^{-2} k_B T \mu m^{-2}\end{aligned}$$

5.5 Conclusões Parciais

Conforme dito na seção 4.2.3, $k_C/k_B T$ de uma membrana lipídica é da ordem de $k_C/k_B T \sim 25$. Os valores obtidos para os parâmetros elásticos nesse trabalho também são bem menores do que os esperados, como ocorre em [24], e se devem ao fato de que processos ativos ocorrem: o ATP desfaz as conexões entre o citoesqueleto e a membrana, que são refeitos depois de um tempo. Esse é o processo dinâmico que foi modelado por [24] através da temperatura efetiva, que é maior que a temperatura real da amostra. Assim as flutuações da hemácia tem origem tanto térmica quanto química.

Os valores obtidos estão de acordo com os valores mencionados por [24], indicando que a Microscopia de Desfocalização pode ser usada para a determinação das propriedades elásticas das hemácias.

Parâmetro	Hemácia Discóide	Hemácia Equinócita
Curvatura da Membrana $k_c/k_B T$	$(1,5 \pm 1,1)$	$(7 \pm 1,1)$
Parâmetro de Confinamento $\gamma/k_B T$	$(60 \pm 14) \times 10^3 \mu\text{m}^{-4}$	$(90 \pm 11) \times 10^3 \mu\text{m}^{-4}$
Módulo de Cisalhamento $\mu/k_B T$	$(3 \pm 1) \times 10^{-2} \text{nm}^{-2}$	$(5,5 \pm 1) \times 10^{-3} \text{nm}^{-2}$

Tabela 5.1: Valores para os parâmetros elásticos obtidos usando a Microscopia de Desfocalização, no limite de Δf muito grande, comparando hemácias na forma discóide e equinócita.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas

No presente trabalho nos dedicamos a aprender e aplicar duas técnicas ópticas: A Microscopia de Desfocalização e o Espalhamento Quase-Elástico de Luz. Realizamos medidas em amostras biológicas, tais como macrófagos e hemácias.

A associação da Microscopia de Desfocalização e do Espalhamento de Luz tinha por objetivo tentar explicar um modelo teórico de motilidade celular, através das flutuações presentes na membrana dessas células. Os tempos característicos dessas flutuações foram obtidos tanto pela videomicroscopia quanto pela função de autocorrelação de intensidades. O tempo da ordem de milissegundos, previsto pelo modelo, foi obtido pelo espalhamento de luz, apesar de não ser muito reprodutivo e de não termos certeza se a luz espalhada é originada nas interfaces e não no volume das células.

Além disso, uma revisão recente da teoria de desfocalização permitiu que novos experimentos fossem propostos para a aplicação dessa técnica. Nesse trabalho, apresentamos a nova teoria no limite de grandes desfocalizações e, utilizando a hemácia como objeto de estudo, encontramos uma maneira de obter os parâmetros elásticos da membrana e do citoesqueleto. Conseguimos obter comportamentos e valores compatíveis com aqueles previstos teoricamente, mas precisaremos de mais experimentos para validar estes resultados.

Esse trabalho abriu várias frentes de pesquisa no nosso grupo e nos permitiu aprimorar as técnicas e análises que já estavam sendo realizadas. A medida dos parâmetros elásticos deverá ser realizada também para os macrófa-

gos e em vesículas, que são sistemas modelo para bicamadas lipídicas. Além disso, pretendemos ampliar o uso da Técnica de Microscopia de Desfocalização para amostras inorgânicas.

Apêndice A

Protocolo para manutenção da cultura celular

A manutenção constante de uma cultura dos macrófagos é essencial para a sua sobrevivência e para garantir a "qualidade" das células que serão utilizadas nos experimentos. Descreveremos nesse apêndice o protocolo utilizado para esse procedimento.

1. Descongelar a tripsina (proteína responsável por "descolar" as células da garrafa de cultura); ligar a capela e a lâmpada ultravioleta. *É importante sempre limpar a capela e todos os instrumentos com álcool 70% antes de realizar o procedimento.*
 2. Na garrafa de cultura que está na estufa (a 37° e 5%CO₂), descartar o meio de cultura e colocar cerca de 500 μ l de tripsina para lavar o resto do meio de cultura e descartar todo o restante.
 3. Colocar 1 ml de tripsina na garrafa de cultura e coloca-lá novamente na estufa por 1 minuto. Ao retirar essa garrafa da estufa, bater levemente no fundo para "soltar" as células. Caso as células não se soltem, colocar mais 500 μ l de tripsina, voltar com a garrafa para estufa por mais 30 s.
 4. Colocar 5 ml de meio de cultura completo na garrafa para neutralizar a ação da tripsina e transferir todo o conteúdo para um tubo tipo Falcon.
-

5. Centrifugar a solução por 10 minutos à $1000rpm$. Observar a formação de um alglomerado de células no fundo do tubo (chamado pellet) e descartar somente o meio.
6. Colocar 5 *ml* de meio de cultura completo novo no tubo e colocar no agitador para ressuspender as células.
7. Contar as células usando uma câmara de Neubauer*. Diluir a solução com meio de cultura completo até obtermos 2×10^5 células/*ml*.
8. Em uma garrafa de cultura nova, colocar meio suficiente para completar 5 *ml*, considerando meio e células.

*A câmara de contagem de Neubauer é usada para contar células em meio de cultura através da observação por um microscópio de uma rede calibrada de dimensões conhecidas. Os macrófagos são contados dentro dos 25 pequenos quadrados centrais. O número obtido deve ser multiplicado por 10^4 para sabermos a quantidade por mililitros.

Apêndice B

Calibração das medidas de espalhamento usando microesferas de poliestireno: medidas do raio

Na tentativa de compreendermos os resultados obtidos no espalhamento realizado na membrana dos macrófagos, realizamos o mesmo espalhamento em microesferas de poliestireno de diâmetro nanométrico. A razão da escolha de microesferas com diâmetros dessa magnitude é o tempo característico do movimento Browniano das mesmas.

De acordo com as nossas previsões, esse tempo deveria ser bem próximo do tempo relacionado com as flutuações térmicas da membrana do macrófago, um dos requisitos para que o modelo da Catraca Browniana possa ser aplicado nesse caso. Por essa razão esse experimento é tratado como calibração: através dos tempos obtidos nesse procedimento, selecionamos a escala de tempo para o correlacionador trabalhar e podemos entender a geometria de espalhamento.

Para a realização do experimento, preparamos uma solução de $7 \mu\text{l}$ de microesferas de poliestireno em $200 \mu\text{l}$ de água deionizada ($18,3 M\Omega$). Segundo o fabricante, as microesferas tem o diâmetro de $(85 \pm 6) \text{ nm}$. O porta-amostras desse experimento é o mesmo utilizado para as hémacias (descrito em 5.3.2) e o espalhamento é realizado com o laser de He-Ne. Cada medida da função de autocorrelação temporal tem a duração de cerca de 20 minutos

para garantir uma boa relação sinal-ruído.

Se ajustarmos a curva de autocorrelação temporal da intensidade, apresentada na figura B.1 usando uma exponencial simples podemos obter o tempo característico para o movimento Browniano das microesferas:

$$\langle I(0)I(t) \rangle = B + A e^{-\frac{t}{\tau}} = B + A e^{-\Gamma t}$$

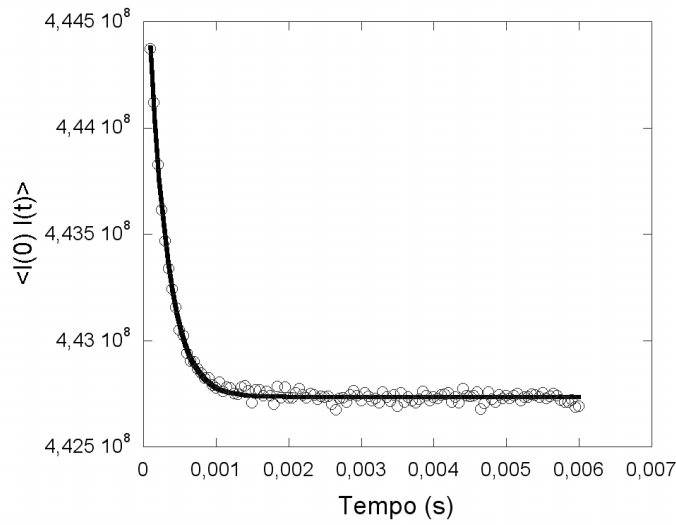


Figura B.1: Curva de autocorrelação de intensidade obtida para o espalhamento das microesferas. O ajuste é feito com uma exponencial simples e temos $\langle \tau \rangle = 0,257 \text{ ms}$ (média de cinco valores).

O valor de τ é obtido da média de um conjunto de curvas de autocorrelação. Para esse caso, o conjunto possui 5 curvas diferentes:

$$\langle \tau \rangle = 0,257 \text{ ms} \Rightarrow \langle \Gamma \rangle = \frac{10^3}{0,257} \text{ s}^{-1} = 3835,5 \text{ s}^{-1} \quad (\text{B.1})$$

Supondo uma geometria de retroespalhamento, o vetor de onda é dado por:

$$q = 2 \times n \times k_0 = 26,4 \mu\text{m}^{-1} \Rightarrow q^2 = 697,14 \mu\text{m}^{-2} \quad (\text{B.2})$$

Mas sabemos que:

$$\Gamma = q^2 \times D \Rightarrow \langle \Gamma \rangle = q^2 \times \langle D \rangle \quad (\text{B.3})$$

em que D é o coeficiente de difusão das microesferas. Além disso, estamos no regime heterodino, ou seja, temos a atuação de um oscilador local, no caso a lâmina de vidro do porta-amostras. Podemos obter $\langle D \rangle$ invertendo a equação B.3:

$$\langle D_{het} \rangle = \frac{\langle \Gamma \rangle}{q^2} \Rightarrow \langle D_{het} \rangle = \frac{3885,5}{697,14} = 5,57 \mu m^2/s = 5,57 \times 10^{-8} cm^2/s \quad (\text{B.4})$$

Usando a equação de Einstein, que relaciona o coeficiente de difusão com a temperatura e a viscosidade [31], podemos obter o raio das microesferas:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \Rightarrow \langle R \rangle = \frac{k_B T}{6\pi\eta \langle D \rangle} \quad (\text{B.5})$$

Se usarmos $\eta = 0,91 \times 10^{-2}$ poise e $k_B T = 4,1 \times 10^{-14}$ erg, na equação B.5 temos:

$$\langle R \rangle = \frac{4,1 \times 10^{-14} \text{ erg} \cdot \text{cm}}{6\pi(0,91 \times 10^{-2})(5,57 \times 10^{-8}(\text{cm}^2/\text{s}))} = \langle R \rangle \simeq 0,043 \mu m \quad (\text{B.6})$$

$$\boxed{R = 43 \text{ nm}}$$

Ou seja, obtemos um raio compatível com o valor fornecido pelo fabricante, dado por $R = (42,5 \pm 3) \text{ nm}$, comprovando que estamos com a geometria de retroespalhamento e no regime de espalhamento heterodino.

Lista de Figuras

- 2.1 O macrófago é uma célula do sistema imune inato, cuja principal função é realizar a fagocitose. Essa célula está presente em vários tecidos e recebe nomes específicos de acordo com a sua localização. Imagem feita por Microscopia de Desfocalização. 4
- 2.2 Esquema do filamento de actina: cada monômero de actina se encontra com quatro outros e o filamento se forma em dupla hélice cujo passo é de 37 nm 5
- 2.3 Esquema de funcionamento da catraca Browniana (figura da referência [1]). Temos uma membrana cujo coeficiente de difusão é dado por D em um campo de força $-f$. O filamento de actina se encontra a uma distância x da membrana. Nesse caso, temos que α e β são as taxas de adição e remoção para o monômero, de tamanho 2δ , respectivamente. 8
- 3.1 (b) Macrófago aderido em uma lâmina de vidro; (c) *Ruffles*: grandes ondas coerentes que se propagam das bordas em direção ao núcleo; (d) *Pequenas Flutuações Aleatórias*: possivelmente de origem térmica. Figura da referência [12]. 13
- 3.2 Montagem experimental utilizada nos experimentos. A linha pontilhada mostra o microscópio invertido e a microesfera representa as amostras. As imagens gravadas usando a câmera CCD são enviadas posteriormente para o computador. O laser de He-Ne é usado nos experimentos de espalhamento no qual a luz retroespalhada é coletada no detetor de fótons e enviada a um correlacionador digital que está acoplado a um computador. 17
-

-
- 3.3 (b) Função de Autocorrelação temporal obtida pela Espectroscopia de Correlação de Fótons: $\tau_1 = (20 \pm 3) \text{ ms}$ e $\tau_2 = (8 \pm 2) \text{ s}$; *inset*: 0,1 s iniciais. (c) Logaritmo da curva de autocorrelação temporal (b). 22
- 3.4 (b) Função de Autocorrelação temporal obtida pela Espectroscopia de Correlação de Fótons: $\tau_1 = (40 \pm 6) \text{ ms}$ e $\tau_2 = (9 \pm 1) \text{ s}$; *inset*: 0,1 s iniciais. (c) Logaritmo da curva de autocorrelação temporal (b). 22
- 4.1 As hemácias são as células vermelhas do sangue e a sua principal função é fazer o transporte de oxigênio através do organismo. Foto: Dave McCarthy and Annie Cavanagh/Wellcome Trust. 25
- 4.2 *Direita*: hemácia em sua forma natural conhecida com discóide; *Esquerda*: se a hemácia discóide for imersa em uma solução muito concentrada, ela sofre uma mudança obtendo uma forma chamada de equinócita. 27
- 5.1 (a) Definições de h_1 e h_2 em um corte em uma hemácia. (b) Hemácia desfocalizada: o centro da célula aparece preto se o plano focal está abaixo da metade da hemácia e branco se o plano focal está acima da metade da célula. 35
- 5.2 Mudança na forma da hemácia durante o experimento. O tempo $t = 0$ é o momento de início do experimento que tem a duração de cerca de $3h$. A imagem foi feita por Microscopia de Desfocalização. 38
- 5.3 (a): Função de autocorrelação em função do raio para uma hemácia na forma discóide. (b) Função de autocorrelação em função do raio para uma hemácia na forma equinócita. 40
-

-
- 5.4 (a) Curva para a $(\frac{1}{K_C}) \times q$ para a hemácia na forma *discóide*. No gráfico, os pontos correspondem aos dados experimentais e a linha corresponde ao ajuste. Os dados obtidos no ajuste estão ao lado da curva. (b) Curva para a $(\frac{1}{K_C}) \times q$ para a hemácia na forma *equinócita*. No gráfico, os pontos correspondem aos dados experimentais e a linha corresponde ao ajuste. Os dados obtidos no ajuste estão ao lado da curva. 41
- 5.5 Curva para $\kappa^2(r) \times r$ para a hemácia *discóide*. O raio é dado pelo número de pixels da linha utilizada para gerar a curva multiplicado pelo tamanho do pixel, que é de $0,13 \mu\text{m}$. A partir da curvatura podemos obter o valor para o módulo de cisalhamento μ do citoesqueleto. 42
- 5.6 Curva para $\kappa^2(r) \times r$ para a hemácia *equinócita*. O raio é dado pelo número de pixels da linha utilizada para gerar a curva multiplicado pelo tamanho do pixel, que é de $0,13 \mu\text{m}$. A partir da curvatura podemos obter o valor para o módulo de cisalhamento μ do citoesqueleto. 43
- B.1 Curva de autocorrelação de intensidade obtida para o espalhamento das microesferas. O ajuste é feito com uma exponencial simples e temos $\langle \tau \rangle = 0,257 \text{ ms}$ (média de cinco valores). . . . 50
-

Lista de Tabelas

- 2.1 Valores das constantes de associação (K_{on}), dissociação (K_{off}) e concentração crítica (C_c) para as duas extremidades distintas dos filamentos de actina [1]. 6
 - 3.1 Dados obtidos para os tempos caraterísticos das flutuações na membrana dos macrófagos usando a Microscopia de Desfocalização e a Espectroscopia de Correlação de Fótons. 23
 - 5.1 Valores para os parâmetros elásticos obtidos usando a Microscopia de Desfocalização, no limite de Δf muito grande, comparando hemácias na forma discóide e equinócita. 44
-

Referências Bibliográficas

- [1] **Neto, J. C.**, Motilidade do Citoesqueleto de Macrófagos e sua Relação com o Processo de Fagocitose Estudado Através da Microscopia de Desfocalização. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (Março de 2005).
 - [2] **Bray, D.**, Cell Movements: From Molecules to Motility. Garland Publishing, New York, 2nd ed. (2001).
 - [3] **Howard, J.**, Mechanics of Motor Proteins and Cytoskeleton. Sinauer Associates, Inc, Sunderland - Massachusetts (2001).
 - [4] **Theriot, J.**, “Review: The Polymerization Motor.” *Traffic* 1, 19–28 (2000).
 - [5] **Fletcher, D. and Theriot, J.**, “Tutorial: An introduction to cell motility for the physical scientist.” *Physical Biology* 1, T1–T10 (2004).
 - [6] **C. S. Peskin, G. M. O. and Oster, G. F.**, “Cellular Motions and Thermal Fluctuations: The Brownian Ratchet.” *Biophysical Journal* 65, 316–324 (1993).
 - [7] **Mogilner, A. and Oster, G.**, “Cell Motility Driven by Actin Polymerization.” *Biophysical Journal* 71, 3030–3045 (1996).
 - [8] **Born, M. and Wolf, E.**, Principles of Optics. Cambridge University Press, New York, 7th ed. (1999).
 - [9] **Agero, U., Monken, C. H., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N.**, “Cell surface fluctuations studied with Defocusing Microscopy.” *Physical Review E* 67, 051904(1–9) (2003).
-

-
- [10] Agero, U., Mesquita, L. G., Neves, B. R. A., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N., “Defocusing Microscopy.” *Microscopy Research and Technique* 65, 159–165 (2004).
- [11] Neto, J. C., Agero, U., Oliveira, D. C. P., Gazzinelli, R. T., and Mesquita, O. N., “Real-time measurements of surface dynamics on macrophages and the phagocytosis of *Leishmania* parasites.” *Experimental Cell Research* 303, 207–217 (2005).
- [12] Batista, U. A., Microscopia de Desfocalização aplicada ao estudo de fagocitose por macrófagos. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (Março de 2003).
- [13] Mesquita, O. N., Coerência Óptica e Correlação de Fótons. Belo Horizonte, MG - Brasil (2000).
- [14] Jackson, J. D., Classical Electrodynamics. John Wiley and Sons, Inc, New York, 3rd ed. (1999).
- [15] de Carvalho Teixeira, A. V. N., Estudo da Dinâmica de Cadeias e Redes Poliméricas por Simulação e Espalhamento de Luz. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (1998).
- [16] Chu, B., Laser Light scattering. Academic Press, New York, New York (1974).
- [17] de Mesquita, O. N., Espectroscopia de Correlação de Fótons. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (1979).
- [18] Shlomovitz, R. and Gov, N. S., “Membrane Waves Driven by Actin and Myosin.” *PRL* 98 (3), 168103(1–4) (2007).
- [19] Bennett, V. and Lambert, S., “The Spectrin Skeleton: From Red Cells to Brain.” *J. Clin. Invest.* 87, 1483–1489 (1991).
-

-
- [20] Gov, N., Zilman, A. G., and Safran, S., “Cytoskeleton Confinement and Tension of Red Blood Cell Membrane.” *Physical Review Letters* 90 (22), 228101(1–4) (2003).
- [21] Gratzer, W. B., “Review: The Red Cell and its Cytoskeleton.” *Biochemistry Journal* 198, 1–8 (1981).
- [22] Tachev, K., Danov, K., and Kralchevsky, P., “On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 34, 123–140 (2004).
- [23] Safran, S. A., *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces, and Membranes*. Addison-Wesley Publishing Company (1994).
- [24] Auth, T., Safran, S. A., and Gov, N. S., “Fluctuations of coupled fluid and solid membranes with application to red blood cells.” *Physical Review E* 76, 051910(1–18) (2007).
- [25] Zidovska, A. and Sackmann, E., “Brownian Motion of Nucleated Cell Envelopes Impedes Adhesion.” *Physical Review Letters* 96, 048103(1–4) (2006).
- [26] Popescu, G., Ikeda, T., Goda, K., Best-Popescu, C. A., Laposata, M., Manley, S., Dasari, R. R., Badizadegan, K., and Feld, M. S., “Optical Measurement of Cell Membrane Tension.” *Physical Review Letters* 97, 218101(1–4) (2006).
- [27] Mesquita, L. G., Agero, U., and Mesquita, O. N., “Defocusing Microscopy: An approach for red blood cell optics.” *Applied Physics Letters* 88 (133901), 133901(1–3) (2006).
- [28] Blowers, R., Clarkson, E. M., and Maizels, M., “Flicker Phenomenon in Human Erythrocytes.” *Journal of Physiology* 113, 228–239 (1951).
- [29] Brochard, F. and Lennon, J. F., “Frequency Spectrum Of Flicker Phenomenon In Erythrocytes.” *Le Journal De Physique* 36 (11), 1035–1047 (1975).
-

- [30] Ronen, S., Bortolotti, D. C. E., and Bohn, J. L., “Bogoliubov modes of dipolar condensate in a cylindrical trap.” *Physical Review A* 74, 013623(1–13) (2006).
- [31] Salinas, S. R. A., “Einstein e a Teoria do Movimento Browniano.” *Revista Brasileira de Ensino de Física* 27 (2), 263–269 (2005).
-