



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA


DEPENDÊNCIA TÉRMICA DOS EFEITOS
DE GLICEROL E SORBITOL A 1 M
SOBRE A ESTABILIZAÇÃO E DESESTABILIZAÇÃO
***IN VITRO* DE ERITRÓCITOS HUMANOS POR ETANOL**

Estudante: Francislene Glória de Freitas Reis

Orientador: Professor Dr. Nilson Penha-Silva

UBERLÂNDIA, MG

2007

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**DEPENDÊNCIA TÉRMICA DOS EFEITOS
DE GLICEROL E SORBITOL A 1 M
SOBRE A ESTABILIZAÇÃO E DESESTABILIZAÇÃO
IN VITRO DE ERITRÓCITOS HUMANOS POR ETANOL**

Estudante: **Francislene Glória de Freitas Reis**
Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R375d Reis, Francislene Glória de Freitas, 1976-
Dependência térmica dos efeitos de glicerol e sorbitol a 1 M sobre a
estabilização e desestabilização de eritrócitos humanos por etanol /
Francislene Glória de Freitas Reis - 2007.
74 f.: il.


Orientador: Nilson Penha-Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Células - Membranas - Teses. 2. Eritrócitos - Teses. I. Penha-Silva,
Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Genética e Bioquímica. II. Título.

CDU: 576.314

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Palavras-chaves: Caotrópicos, eritrócitos, estabilidade de membranas, etanol, osmólitos

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**DEPENDÊNCIA TÉRMICA DOS EFEITOS
DE GLICEROL E SORBITOL A 1 M
SOBRE A ESTABILIZAÇÃO E DESESTABILIZAÇÃO
IN VITRO DE ERITRÓCITOS HUMANOS POR ETANOL**

ESTUDANTE: **Francislene Glória de Freitas Reis**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva** (Orientador)
Examinador: Professor Dr. **Adriano O. Andrade** (UFU)
Examinador: Professor Dr. **Marcelo Emílio Beletti** (UFU)
Examinador: Professor Dr. **Marcelo Matos Santoro** (UFMG)
Examinador: Professora Dra. **Maria Goreti de Almeida Oliveira** (UFV)

DATA DE DEFESA: 28/02/2007

As sugestões da comissão examinadora e as normas da PGGB para o formato da tese foram contempladas.

Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**
(Orientador)

“O rio atinge os seus objetivos porque aprendeu a contornar os obstáculos”.

(Autor desconhecido)

“Já que você tem que pensar de qualquer forma, pense grande”.

(Donald Trump)

DEDICATÓRIA

A Deus,

por ter traçado um caminho maravilhoso para mim, onde passei e continuo passando por medos, decepções, erros, frustrações, enganos, sustos, tristezas, desânimo, mas, também, por uma imensidão de felicidades, amizades, amores, realizações... Enfim, sem passar por todos esses lugares, eu não seria a pessoa que nós conhecemos hoje.

Aos meus pais,

Luzia e Edson, meu sincero e eterno agradecimento, pois sem vocês eu não teria conseguido alcançar os meus objetivos. Obrigado pelo amor, carinho, confiança, dedicação e ajuda a mim destinados desde o meu nascimento.

Ao meu marido Marcelo,

A quem tenho que agradecer muito pela paciência, companheirismo e pelo filho que temos, o qual nos traz e continuará promovendo muitas alegrias. A você: o meu sincero amor e carinho.

Ao meu filho Marcus Vinícius,

Por ter me inspirado a dar início e término a mais uma etapa na minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A minha amiga Cynthia Barbosa Firmino, pelo companheirismo e conselhos em todos os momentos vividos na pós-graduação, incluindo o oferecimento de condições para a realização dos experimentos do Doutorado.

Ao meu estimado professor e orientador Dr. Nilson Penha-Silva, pela orientação e acolhimento em seu laboratório. Ficam aqui registrados os meus sinceros agradecimentos a essa pessoa que tive possibilidades de conhecer melhor, durante estes 4 anos de Doutorado, fazendo aumentar ainda mais a minha admiração e respeito a sua pessoa.

Aos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica e de Ciências Biológicas pela colaboração na minha formação profissional e na realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Amélia Hamaguchi, Dra. Maria Inês Homs-Brandeburgo e Dr. Foued Salmén Espíndola, pela contribuição em minha formação acadêmica, o que muito enriquece a minha experiência profissional.

À Escola Técnica de Análises Clínicas da UFU, pela ajuda na realização dos experimentos deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Enzimologia: Cleine Chagas da Cunha Arvelos, Juliana Carla da Costa Huss, Letícia Ramos de Arvelos, Lúbia Cristina Fonseca, Luiz Fernando Gouvêa-e-Silva, Mariana Vaini de Freitas, Mário da Silva Garrote Filho, Natássia Caroline Resende Corrêa, Rita de Cássia Mascarenhas Netto, Tatiana Maria Theodoro de Souza, pelos auxílios durante a execução deste trabalho e pela convivência enriquecedora.

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica, em especial Gerson Fraissat Mamede Filho, Cleuber Honorato Pereira, Maria Aparecida Vilela, Maria Marlene Macedo, Sebastiana Abadia Inácio, Sirle de Souza e Vilmar Mendes Goulart; vocês de pouquinho em pouquinho sempre me ajudaram a fazer grandes feitos.

E também ao programa de pós-graduação em Genética e Bioquímica da UFU, que me aceitou como estudante e tornou possível a conclusão e defesa deste trabalho.

ABREVIATURAS

A ₁	Absorvância antes da transição de desnaturação dos eritrócitos
A ₂	Absorvância depois da transição de desnaturação dos eritrócitos
D	Desnaturante (etanol)
D ₅₀	Concentração de etanol que produz 50% de hemólise
D _{50R}	Concentração de etanol que produz 50% de lise do estado R dos eritrócitos
D _{50T}	Concentração de etanol que produz 50% de lise do estado T dos eritrócitos
dD	Amplitude da concentração do desnaturante na transição de desnaturação
Estado R	Estado expandido dos eritrócitos
Estado T	Estado compactado dos eritrócitos
FOE	Fragilidade osmótica dos eritrócitos (estabilidade contra choque hipotônico)
H ₅₀	Concentração de NaCl que produz 50% de hemólise
P _D	Profundidade da linha sigmoidal de desestabilização (hemólise do estado T)
P _S	Profundidade da linha sigmoidal de estabilização (formação do estado T)
S ₅₀	Concentração de etanol que produz 50% de estabilização
Salina	Solução de NaCl a 0,9 g.dL ⁻¹
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença do agente desnaturante duodecil-sulfato de sódio (SDS)
T	Temperatura absoluta, dada em Kelvin
T _m	Temperatura de meia transição da desnaturação térmica

ÍNDICE

	Página
Introdução	01
Capítulo 1 (Revisão da literatura): Os eritrócitos como modelo de estudo da estabilidade de membranas	04
Composição e estrutura das membranas biológicas.....	05
Importância da estabilidade de membranas biológicas.....	07
Os eritrócitos como modelo de estudo de membranas.....	08
Efeito de osmólitos sobre a estabilidade de membranas.....	10
Efeito do etanol sobre a estabilidade de eritrócitos.....	12
Efeito de osmólitos e da temperatura sobre a estabilidade de eritrócitos.....	14
Considerações finais.....	16
Capítulo 2 (Trabalho experimental): Dependência térmica dos efeitos de glicerol e sorbitol a 1 M sobre a estabilização e desestabilização <i>in vitro</i> de eritrócitos humanos por etanol	19
Resumo.....	20
Abstract.....	22
Introdução.....	24
Material e métodos.....	26
Resultados.....	29
Discussão.....	47
Conclusões.....	56
Referências bibliográficas	57

INTRODUÇÃO

Cromossomas, proteínas e membranas são complexos organizacionais biológicos, que devem conciliar estabilidade com funcionalidade, para manterem os organismos vivos ativos em ambientes de composição química flutuante e sujeitos a oscilações físicas decorrentes do ambiente ou do próprio metabolismo.

Extremos de temperatura, pH, tonicidade e concentrações elevadas de solutos caotrópicos representam ameaças constantes ao equilíbrio entre a estabilidade e a funcionalidade dos complexos biológicos.

As células tentam combater essas ameaças, renovando seus complexos biológicos, mas também controlando a temperatura, o pH, a tonicidade e a ação deletéria de solutos caotrópicos.

Os organismos vivos podem combater a ação deletéria de solutos caotrópicos usando solutos orgânicos de baixo peso molecular, genericamente designados como osmólitos por causa de sua ação estar associada a um aumento da pressão osmótica do meio.

Há algum tempo o Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia têm estudado a ação de osmólitos em enzimas e, mais recentemente, passou também a estudar o comportamento de eritrócitos humanos frente à ação de osmólitos de ocorrência natural.

O estudo do comportamento dos eritrócitos tem por objetivo entender o efeito dos osmólitos sobre uma membrana biológica e sem dúvida sobre a própria célula da qual a membrana é um dos componentes.

As membranas biológicas desempenham inúmeras funções e qualquer alteração comprometedora de sua estabilidade e funcionalidade também afetará a estabilidade e a funcionalidade da célula e, conseqüentemente, do organismo, pois as membranas não são meras barreiras de definição de organelas, células e tecidos, mas agentes reguladores do transporte e da comunicação (transdução de sinais) entre diferentes ambientes do organismo.

Os eritrócitos humanos constituem um modelo barato e de fácil obtenção para estudo do comportamento de outras células dos organismos vivos.

O Laboratório de Enzimologia padronizou um método de estudo da dependência da hemólise de eritrócitos humanos com a concentração de etanol, em meio isotônico com o sangue. A ocorrência de hemólise é monitorada pela

absorvância em 540 nm (A_{540}), associada à liberação de hemoglobina no processo de lise dos eritrócitos.

A dependência de A_{540} com a concentração de etanol define três transições seqüenciais de naturezas sigmoidais, que podem ser estatisticamente ajustadas por regressão não-linear. A primeira transição, dada por uma sigmóide crescente, representa a transição de hemólise ou desnaturação dos estados dos eritrócitos designados como equinócitos dos tipo I e II, predominantes em baixas concentrações de etanol. A segunda transição, dada por uma sigmóide decrescente, representa uma transição de estabilização dos eritrócitos, dada pela conversão dos equinócitos dos tipos I e II em equinócitos do tipo III ou esferócitos, predominantes em concentrações mais elevadas de etanol. A terceira transição, dada também por uma sigmóide crescente, representa a transição de desnaturação dos esferócitos pelo aumento da concentração de etanol.

Neste trabalho nós nos ocupamos da caracterização da segunda e terceira transições sigmoidais apresentadas pelos eritrócitos humanos. Essas transições representam respectivamente a formação e a desnaturação dos esferócitos pelo etanol. As transições foram estudadas na presença de glicerol ou sorbitol, ambos a 1 mol.L^{-1} , no intervalo térmico entre 27 e 47 °C.

Os resultados e seus significados são apresentados e discutidos (Capítulo 2), após a contextualização do problema no âmbito da literatura científica da área (Capítulo 1).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

OS ERITRÓCITOS COMO MODELO DE ESTUDO DA ESTABILIDADE DE MEMBRANAS

COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

As membranas biológicas são complexos organizacionais biológicos compostos de lipídeos, proteínas e carboidratos [DANIELLI e DAVSON, 1935]. Os principais lipídeos encontrados nas membranas dos mamíferos são fosfolipídeos, glicoesfingolipídeos e colesterol [MURRAY e GRANNER, 2002]. A proporção entre lipídeos e proteínas varia conforme as funções mais específicas da membrana [STORRY, 2004].

Para se obter informações sobre a composição e estrutura das membranas biológicas, os pesquisadores usam várias abordagens bioquímicas, como o SDS-PAGE e a aplicação de enzimas específicas, dentre outras. Além disso, também são usadas técnicas morfológicas, dentre as quais se incluem a microscopia ótica e a microscopia eletrônica, que pode ser acompanhada de fratura por congelamento [MURRAY e GRANNER, 2002].

De todas as células humanas, os eritrócitos estão entre as mais estudadas. Há um amplo conhecimento das proteínas de membrana dessas células. Muitas dessas proteínas são transportadores de solutos [Storry, 2004]. Suas proteínas mais estudadas são a proteína da banda 3, a glicoforina, a espectrina e a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. Seus lipídeos mais abundantes são fosfatidilcolina (25%), fosfatidiletanolamina (22%), fosfatidilserina (10%), esfingomielina (18%) e colesterol (25%), como descrito na literatura [MURRAY, 2002].

O modelo que melhor retrata a estrutura das membranas biológicas é aquele proposto por Singer e Nicolson [1972], conhecido por modelo do mosaico fluido. Neste modelo, os lipídeos das membranas estão unidos entre si e distribuídos em duas camadas. A porção hidrofílica da monocamada interna fica exposta para o interior da célula, enquanto a porção hidrofílica da monocamada externa fica exposta para o exterior da célula, de tal forma que as porções hidrofóbicas de cada monocamada da membrana ficam em contato no interior da bicamada. Há proteínas anfipáticas que se distribuem ao longo desta bicamada lipídica. As proteínas e os lipídeos que constituem a membrana interagem por meio de interações de van der Waals. Essas forças são de natureza mais fraca do

que as ligações covalentes, o que é importante na determinação da consistência fluídica da membrana [MURRAY e GRANNER, 2002].

A fluidez de uma membrana é dependente da temperatura do meio, mas também de seu teor de esteróis e de ácidos graxos saturados e insaturados [CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993; SINGER e NICHOLSON, 1972].

Os ácidos graxos saturados presentes nos fosfolipídios de membrana formam uma malha altamente alinhada, que permite o estabelecimento de um maior número de interações de van der Waals em relação aos ácidos graxos insaturados *cis*-configurados, naturalmente presentes em nossas membranas. Assim, um maior teor em ácidos graxos saturados aumenta a rigidez, ou seja, diminui a fluidez de uma membrana, enquanto um maior teor em ácidos graxos insaturados *cis*-configurados diminui a rigidez ou aumenta a fluidez da membrana [MURRAY e GRANNER, 2002].

A alteração da fluidez da membrana por meio da quantidade de esteróis é explicada pela presença do núcleo rígido do anel esteróide, o qual diminui a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono. Isso resulta na diminuição da fluidez da membrana [MURRAY e GRANNER, 2002].

A elevação da temperatura aumenta a fluidez da membrana, pois o aumento da agitação térmica promove uma transição de um estado mais ordenado, semelhante a um gel, para um estado mais desordenado, semelhante a um líquido. É por isso que a transição de estado físico de uma membrana é chamada de fusão de membrana e a temperatura intermediária no processo de fusão de membrana é chamada de temperatura de fusão (T_m). Quanto maior é o teor em ácidos graxos saturados e maior é o tamanho de suas cadeias, maior é o valor de T_m da membrana [CAMPBELL, 2000; MURRAY e GRANNER, 2002; NELSON e COX, 2000; VIEIRA, GAZZINELLI e MARES-GUIA, 1996].

A estabilidade de uma membrana é uma medida de sua capacidade em manter sua estrutura, o que exige a resistência contra os agentes promotores de desnaturação, como o calor e solutos. Níveis mais elevados em ácidos graxos saturados e colesterol aumentam, portanto, a estabilidade da membrana contra a desnaturação pelo calor e por solutos caotrópicos. Entretanto, a fluidez de uma membrana é primordial para a manutenção das funções de uma célula metabolicamente ativa. Assim, uma membrana deve equilibrar estabilidade e

fluidez para manter a célula ativa. Isso exige a interação com o ambiente extracelular, que está em constante modificação, por meio de processos como o transporte de substâncias através da membrana e a recepção e transdução de sinais [MURRAY e GRANNER, 2002].

IMPORTÂNCIA DA ESTABILIDADE DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

As membranas biológicas apresentam a função primária de delimitar espaços biológicos, como células e organelas. Nesses espaços pode ser realizado um melhor controle sobre o fluxo de vários elementos, como água, eletrólitos e solutos orgânicos. Com isso, é possível criar micro-ambientes propícios para a realização de reações químicas ou processos que dependem da alteração desse micro-ambiente, como é o caso da regulação de vários genes [MURRAY e GRANNER, 2002]. Desse modo, alterações que comprometem a estabilidade de membranas afetarão o funcionamento celular, o que poderá ser bastante prejudicial para o organismo.

Outro aspecto que retrata a importância da estabilidade de membranas é o grande interesse dos biotecnologistas em preservar a integridade física e funcional de materiais biológicos naturais, como grãos de pólen, óvulos, espermatozoides, embriões, tecidos e células, particularmente de elementos figurados do sangue. A estabilidade de membranas também é muito importante na utilização biotecnológica de lipossomos, que são vesículas criadas artificialmente a partir de uma bicamada lipídica, em processos como o transporte de fármacos no interior do organismo [SCOTT, LECAK e ACKER, 2005; STOREY *et al.*, 1996].

Destes materiais biológicos, os eritrócitos biopreservados atendem à demanda clínica de pacientes com anemia, hemorragia e baixa produção de elementos sanguíneos pela medula óssea [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996; BOGNER *et al.*, 2002; DE LOECKER *et al.*, 1993; Eroglu *et al.*, 2000; MOECKEL *et al.*, 2002; PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; WAGNER *et al.*, 2002]. Nesse sentido, o uso de osmólitos naturais aparece como alternativa viável de biopreservação, distintamente da criopreservação, por não promover efeitos

deletérios nos complexos organizacionais biológicos [SCOTT, LECÁK e ACKER, 2005; STOREY *et al.*, 1996].

OS ERITRÓCITOS COMO MODELO DE ESTUDO DE MEMBRANAS

Os eritrócitos ou células vermelhas do sangue (RBC) são utilizadas em muitos estudos relacionados à composição e ao comportamento de membrana, contribuindo assim, com informações para estimar o comportamento de outras membranas celulares. Além disso, qualquer alteração da membrana das RBC, seja em sua composição ou estabilidade, serve de ferramenta diagnóstica para uma série de doenças e para estudos de comportamentos celulares mediante ganho de idade, exercícios físicos e dieta [FIRMINO, 2007; GOUVÊA-e-SILVA, 2006; MARIGLIANO *et al.*, 1999; MARRA *et al.*, 1996; MAZZANTI *et al.*, 2002; SRINIVASAN e KEMPAIAH, 2006]

Um método de baixo custo e eficácia para estudar a estabilidade de membranas de eritrócitos é o teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE). A FOE pode ser definida como a resistência de eritrócitos à hemólise por hipotonicidade. Ela é determinada pelo uso de soluções tamponadas de NaCl em água destilada em concentrações decrescentes de 0,9 a 0% [JAIN, 1986, *apud* Elias *et al.*, 2004). Em meio hipotônico, os eritrócitos aumentam de volume até atingir um volume crítico de hemólise. A partir desse ponto há um rompimento da membrana [JAIN, 1973, *apud* ELIAS *et al.*, 2004]. Nesse tipo de estudo é conveniente fazer um monitoramento da lise de eritrócitos mediante a leitura de absorvância da hemoglobina em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 540 nm [MOECKEL *et al.*, 2002; NELSON e COX, 2000]. Desse modo, podemos determinar a concentração de cloreto de sódio que causa 50% de hemólise (H_{50}).

Os eritrócitos de diferentes espécies animais podem-se comportar de modos diferentes [JAIN, 1986, *apud* ELIAS *et al.*, 2004]. Segundo Saunders e Aldrich [2001], a fragilidade osmótica de animais ectotérmicos e endotérmicos é distinta. Os eritrócitos dos animais ectotérmicos são mais resistentes.

Há diferenças na concentração de sal que determina a estabilidade normal do eritrócito em animais sadios de diferentes espécies [ELIAS *et al.*, 2004].

Essas diferenças na estabilidade dos eritrócitos são devidas a vários fatores de natureza intrínseca ou extrínseca. Os fatores intrínsecos compreendem forma, volume, tamanho e tipo do eritrócito, quantidade de hemoglobina, composição química e viscoelasticidade de sua membrana [PERK *et al.*, 1964, *apud* ELIAS *et al.*, 2004).

Ao que parece, as células menores apresentam menor capacidade de expansão e atingem o volume hemolítico crítico mais precocemente. Alterações na composição da membrana celular afetam o formato da célula em pacientes humanos, reduzindo a FOE [WEED e REED, 1966, *apud* ELIAS *et al.*, 2004; TELEN e KAUFMAN, 1999]. O tempo de vida da célula também é muito importante, já que os eritrócitos velhos, que correspondem a 30% da população eritrocitária, são mais frágeis do que os eritrócitos jovens [PERK *et al.*, 1964, *apud* ELIAS *et al.*, 2004).

Os fatores extrínsecos responsáveis pela redução da FOE compreendem variações fisiológicas, como as pós-prandiais, e também variações patológicas, que incluem a presença de hematozoários, uremia, cirrose, processos auto-imunes, dentre outros [JAIN, 1973, *apud* ELIAS *et al.*, 2004; MAKINDE e BOBADE, 1994].

Os fatores intrínsecos e extrínsecos podem estar intimamente relacionados de modo a provocar alterações na FOE. Por exemplo, em indivíduos com doenças associadas a alterações metabólicas, como insuficiência renal [SASAKI, 1977, *apud* ELIAS *et al.*, 2004] e doença hepática [OYABU *et al.*, 1982], ocorre uma modificação na proporção de fosfolípidos e de colesterol na membrana eritrocitária.

A membrana celular de eritrócitos maduros também pode sofrer alterações em sua composição lipídica de acordo com as alterações dos lipídios circulantes [DIMOPOULLOS e BEDELL, 1962, *apud* ELIAS *et al.*, 2004; TELEN e KAUFMAN, 1999]. Os eritrócitos maduros não são capazes de sintetizar lipídeos, pois desprovidos da atividade de enzimas lipogênicas como a acetil CoA carboxilase [PITTMAN e MARTIN, 1966, *apud* ELIAS *et al.*, 2004; TELEN e KAUFMAN, 1999].

EFEITO DE OSMÓLITOS SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANAS

As membranas biológicas e outros complexos organizacionais biológicos, como proteínas, cromossomos, células e tecidos, devem manter a sua estrutura organizacional íntegra para que continuem funcionais. Para tal, os organismos desenvolveram mecanismos para combaterem os fatores desestabilizadores, como extremos de pH, temperatura, pressão, tonicidade e/ou de solutos caotrópicos.

Há vários mecanismos que permitem a um organismo tolerar condições de estresse, como a incorporação de diferentes tipos de ácidos graxos na membrana plasmática, além da produção de solutos orgânicos não-iônicos de pequena massa molecular, denominados osmólitos [BOROWITZA e BROWN, 1974; BOWLUS e SOMERO, 1979; NIKOLOPOULOS e MANETAS, 1991; POLLARD e WYN JONES, 1979; YANCEY, 1985]. Os osmólitos formam soluções miscíveis com as moléculas do solvente (água) em torno do complexo biológico [BAIER e MCCLEMENTS, 2003; BAIER, DECKER e MCCLEMENTS, 2004] e atuam, portanto, como co-solventes.

Os osmólitos de ocorrência natural compreendem três classes principais: álcoois polidroxílicos (como o glicerol e o sorbitol), aminoácidos e derivados (como a glicina, a metilglicina, a dimetilglicina e a trimetilglicina) e combinação de uréia e metilaminas [SOMERO, 1986, *apud* PFEIL *et al.*, 1998; YANCEY *et al.*, 1982]. Há também os açúcares, como a sacarose e a trehalose, dentre outros [YANCEY *et al.*, 1982].

Os osmólitos também podem ser classificados, de acordo com seus efeitos sobre a atividade de proteínas, em solutos compatíveis e solutos não-compatíveis. Os solutos compatíveis são aqueles que não perturbam a atividade da proteína em temperatura próxima à ambiente [FIELDS *et al.*, 1977, *apud* PFEIL *et al.*, 1998], como glicina, sacarose, glicerol e sorbitol, mesmo estando em altas concentrações [YANCEY *et al.*, 1982]. Já os solutos não-compatíveis, como a uréia e os aminoácidos básicos livres, são aqueles que perturbam a atividade da proteína.

O acúmulo de osmólitos é uma estratégia imprescindível para a sobrevivência de vários seres vivos. É o que acontece, por exemplo, em alguns

peixes marinhos, como tubarões e arraias. A concentração de sal no corpo desses animais é inferior àquela do meio em que vivem. Para evitar problemas osmóticos, eles retêm uréia. Entretanto, níveis elevados de uréia podem provocar a desestabilização de proteínas. Para neutralizar os efeitos deletérios da uréia, esses animais marinhos produzem óxido de trimetilamina (TMAO), que é um osmólito [YANCEY *et al.*, 1982].

A origem da estabilização de membranas biológicas por osmólitos, ou osmoestabilização de membranas biológicas, é uma questão ainda controversa, mas que deve estar fundamentada em um mecanismo chamado de efeito solvofóbico [TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989] ou osmofóbico [BOLEN e BASKAKOV, 2001], originalmente usado para explicar a estabilização de proteínas por aqueles co-solventes [BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006; FIRMINO, 2007; GOUVÊA-E-SILVA, 2006].

O efeito solvofóbico ou osmofóbico é caracterizado pela maior afinidade pela água do que pela mistura osmólito-água dos grupos apolares [GEKKO e TIMASHEFF, 1981a; GEKKO e TIMASHEFF, 1981b] e do esqueleto peptídico [LIU e BOLEN, 1995] da proteína, partes da proteína que ficam mais expostas ao solvente no estado desnaturado. Assim, o osmólito é preferencialmente excluído da camada de hidratação da proteína.

As moléculas de água da camada de hidratação possuem menor mobilidade e são altamente organizadas. Como a superfície de exposição ao solvente de uma proteína no estado desnaturado é maior do que no estado nativo, isso significa que a camada de hidratação que se forma ao redor de uma proteína do estado desnaturado é maior do que aquela do estado nativo.

A formação da camada de hidratação envolve um aumento de energia livre. Como o estado desnaturado possui uma camada de hidratação mais extensa do que o estado nativo, isso significa que há uma maior quantidade de energia livre associada ao estado desnaturado do que ao estado nativo. Como os estados nativo e desnaturado estão em equilíbrio, o fato de o estado desnaturado possuir maior quantidade de energia livre promove o deslocamento desse equilíbrio em direção ao estado nativo, que passa a ser favorecido. Isso significa que o estado nativo está sendo estabilizado relativamente ao estado desnaturado.

O efeito osmofóbico também deve estar associado a outros fatores, como a exclusão espacial do osmólito e alterações na constante dielétrica e na viscosidade da solução [FIELDS, 2001; QU, BOLEN e BOLEN, 1998; SAUNDERS *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 1995; WANG e BOLEN, 1997; WANG, ROBERTSON e BOLEN, 1995; YANCEY, 2001]. Os co-solventes neutros podem modular as forças de atração e repulsão entre as proteínas [BAIER *et al.*, 2004; MCCLEMENTS, 2002; RECORD *et al.*, 1998; TIMASHEFF, 1993] e a frequência de colisões entre as moléculas da proteína, por aumento na viscosidade do meio [KULMYRZAEV, BRYANT e MCCLEMENTS, 2000; KULMYRZAEV, CANCALLIERE e MCCLEMENTS, 2000].

EFEITO DO ETANOL SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS

A ação do etanol sobre as membranas de diferentes células do organismo pode ser estudada *in vitro* a partir do estudo do comportamento dos eritrócitos na presença de etanol.

A administração de etanol *in vivo* aumentaria a fluidez da membrana [SEEMAN, 1972, *apud* YAMADA *et al.*, 1999; BURGEN e METCALFE, 1970, *apud* YAMADA *et al.*, 1999], o que resultaria em redução da velocidade de hemólise do eritrócito (BURGEN e METCALFE, 1970, *apud* YAMADA *et al.*, 1999).

Entretanto, o etanol é um agente caotrópico que promove a desnaturação de diversas proteínas, inclusive daquelas encontradas na membrana de eritrócitos humanos. Ele leva à abertura de poros por onde ocorre saída de hemoglobina [ZAVODNIK, PILETSKAIA e STEPURO, 1994].

O etanol pode induzir a geração de diferentes estados conformacionais em eritrócitos, os quais podem ser classificados em equinócitos dos estados **I (EI)**, **II (EII)** e **III (EIII)** e estomatócitos (**S**). Cada um desses estados se caracteriza por modificações específicas na forma do eritrócito. Assim, em **EI**, os eritrócitos são discóides com contorno irregular, enquanto que em **EII** essas mesmas células estão achatadas e com espículas. Já em **EIII**, tais células são esféricas

(esferócitos) com espículas, ao passo que em **S** essas células têm a forma de feijão [BESSIS *et al.*, 1972; YAMADA *et al.*, 1999].

Somente as conformações **EI** e **EII** dos eritrócitos possuem a membrana mais fluídica e a velocidade de hemólise reduzida [YAMADA *et al.*, 1999].

Isso significa que, dependendo das condições, o etanol pode estabilizar ou desestabilizar os eritrócitos, o que repercute sobre a taxa de hemólise.

Entre 0 e 45 mL.dL⁻¹ de etanol, na presença de NaCl a 0,9 g.dL⁻¹, os eritrócitos humanos sofrem uma transição de hemólise com ponto intermediário (**D**_{50R}) em 14,28 mL.dL⁻¹ de etanol, uma transição de estabilização com ponto intermediário (**S**_{50T}) em 26,49 mL.dL⁻¹ de etanol, e uma segunda transição de hemólise com ponto intermediário (**D**_{50T}) em 34,76 mL.dL⁻¹ de etanol [Gouvêa-e-Silva, 2006]. Essas transições foram ilustradas na **Figura 1.1** (página 17).

Observações por microscopia de luz mostraram que antes da primeira transição de hemólise, em 2,0 mL de etanol por dL de solução salina, os eritrócitos existiam em um estado expandido e com e sem espículas, que foi designado como estado **R** por analogia com o estado **R** das proteínas. Este estado com certeza representa os equinócitos dos estados **I** e **II** [BESSIS *et al.*, 1972; YAMADA *et al.*, 1999]. Mas antes da segunda transição de hemólise, em 32 mL de etanol por dL⁻¹ de solução salina, os eritrócitos estavam presentes em um estado contraído ou apertado, que foi designado como estado **T** por analogia com o estado **T** das proteínas [GOUVÊA-e-SILVA, 2006]. Este estado **T** com certeza representa os equinócitos do estado **III** ou esferócitos [BESSIS *et al.*, 1972; YAMADA *et al.*, 1999]. A **Figura 1.2** (página 18) mostra um modelo ilustrativo dos efeitos do etanol sobre as transições de estados morfológicos dos eritrócitos.

Assim, a transição de hemólise descrita em 14,28 mL de etanol por dL de salina deve representar a transição de desnaturação do estado **R**, enquanto as transições de estabilização e de hemólise descritas em 26,49 e em 34,76 mL de etanol por dL de salina devem representar respectivamente as transições de estabilização (geração do estado **T**) e de desnaturação do estado **T** dos eritrócitos [GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

O etanol, portanto, apresenta efeitos antagônicos sobre a membrana de eritrócitos, um efeito caotrópico e um efeito estabilizador.

Em meio aquoso, o etanol compete com a água pela formação de ligações de hidrogênio com lipídeos e proteínas da superfície da membrana. Como ele é capaz de formar ligações de van der Waals com grupos apolares, tanto de proteínas quanto dos lipídeos de membrana, ele pode contribuir para a remoção de água da superfície da membrana, o que induziria alterações na conformação das proteínas e da própria membrana. A desnaturação do estado **R** do eritrócito pelo etanol é fundamentada na ação caotrópica desse solvente [GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

Por outro lado, o efeito estabilizador do etanol fundamenta-se em sua ação como um osmólito. A incubação de eritrócitos em etanol a 26,49 mL de etanol por dL de salina gera uma situação onde predomina a ação estabilizadora sobre a ação caotrópica, mas com um aumento da concentração de etanol além de 34,76 mL de etanol por dL de salina, o próprio aumento na pressão osmótica se encarrega de promover desnaturação do estado T dos eritrócitos [GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

EFEITO DE OSMÓLITOS E DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS

Cada tipo de célula possui uma resistência intrínseca ao calor, o que possibilita o seu uso para estabilização de alimentos, tratamento de câncer, separação de linhagens celulares, dentre outras aplicações. A resistência celular ao calor pode ser reduzida por fatores físicos, como pressão elevada e radiação ionizante, e também por fatores químicos, como solventes orgânicos [WEBER e BONT, 1996], anestésicos anfifílicos [YATVIN *et al.*, 1982], detergentes, ácidos graxos, agentes desnaturantes [ALEXANDROV, 1985, *apud* IVANOV, 2002] e altos níveis de cálcio no meio extracelular [STEGE *et al.*, 1993].

As bactérias termofílicas possuem uma elevada resistência térmica devida ao elevado teor de ácidos graxos de cadeia longa e saturada nos seus lipídeos de membrana [RUSSELL e FUKUNAGA, 1990]. Essa composição lipídica da membrana celular pode ser modificada durante o desenvolvimento do organismo, conforme as condições do meio [YATVIN *et al.*, 1986; LADHA *et al.*, 1993;

SPECTOR e BURNS, 1987], no sentido de conferir à membrana a composição necessária para conciliar estabilidade e funcionalidade.

A temperatura também afeta as ações caotrópica e estabilizante de có-solventes.

O aumento da temperatura diminui o ponto da meia transição de hemólise (D_{50}) de eritrócitos pelo etanol, o que significa que o calor e o etanol apresentam um sinergismo de ação caotrópica sobre eritrócitos [BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006].

Embora, na presença de salina e a 37 °C, entre 0 e 1,5 mol.L⁻¹, o sorbitol não promova lise de eritrócitos humanos, a 1 mol.L⁻¹ ele também potencializa a ação caotrópica do etanol. Esse sinergismo de ação caotrópica entre o sorbitol e o etanol ocorre na faixa de temperatura de 27 a 47 °C, mas declina com o aumento da temperatura até desaparecer em torno de 68,6 °C, quando o sorbitol passa a combater a ação desnaturante promovida pelo etanol e pelo calor [BERNARDINO NETO, 2006].

Na presença de salina e a 37 °C, entre 0 e 2,8 mol.L⁻¹, o glicerol não promove lise de eritrócitos humanos, mas a 1 mol.L⁻¹ ele também potencializa a ação caotrópica do etanol, entre 24,7 e 45,9 °C, mas além desses limites de temperatura ele neutraliza a ação hemolítica promovida pela combinação da ação do etanol com o frio ou calor [FINOTTI, 2006].

Essa ação estabilizadora do glicerol a baixas temperaturas justifica sua utilização na criopreservação de eritrócitos [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996; BOGNER *et al.*, 2002; DE LOECKER *et al.*, 1993; EROGLU *et al.*, 2000; MOECKEL *et al.*, 2002; PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; WAGNER *et al.*, 2002]. A 4,35 mol.L⁻¹, o glicerol permite a criopreservação a -80 °C de eritrócitos humanos por períodos de até 10 anos [KRIJNEN, KUIVENHOVEN e WIT, 1968; ROWE, EYSTER e KELLNER, 1968; WALKER, 1996], sem prejuízo de sua estabilidade [WAGNER *et al.*, 2002].

A ação estabilizadora do sorbitol e do glicerol a temperaturas mais elevadas pode ser uma manifestação na membrana como um todo da ação mais específica daqueles osmólitos sobre proteínas. Tanto o glicerol quanto o sorbitol são capazes de aumentar o valor de T_m das proteínas, ou sejam, eles elevam a quantidade de calor necessária para levar as proteínas ao ponto de meia-

desnaturação pelo calor [BAIER e MCCLEMENTS, 2003; BAIER, DECKER, e MCCLEMENTS, 2004].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estabilidade da membrana de eritrócitos pode ser afetada por fatores como a alimentação, a lipogênese, a temperatura, o pH e a concentração de solutos caotrópicos e osmólitos. Um caotrópico, como o etanol apresenta uma ação dualística sobre uma membrana, podendo promover lise ou estabilização, conforme sua concentração e a ação combinada de outros fatores. Os osmólitos também apresentam uma ação dualística sobre as membranas de eritrócitos, podendo promover estabilização e desestabilização de sua estrutura, conforme sua concentração e a interferência de outros fatores.

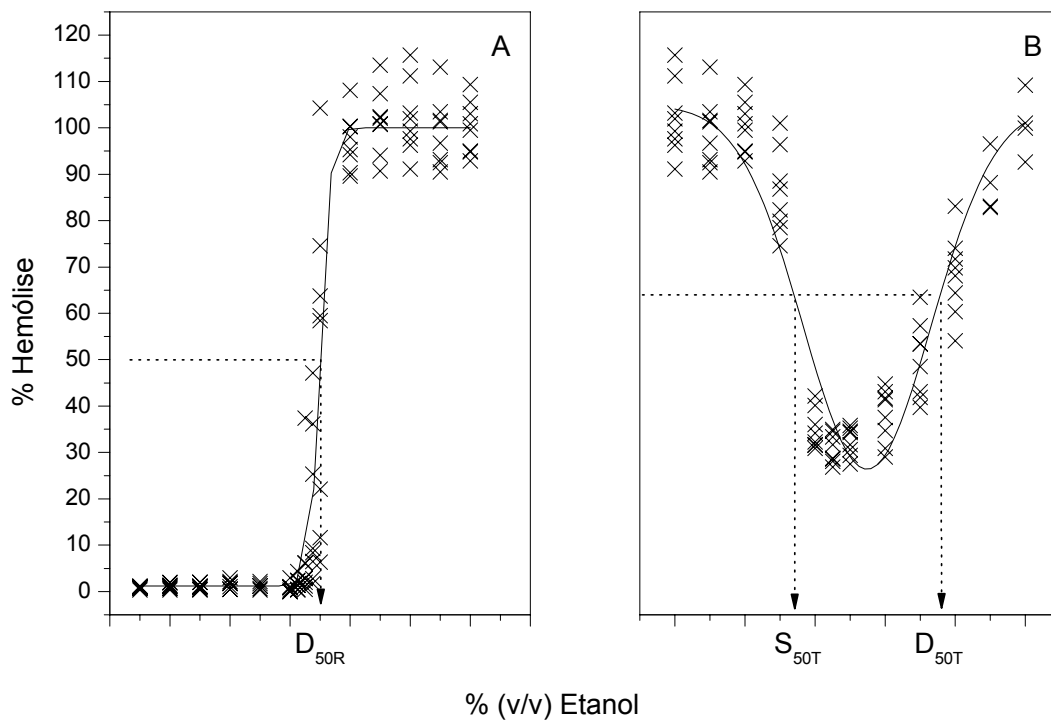


Figura 1.1. Dependência da percentagem de hemólise com a concentração de etanol em solução salina fisiológica a 37 °C. O gráfico **A** representa a lise induzida por etanol do estado morfológico **R** dos eritrócitos. Esta transição é caracterizada pela concentração de etanol que promove 50% de hemólise (D_{50R}) nos eritrócitos do estado **R**. O gráfico **B** representa a geração induzida por etanol do estado estabilizado **T** dos eritrócitos, caracterizada pelo ponto de meia-transição (S_{50T}), e seguida pela lise induzida por etanol do estado estabilizado **T**, caracterizada pelo seu ponto de meia-transição transição (D_{50T}) [GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

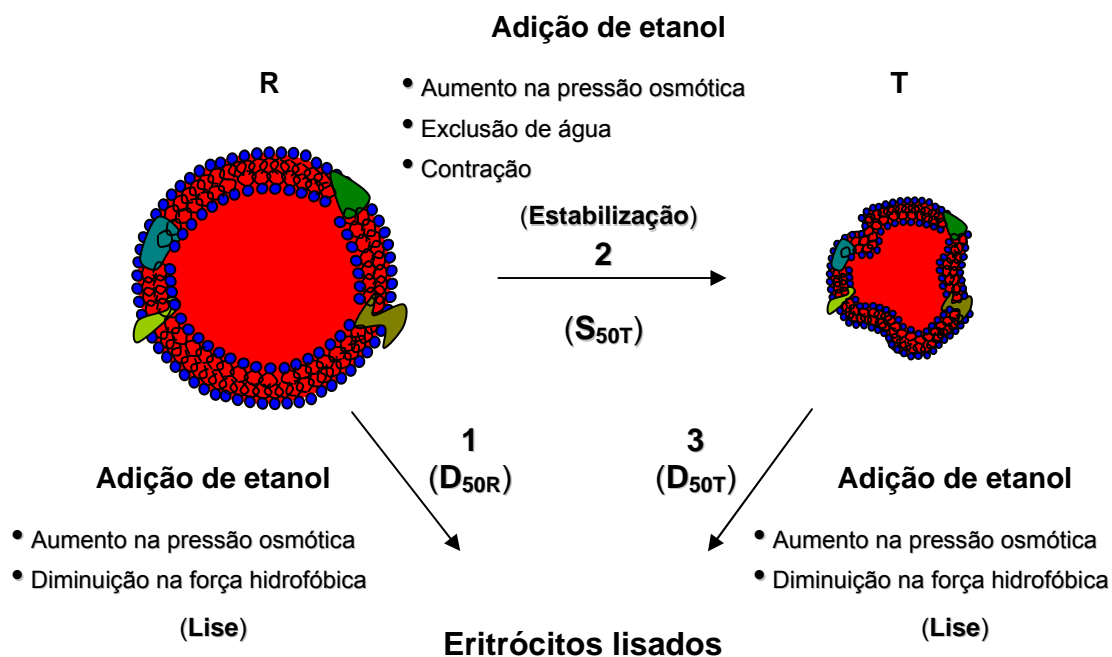


Figura 1.2. Modelo ilustrativo das ações do etanol sobre eritrócitos em solução salina. Os eritrócitos existiriam em estado morfológico expandido (**R**) ou condensado (**T**). Cada estado morfológico representaria um conjunto de diferentes formas. Baixas concentrações de etanol promoveriam lise do estado **R** (rota 1). Concentrações intermediárias de etanol promoveriam um deslocamento do estado **R** dos eritrócitos para o estado **T** (rota 2), por aumento na pressão osmótica. Altas concentrações de etanol promoveriam lise do estado **T** (rota 3) [BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006].

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

**DEPENDÊNCIA TÉRMICA DOS EFEITOS
DE GLICEROL E SORBITOL A 1 M
SOBRE A ESTABILIZAÇÃO E DESESTABILIZAÇÃO
IN VITRO DE ERITRÓCITOS HUMANOS POR ETANOL**

RESUMO

DEPENDÊNCIA TÉRMICA DOS EFEITOS DE GLICEROL E SORBITOL A 1 M SOBRE A ESTABILIZAÇÃO E DESESTABILIZAÇÃO *IN VITRO* DE ERITRÓCITOS HUMANOS POR ETANOL

Eritrócitos incubados em soluções salinas com concentrações crescentes de etanol sofrem alterações morfológicas e físico-químicas. Em solução salina de etanol a 2% os eritrócitos estão presentes em um estado morfológico expandido (**R**) e são designados como equinócitos. Entre 12,52 e 16,10% de etanol em solução salina, os eritrócitos do estado **R** sofrem uma transição sigmoide de lise, com um ponto de meia-transição de lise (D_{50R}) em 14,28% de etanol. Mas entre 24,67 e 28,37%, os eritrócitos apresentam uma transição de estabilização, com um ponto de meia transição de estabilização (S_{50}) em 26,49% de etanol. Em solução salina de etanol a 32%, eritrócitos íntegros, em meio a alguns eritrócitos lisados, estão presentes em um estado morfológico contraído (**T**) e são designados como esferócitos. Em 28,37% de etanol começa uma transição sigmoide de lise do estado **T** dos eritrócitos, com um ponto de meia transição (D_{50T}) em 34,76% de etanol. A transição de estabilização seguida da desestabilização dos eritrócitos pelo etanol forma um “buraco” na curva de hemólise em função da concentração de etanol. O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito de dois osmólitos, o glicerol e o sorbitol, ambos a 1 mol.L⁻¹, sobre a dependência térmica da estabilização e desestabilização de eritrócitos pelo etanol em solução salina fisiológica. A transição de estabilização foi caracterizada pelo ponto de meia-transição (S_{50}) e pela profundidade da sigmóide de estabilização (P_S) dos eritrócitos, que constitui uma estimativa da população de eritrócitos estabilizados. A transição de lise do estado estabilizado (**T**) foi caracterizada pelo ponto de meia-transição (D_{50T}) e pela profundidade da sigmóide de desestabilização (P_D) dos eritrócitos, que constitui uma estimativa da população de eritrócitos lisados. Os valores de S_{50} apresentaram declínios lineares estatisticamente significantes com o aumento da temperatura tanto em salina pura quanto em solução salina de glicerol ou sorbitol; além disso, as retas

de dependência térmica de S_{50} apresentaram valores de S_{50} mais baixos em salina com glicerol ou sorbitol do que em salina pura. Isso deve significar que o efeito de estabilização dos eritrócitos tem uma origem osmótica, pois tanto o aumento da temperatura quanto a incorporação de glicerol ou sorbitol aumentam a pressão osmótica do meio. Embora os valores de P_S não tenham sido significativamente afetados pelo aumento da temperatura, a presença do glicerol ou do sorbitol produziu uma dependência térmica significativa em P_S . Em temperaturas mais baixas a presença de glicerol ou sorbitol diminuiu significativamente a população de eritrócitos estabilizados, mas com o aumento da temperatura há um aumento da população de eritrócitos estabilizados. Isso sugere que o efeito estabilizador do etanol sobre os eritrócitos não tenha exclusivamente uma origem osmótica, mas esteja relacionado com uma interação direta com a malha lipídica da membrana. Os valores de D_{50T} apresentaram uma dependência negativa estatisticamente significativa com o aumento da temperatura, tanto em salina pura quanto em salina de glicerol ou sorbitol. Como os valores de D_{50T} das retas de dependência térmica foram menores na presença de glicerol e de sorbitol do que de salina pura, isso indica que a lise do estado T dos eritrócitos teria uma origem osmolar. Os valores de P_D apresentaram dependências positivas significantes tanto em salina pura quanto em salina de glicerol e sorbitol. Os baixos valores de P_D observados em salina de glicerol ou sorbitol às temperaturas mais baixas do intervalo térmico considerado são devidos à pequena população de eritrócitos estabilizados nessas condições. Em suma, glicerol e sorbitol a 1 mol.L^{-1} em solução salina fisiológica e o aumento na temperatura aumentam a pressão osmótica do meio e agem em sinergismo com o etanol tanto na formação quanto na lise do estado T dos eritrócitos.

Palavras-chave: caotrópicos, eritrócitos, estabilidade de membranas, etanol, osmólitos.

ABSTRACT

THERMAL DEPENDENCE OF THE EFFECTS OF 1 M GLYCEROL AND SORBITOL ON THE *IN VITRO* STABILIZATION AND DESTABILIZATION OF HUMAN ERYTHROCYTES BY ETHANOL

Incubation of erythrocytes in saline solutions with increasing concentrations of ethanol produces morphological and physicochemical alterations. In saline solution of 2% ethanol, erythrocytes are present in an expanded morphological state (**R**) and are designated as echinocytes. Between 12.52 and 16.10% ethanol in saline solution, the **R** state erythrocytes suffer a sigmoidal lysis transition, with a half-transition point (**D_{50R}**) at 14.28% ethanol. But between 24.67 and 28.37%, erythrocytes present a stabilization transition with a half-transition point (**S₅₀**) at 26.49% ethanol. In saline solution of 32% ethanol, integer erythrocytes are present, among lysed cells, in a contracted morphological state (**T**) and are designated as espherocytes. At 28.37% ethanol begins a sigmoidal lysis transition of the **T** state of the erythrocytes, with a half-transition point (**D_{50T}**) at 34.76% ethanol. The stabilization transition followed but the destabilization transition by ethanol forms a “hole” or “pocket” in the lysis curve of erythrocytes by ethanol. The present work had the aim to study the effect of two osmolytes, glycerol and sorbitol, both at 1 mol.L⁻¹, on the thermal dependence of the stabilization and destabilization of erythrocytes by ethanol in physiological saline solution. The stabilization transition was characterized by the half-transition point (**S₅₀**) and by the deepness of the stabilization sigmoid (**P_S**) of the erythrocytes, which constitutes an estimative of the stabilized population of erythrocytes. The lysis transition of the stabilized state (**T**) was characterized by the half-transition point (**D_{50T}**) and by the deepness of the destabilization sigmoid (**P_D**) of the erythrocytes, which constitute an estimative of the lysed population of erythrocytes. The **S₅₀** values presented statistically significant linear declines with the temperature increase in pure saline as in saline solution of glycerol and sorbitol; on the other side, the thermal dependence lines of **S₅₀** presented lower **S₅₀** values in saline solutions of glycerol or sorbitol than in a pure saline solution. This shall mean that

the stabilization effect of the erythrocytes has an osmotic origin, since the temperature increase as the incorporation of glycerol or sorbitol to the solution increased the osmotic pressure of the medium. Although the P_s values were not significantly changed by the temperature increase, the presence of glycerol and sorbitol produced significant thermal dependences for P_s . At the lower temperatures of the interval the presence of glycerol or sorbitol decreased significantly the population of stabilized erythrocytes, but with the temperature increase there is an increase in the population of stabilized erythrocytes. This suggests that the stabilizing effect of ethanol doesn't have exclusively an osmotic origin, but also an action based on a direct interaction with the lipid bilayer of the membrane. The D_{50T} values presented a negative and statistically significant dependence with the temperature increase in the pure saline solution as well in the saline solution of glycerol or sorbitol. Since the D_{50T} values of the thermal dependencies lines were smaller in the presence of glycerol and sorbitol than they were in the pure saline solution, this indicates that the lysis of the **T** state of the erythrocytes would have an osmolar origin. The P_D values presented positive and significant dependencies in pure saline solution as well as in saline solutions of glycerol and sorbitol. The smaller values of P_D observed in saline solutions of glycerol and sorbitol at the lower temperatures of the thermal interval we considered are due to the smaller population of erythrocytes that were stabilized under those conditions. In summary, 1 mol.L^{-1} glycerol or sorbitol in physiologic saline solution and the temperature increase produce increments in the osmotic pressure of the medium and act in synergism with ethanol in the formation and in the lysis of the **T** state of the erythrocytes.

Key words: chaotropics, erythrocytes, ethanol, membrane stability, osmolytes.

INTRODUÇÃO

Os eritrócitos constituem um modelo conveniente para estudo da estabilidade de membranas biológicas, devido a sua fácil obtenção e a sua capacidade de liberar, quando lisados, a proteína hemoglobina, que pode ser espectrofotometricamente monitorada em 540 nm.

A estabilidade de membrana do eritrócito é em si uma questão muito importante no diagnóstico, caracterização e monitoração de hemoglobinopatias, bem como na preservação de células sanguíneas para fins terapêuticos [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996; BOGNER *et al.*, 2002; DE LOECKER *et al.*, 1993; EROGLU *et al.*, 2000; KRIJNEN, KUIVENHOVEN e WIT, 1968; MOECKEL *et al.*, 2002; PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; ROWE, EYSTER e KELLNER, 1968; WAGNER *et al.*, 2002; WALKER, 1996].

Dentre os vários fatores que podem afetar a estabilidade da membrana dos eritrócitos estão a temperatura, o pH, a tonicidade e a concentração de solutos caotrópicos, como o etanol, e estabilizantes, como os osmólitos.

Os osmólitos são solutos capazes de estabilizar complexos biológicos como cromossomas, proteínas e membranas. Sua ação estabilizadora está relacionada com o aumento da pressão osmótica do meio, razão pela qual eles receberam a designação de osmólitos.

O etanol é um soluto caotrópico, capaz de desnaturar proteínas e danificar a membrana do eritrócito, produzindo hemólise, mas também capaz de aumentar a pressão osmótica, levando a uma estabilização de proteínas [USHA *et al.*, 2006] e de membranas.

Os eritrócitos normalmente têm um formato discóide em solução isotônica com o sangue, mas na presença de etanol eles são encontrados na forma de disco, muitas vezes com espículas (equinócitos) e de esferas (esferócitos) [BESSIS, 1972; YAMADA *et al.*, 1999], estruturas que diferem na velocidade de hemólise [YAMADA *et al.*, 1999].

A uma baixa concentração de etanol (2,0 mL de etanol por dL de salina), os eritrócitos apresentam um maior diâmetro e espículas laterais. O aumento na concentração, além de 12,52 mL de etanol por dL de salina, determina uma

transição sigmoidal crescente em A_{540} , com um ponto de meia-transição a uma concentração de etanol de $14,28 \text{ mL.dL}^{-1}$. Essa transição foi atribuída à transição de lise dos equinócitos, que constituiriam um estado relaxado ou **R** dos eritrócitos [GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

Acima de $16,10 \text{ mL}$ de etanol por dL de salina, os eritrócitos encontram-se completamente hemolisados, mas em $32,0 \text{ mL.dL}^{-1}$ eritrócitos íntegros são vistos, porém com um menor diâmetro, junto de eritrócitos completamente lisados. Entre $24,67$ e $28,37 \text{ mL.dL}^{-1}$, há um declínio sigmoidal de A_{540} , com um ponto de meia-transição a uma concentração de etanol de $26,49 \text{ mL.dL}^{-1}$. Essa transição foi atribuída à transição de formação dos esferócitos, que constituiriam um estado apertado ou **T** dos eritrócitos. A formação desse estado **T** dos eritrócitos seria devida ao efeito do etanol como osmólito [GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

Entretanto, acima de $28,37 \text{ mL.dL}^{-1}$, os eritrócitos sofrem uma transição de hemólise, com um ponto de meia-transição em $34,76 \text{ mL.dL}^{-1}$. Essa transição foi atribuída à lise do estado **T** dos eritrócitos, decorrente da elevação da pressão osmótica além de um nível crítico estabilizante em sinergismo com a ação caotrópica do etanol [GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

Os efeitos do glicerol e sorbitol, que são osmólitos não-caotrópicos, sobre a primeira transição de lise dos eritrócitos, foram estudados por este laboratório [BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006].

Neste trabalho, nós nos propusemos a estudar os efeitos do glicerol e do sorbitol sobre a transição de estabilização ou formação do estado **T** dos eritrócitos pelo etanol e sobre a transição de lise desse estado **T** no intervalo térmico entre 27 e $47 \text{ }^\circ\text{C}$.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de sangue

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia e pelos doadores voluntários recrutados, todos de aparência saudável, não fumantes, sem uso de medicação e não consumidores de bebidas alcoólicas.

Foram coletados 3 mL de sangue em seringas heparinizadas da veia antecubital de voluntários humanos masculinos (n=12, 20-28 anos), após jejum noturno de 8 a 12 horas.

Dependência da estabilidade dos eritrócitos humanos com a concentração de etanol

A estabilidade dos eritrócitos foi analisada em soluções com 12 a 60 mL de etanol por dL de salina (NaCl a $0,9 \text{ g.dL}^{-1}$). A cada unidade de uma série duplicada de frascos de evacuados, foi adicionado 1 mL da solução teste. Após pré-incubação a 27, 32, 37, 42 ou 47 °C, foram adicionados 25 μL de sangue em cada tubo. Após homogeneização e incubação em cada temperatura, os frascos foram centrifugados a 600xg por 10 minutos e os sobrenadantes foram analisados quanto à absorção espectrofotométrica da luz visível de 540 nm (A_{540}) de comprimento de onda, com uso de um espectrofotômetro Micronal B442 (São Paulo, SP, Brasil), usando como branco uma solução de NaCl a $0,9 \text{ g.dL}^{-1}$.

Dependência da estabilidade dos eritrócitos humanos com a concentração de etanol na presença de glicerol

A uma série de baterias de tubos evacuados contendo 1 mL de solução de etanol com concentrações variáveis entre 12 e 50 mL de etanol por dL de salina (NaCl a $0,9 \text{ g.dL}^{-1}$) com glicerol a 1 mol.L^{-1} , pré-incubadas a 27, 32, 37, 42 ou 47 °C, por 10 minutos, eram adicionadas alíquotas de 25 μL de sangue em cada tubo. Após homogeneização, os tubos foram incubados por 30 minutos em cada temperatura e depois centrifugados por 10 minutos a 600xg. Durante as

incubações os tubos permaneceram fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes foram lidas em 540 nm usando como branco uma solução de glicerol a 1 mol.L^{-1} em NaCl a $0,9 \text{ g.dL}^{-1}$.

Dependência da estabilidade dos eritrócitos humanos com a concentração de etanol na presença de sorbitol

A uma série de baterias de tubos evacuados contendo 1 mL de solução de etanol com concentrações variáveis entre 12 e 48 mL de etanol por dL de solução salina (NaCl a $0,9 \text{ g.dL}^{-1}$) com sorbitol a 1 mol.L^{-1} , pré-incubadas a 27, 32, 37, 42 ou 47 °C, por 10 minutos, foram adicionadas alíquotas de 25 μL de sangue em cada tubo. Após homogeneização, os tubos foram incubados por 30 minutos em cada temperatura e depois centrifugados por 10 minutos a 600xg. Durante as incubações os tubos permaneceram fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes foram lidas em 540 nm usando como branco uma solução de sorbitol a 1 mol.L^{-1} em salina.

Determinação das curvas de transição de estabilização

Os valores de A_{540} eram inicialmente locados contra as respectivas concentrações de etanol para definição das regiões onde houve transição de estabilização, caracterizada por diminuição dos valores de absorvância com o aumento da concentração de etanol. Os pontos da transição de estabilização foram analisados por regressão não linear com base na forma decrescente da equação de Boltzmann:

$$A_{540 \text{ nm}} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(C-S_{50})/dC}} + A_2 \quad (2.1),$$

em que A_1 e A_2 representam os valores máximo e mínimo de A_{540} , C é a concentração de etanol, S_{50} representa a concentração do etanol que causa 50% de estabilização e dC é a amplitude da variação da concentração de etanol na transição sigmoidal entre A_1 e A_2 . A curva e os parâmetros intrínsecos da regressão somente eram aceitos quando os valores de P eram menores do que 0,05.

A profundidade da curva de estabilização (P_s) foi obtida pela diferença entre A_1 e A_2 para cada ajuste.

Determinação das curvas de transição de hemólise do estado T dos eritrócitos

Os valores de A_{540} eram inicialmente locados contra as respectivas concentrações de etanol para definição das regiões onde houve transição de hemólise, caracterizada por aumento dos valores de absorvância com o aumento da concentração de etanol. Os pontos da transição de hemólise foram analisados por regressão não-linear com base na forma crescente da equação de Boltzmann:

$$A_{540\text{ nm}} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(C - D_{50})/dC}} \quad (2.2),$$

em que A_1 e A_2 representam os valores mínimo e máximo de A_{540} , D é a concentração de etanol, D_{50} representa a concentração do etanol que causa 50% de hemólise e dD é a amplitude da variação da concentração de etanol na transição sigmoideal entre A_1 e A_2 . A curva e os parâmetros intrínsecos da regressão somente eram aceitos quando os valores de P eram menores do que 0,05.

A profundidade da curva de lise ou desestabilização dos eritrócitos (P_D) foi feita pela diferença entre A_1 e A_2 para cada ajuste.

Edição e comparação estatística dos dados experimentais

A edição e avaliação estatística dos dados foram realizadas com o software OriginPro 7.5 (Microcal, Northampton, Massachusetts, USA). As curvas obtidas foram consideradas estatisticamente aceitáveis somente quando P foi menor que 0,05. A comparação dos dados foi realizada por análise de variância simples (**anova**) ou por análise de variância pelo teste de Tukey, com $P < 0,05$ indicando diferença significativa entre as médias.

RESULTADOS

Os efeitos da incubação de eritrócitos humanos com etanol em solução salina pura, solução salina de glicerol e solução salina de sorbitol foram estudados a 27, 32, 37, 42 e 47 °C na faixa de concentração de etanol designada como “buraco de estabilização” do etanol. A **Figura 2.1** mostra, apenas a título de ilustração, o resultado de um experimento típico sobre o comportamento dos eritrócitos no “buraco de estabilização” do etanol em solução salina de sorbitol. Nessa faixa de concentração de etanol há uma transição de estabilização seguida de uma transição de desnaturação. Ambas as transições foram ajustadas a linhas de regressão sigmoidal, como está mostrado na **Figura 2.1**. A sigmóide decrescente, à esquerda, representa a transição de estabilização dos eritrócitos. A sigmóide crescente, à direita, representa a transição de lise do estado estabilizado **T** dos eritrócitos.

A transição de estabilização por etanol foi caracterizada em solução salina pura (**Figura 2.2**) e em solução salina de glicerol (**Figura 2.3**) e de sorbitol (**Figura 2.4**), ambos a 1 mol.L⁻¹, a 27, 32, 37, 42 e 47 °C.

A transição de lise do estado **T** foi caracterizada também em solução salina pura (**Figura 2.5**) e em solução salina de glicerol (**Figura 2.6**) e sorbitol (**Figura 2.7**), ambos a 1 mol.L⁻¹, a 27, 32, 37, 42 e 47 °C.

As **Figuras 2.2 a 2.7** apresentam sigmóides que representam o comportamento geral de todos os pontos experimentais, embora para cada experimento individual tenha sido feito um ajuste independente. Os ajustes individuais permitiram a determinação do ponto intermediário da transição, **S**₅₀ para a estabilização e **D**_{50T} para a desestabilização. Todos os ajustes individuais aceitos para análise foram estatisticamente significantes (**P<0,05**), tanto para o efeito de estabilização quanto para o efeito de desestabilização (ou lise do estado estabilizado) dos eritrócitos.

Os valores de **S**₅₀ nas diferentes temperaturas e solventes estudados estão mostrados na **Tabela 2.1**. Os padrões de dependência térmica dos valores de **S**₅₀ em todos os solventes foram apresentados na **Figura 2.8**.

Os valores de D_{50T} e seus padrões de dependência térmica em cada composição do solvente estão mostrados na **Tabela 2.2** e na **Figura 2.9**, respectivamente.

Os ajustes individuais representados pelas **Figuras 2.2 a 2.7** também foram utilizados para determinação dos valores da profundidade das curvas individuais de estabilização (**Figuras 2.2 a 2.4**) e da profundidade das curvas individuais de desestabilização (**Figuras 2.5 a 2.7**).

Os valores obtidos para a profundidade da curva de estabilização (P_S) dos eritrócitos e os padrões de dependência térmica de P_S nos diferentes solventes foram mostrados na **Tabela 2.3** e na **Figura 2.10**, respectivamente.

Os valores obtidos para a profundidade da curva de desestabilização (P_D) dos eritrócitos e os padrões de dependência térmica de P_D nos solventes estudados foram mostrados na **Tabela 2.4** e na **Figura 2.11**, respectivamente.

Nas **Figuras 2.8 a 2.11**, as dependências térmicas dos valores de S_{50} , D_{50T} , P_S e P_D , respectivamente, nos três solventes utilizados (salina, salina com glicerol e salina com sorbitol) foram mostradas duas a duas. Assim, cada uma dessas figuras apresenta três gráficos, um para a comparação entre salina e salina com glicerol (**A**), um segundo para comparação entre salina com glicerol e salina com sorbitol (**B**) e um terceiro para comparação entre salina e salina com sorbitol (**C**). Nessas figuras cada linha de regressão da dependência térmica aparece entre as curvas que delimitam seus intervalos de 95% de confiança. Isso permite ao leitor ter uma idéia a respeito da ocorrência de diferença significativa entre as dependências térmicas nos solventes considerados dois a dois.

A **Tabela 2.5** sumariza a ocorrência de significância entre as retas de regressão para a dependência térmica dos parâmetros analisados (S_{50} , D_{50T} , P_S e P_D) para cada combinação dos solventes dois a dois (salina versus glicerol, salina com glicerol versus salina com sorbitol e salina versus sorbitol).

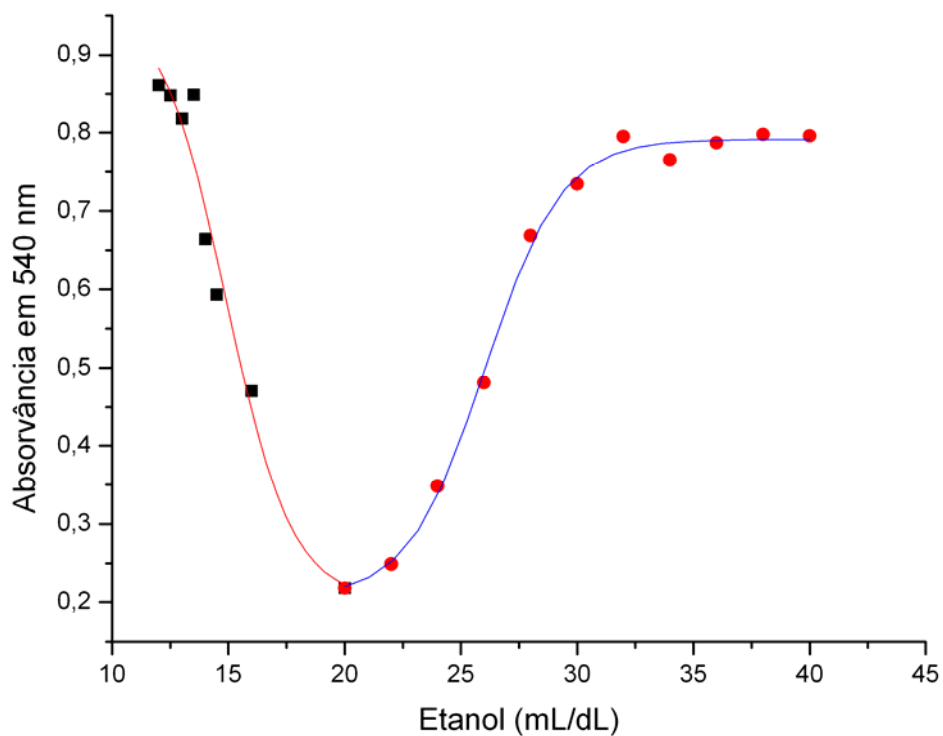


Figura 2.1. Efeito da concentração de etanol em solução salina de sorbitol a 1 mol.L^{-1} sobre a lise de eritrócitos humanos. Temperatura = $47 \text{ }^\circ\text{C}$. A dependência apresenta um formato semelhante a um buraco ou uma curva de Gauss invertida. O etanol apresentou um efeito de estabilização (■), dado por uma sigmóide decrescente (mostrada em vermelho, à esquerda), seguido de um efeito de desestabilização (●), dado por uma sigmóide crescente (mostrada em azul, à direita).

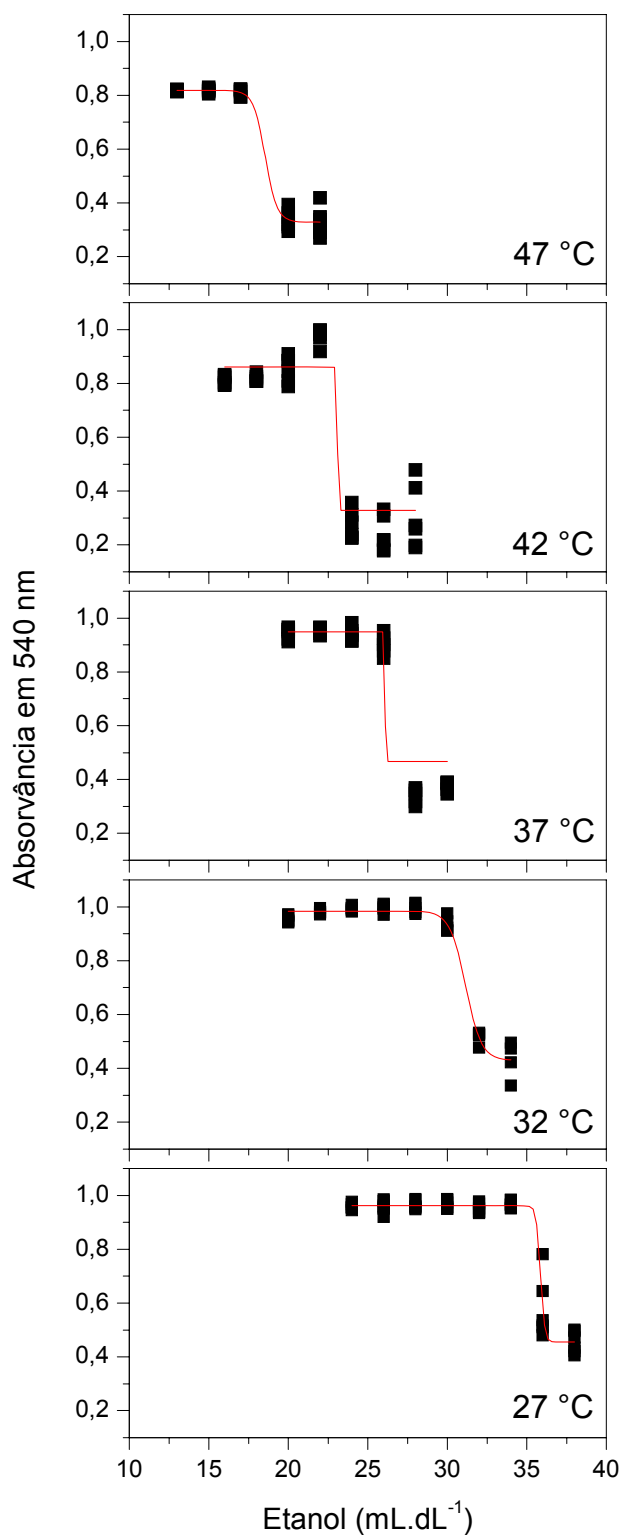


Figura 2.2. Efeito da temperatura (entre 27 e 47°C) sobre a transição de estabilização de eritrócitos humanos por etanol em solução salina fisiológica pura. Os dados de diferentes experimentos foram ajustados por uma única sigmóide em cada temperatura apenas a título de ilustração.

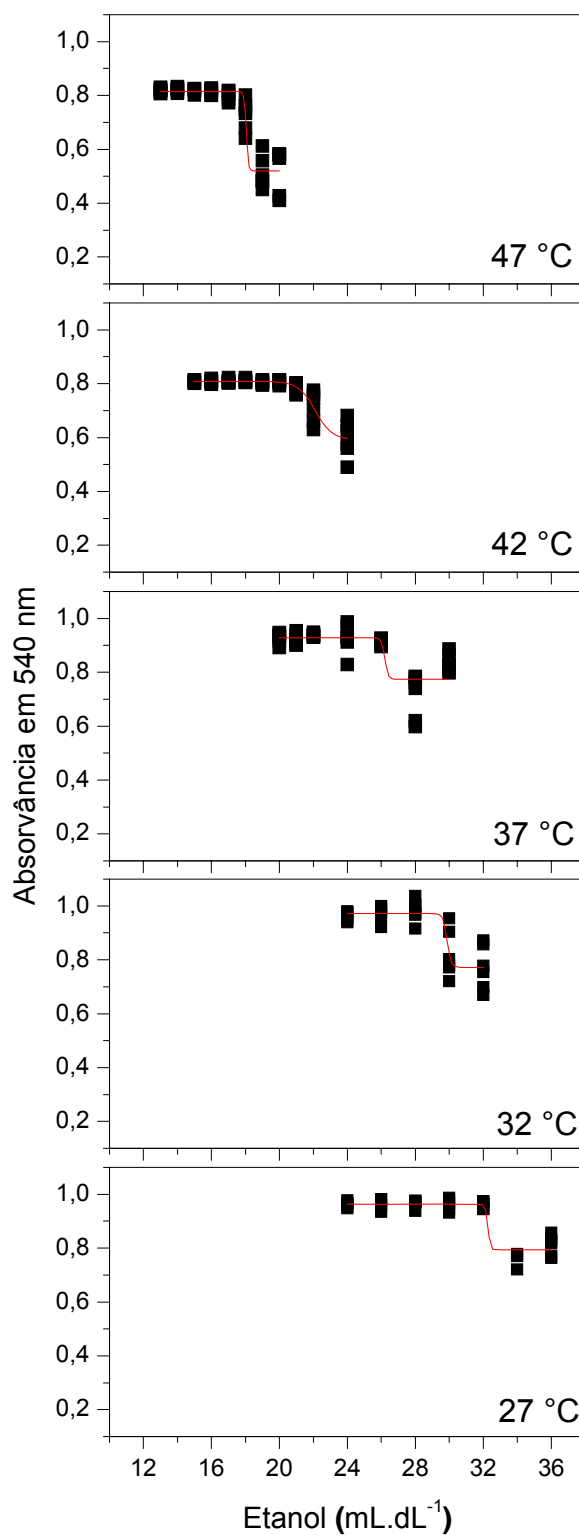


Figura 2.3. Efeito da temperatura (entre 27 e 47 °C) sobre a transição de estabilização de eritrócitos humanos por etanol em solução salina fisiológica com glicerol a 1 mol.L⁻¹. Os dados de diferentes experimentos foram ajustados por uma única sigmóide em cada temperatura apenas a título de ilustração.

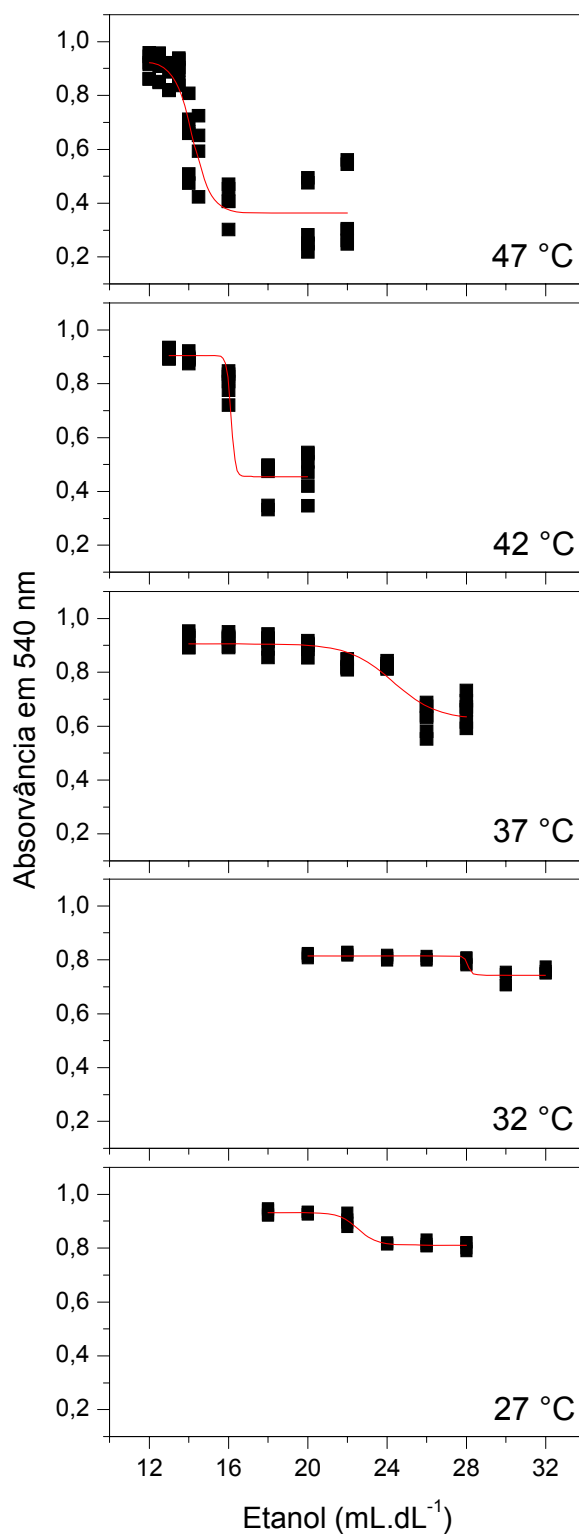


Figura 2.4. Efeito da temperatura (entre 27 e 47 °C) sobre a transição de estabilização de eritrócitos humanos por etanol em solução salina fisiológica com sorbitol a 1 mol.L⁻¹. Os dados de diferentes experimentos foram ajustados por uma única sigmóide em cada temperatura apenas a título de ilustração.

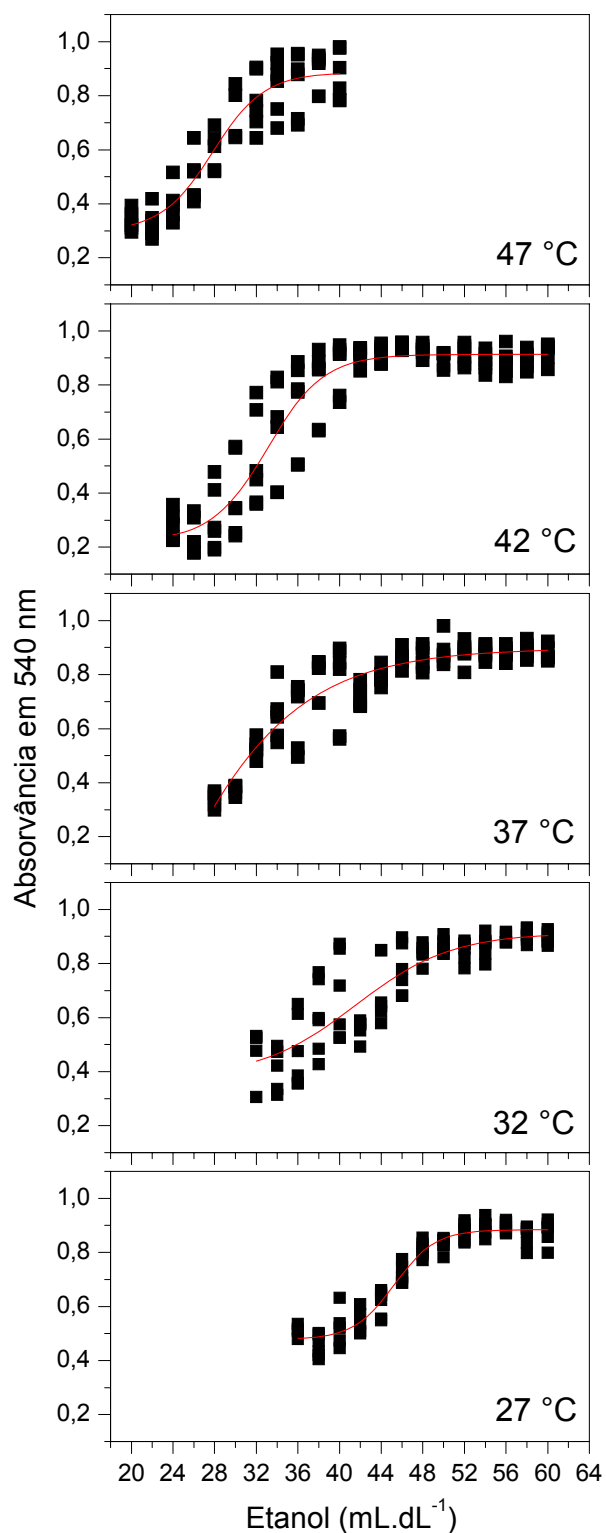


Figura 2.5. Efeito da temperatura (entre 27 e 47°C) sobre a transição de desestabilização de eritrócitos humanos por etanol em solução salina fisiológica pura. Os dados de diferentes experimentos foram ajustados por uma única sigmóide em cada temperatura apenas a título de ilustração.

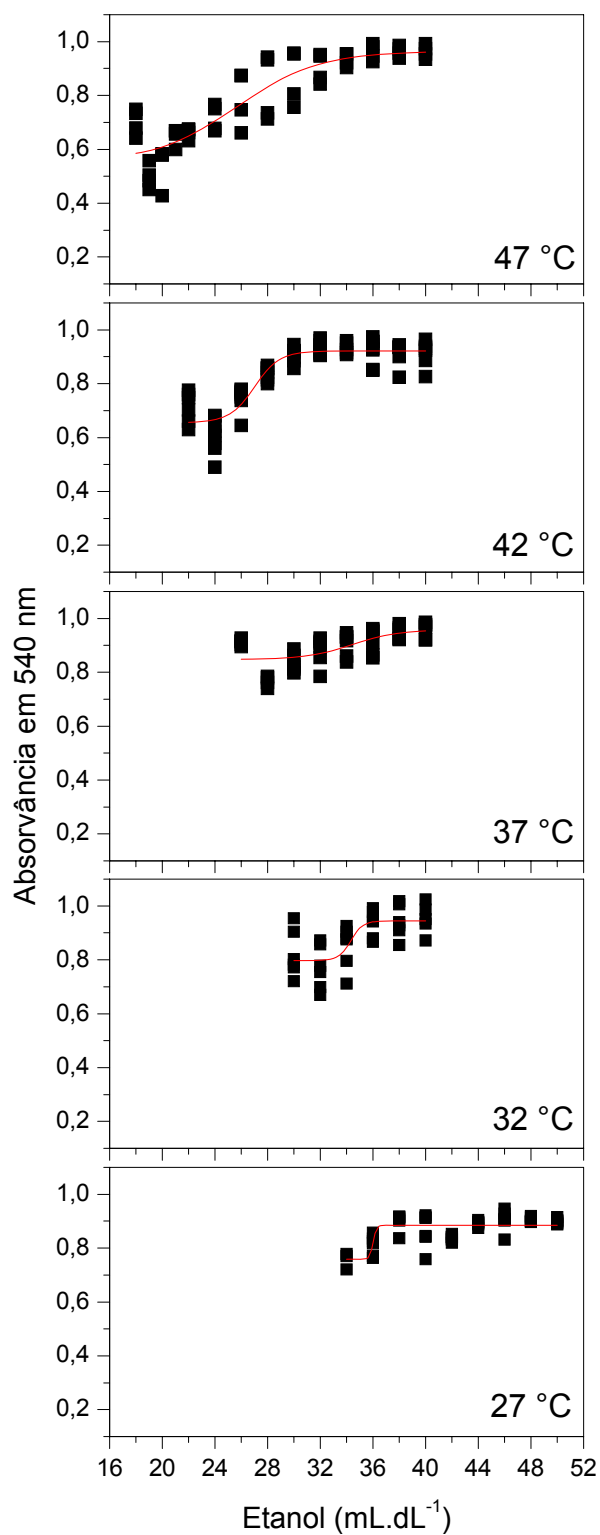


Figura 2.6. Efeito da temperatura (entre 27 e 47 °C) sobre a transição de desestabilização de eritrócitos humanos por etanol em solução salina fisiológica com glicerol a 1 mol.L⁻¹. Os dados de diferentes experimentos foram ajustados por uma única sigmóide em cada temperatura apenas a título de ilustração.

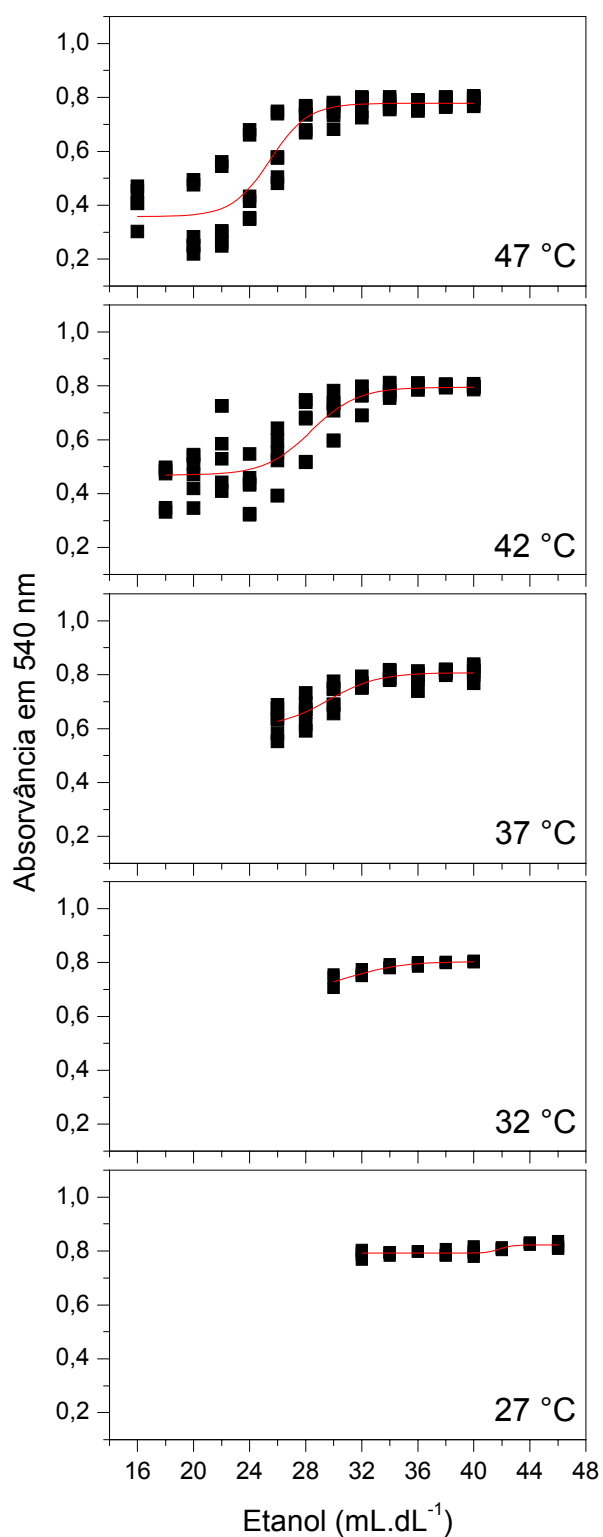


Figura 2.7. Efeito da temperatura (entre 27 e 47 °C) sobre a transição de desestabilização de eritrócitos humanos por etanol em solução salina fisiológica com sorbitol a 1 mol.L⁻¹. Os dados de diferentes experimentos foram ajustados por uma única sigmóide em cada temperatura apenas a título de ilustração.

Tabela 2.1. Efeito da temperatura e da composição do solvente sobre o ponto de meia transição de estabilização (S_{50}) do estado T de eritrócitos humanos pelo etanol, dado em mL de etanol por dL de solução salina fisiológica. A quantidade de amostras em cada situação aparece entre parênteses.

Solvente	27 °C	32 °C	37 °C	42 °C	47 °C	P
Solução salina pura	35,82±0,19 (6)	30,84± 0,56 (6)	26,66± 0,44 (6)	23,56± 0,39 (6)	18,51± 0,96 (6)	*
Solução salina com glicerol a 1 mol.L ⁻¹	32,49± 1,42 (6)	29,47± 0,77 (6)	26,39± 0,31 (6)	22,30± 0,54 (10)	18,71± 1,08 (6)	*
Solução salina com sorbitol a 1 mol.L ⁻¹	25,54±4,42 (6)	30,74±1,37 (4)	24,21±0,49 (6)	16,33±0,33 (6)	14,26±0,38 (6)	*
P	b,c	a	b,c	a,b,c	b,c	

*P<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre as temperaturas (anova).

^aP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina e salina com glicerol (teste de Tukey).

^bP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina e salina com sorbitol (teste de Tukey).

^cP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina com glicerol e salina com sorbitol (teste de Tukey).

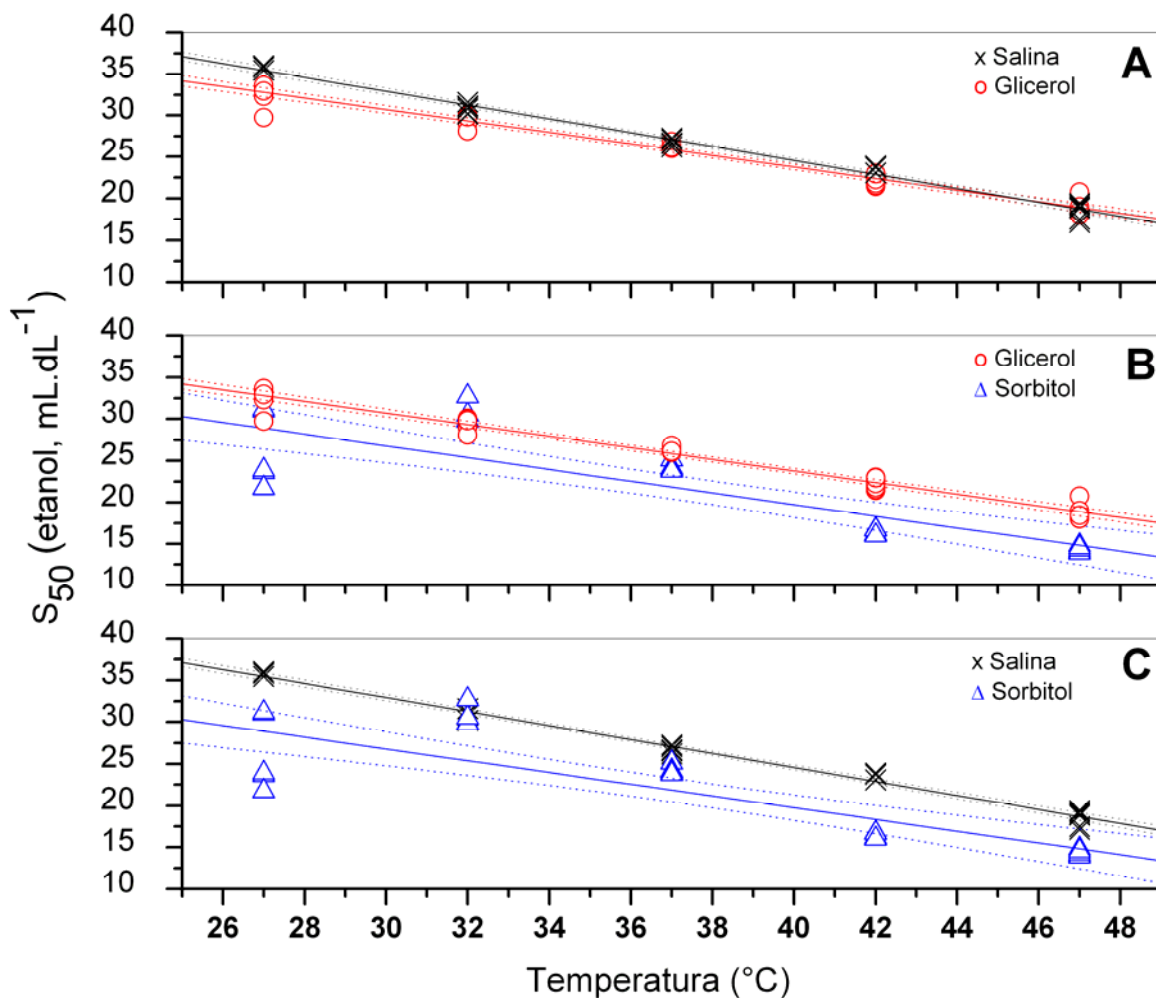


Figura 2.8. Comparação das retas de regressão da dependência térmica da meia-transição de estabilização (S_{50}) de eritrócitos humanos. Em solução salina pura: $Y = 58,1 - 0,838 X$; $N = 30$; $R = -0,994$; $P < 0,0001$. Em solução salina com glicerol a 1 mol.L^{-1} : $Y = 51,6 - 0,696 X$; $N = 34$; $R = -0,984$; $P < 0,0001$. Em solução salina com sorbitol a 1 mol.L^{-1} : $Y = 47,9 - 0,704 X$; $N = 28$; $R = -0,821$; $P < 0,0001$. As linhas contínuas centrais constituem as retas de regressão, as quais aparecem entre curvas pontilhadas que delimitam seus respectivos intervalos de 95% de confiança.

Tabela 2.2. Efeito da temperatura e da composição do solvente sobre o ponto de meia transição de lise ou desestabilização (D_{50T}) de eritrócitos humanos pelo etanol, dado em mL de etanol por dL de solução salina fisiológica. A quantidade de amostras em cada situação aparece entre parênteses.

Solvente	27 °C	32 °C	37° C	42 °C	47 °C	P
Solução salina pura	45,11±0,71 (6)	41,88±4,23 (6)	35,77±4,63 (6)	33,24±2,77 (6)	28,93±2,31 (6)	*
Solução salina com glicerol a 1 mol.L ⁻¹	36,26±0,28 (4)	34,12±0,51 (6)	31,39±2,66 (4)	25,37±1,16 (10)	28,06±2,87 (6)	*
Solução salina com sorbitol a 1 mol.L ⁻¹	42,28±1,78 (6)	33,06±2,69 (4)	29,83±0,74 (6)	27,38±1,59 (6)	24,55±1,76 (6)	*
P	a,b,c	a,b	b	a,b	b	

*P<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre as temperaturas (anova).

^aP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina e salina com glicerol (teste de Tukey).

^bP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina e salina com sorbitol (teste de Tukey).

^cP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina com glicerol e salina com sorbitol (teste de Tukey).

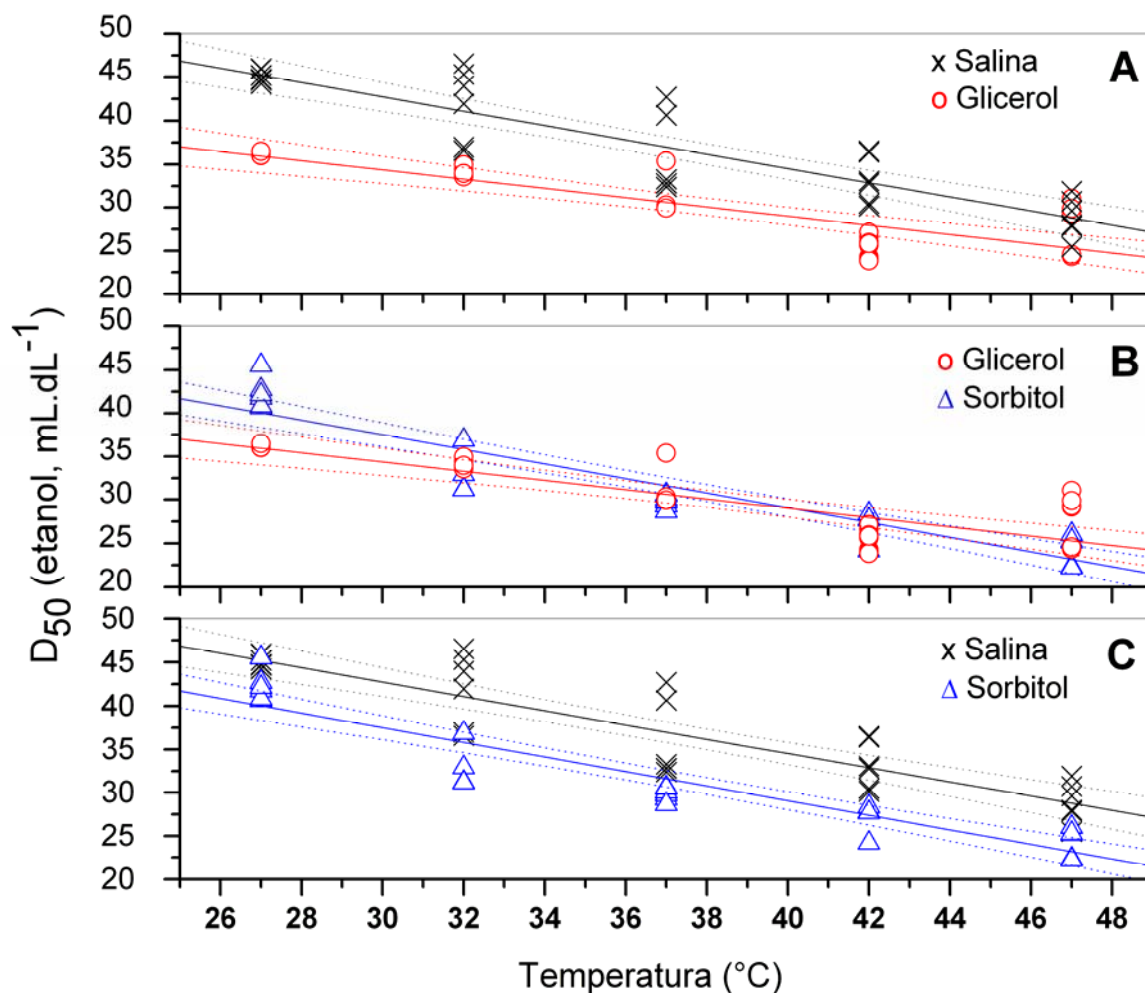


Figura 2.9. Comparação das retas de regressão da dependência térmica da meia-transição de desestabilização (D_{50T}) de eritrócitos humanos. Em solução salina fisiológica pura: $Y = 67,3 - 0,820 X$; $N = 30$; $R = -0,886$; $P < 0,0001$). Em solução salina com glicerol a 1 mol.L^{-1} : $Y = 50,4 - 0,533 X$; $N = 30$; $R = -0,814$; $P < 0,0001$. Em salina com sorbitol a 1 mol.L^{-1} : $Y = 62,7 - 0,841 X$; $N = 28$; $R = -0,930$; $P < 0,0001$. As linhas contínuas centrais constituem as retas de regressão, as quais se encontram entre curvas pontilhadas que delimitam seus respectivos intervalos de 95% de confiança.

Tabela 2.3. Efeito da temperatura e da composição do solvente sobre a profundidade da curva de transição de estabilização (P_S) ou formação do estado T de eritrócitos humanos pelo etanol, dada em variação de densidade óptica (ΔOD). A quantidade de amostras em cada situação aparece entre parênteses.

Solvente	27	32	37	42	47	P
Solução salina pura	0,500±0,0329 (6)	0,553±0,0949 (6)	0,523±0,0783 (6)	0,614±0,0594 (6)	0,502±0,0379 (6)	
Solução salina com glicerol a 1 mol.L ⁻¹	0,157±0,0311 (6)	0,199±0,0622 (6)	0,220±0,0486 (6)	0,281±0,126 (10)	0,381±0,141 (6)	*
Solução salina com sorbitol a 10 mol.L ⁻¹	0,0856±0,0463 (6)	0,291±0,3047 (4)	0,308±0,0728 (6)	0,442±0,0609 (6)	0,585±0,0950 (6)	*
P	a,b,c	a	a,b,c	a,b,c	c	

*P<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre as temperaturas (anova).

^aP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina e salina com glicerol (teste de Tukey).

^bP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina e salina com sorbitol (teste de Tukey).

^cP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina com glicerol e salina com sorbitol (teste de Tukey).

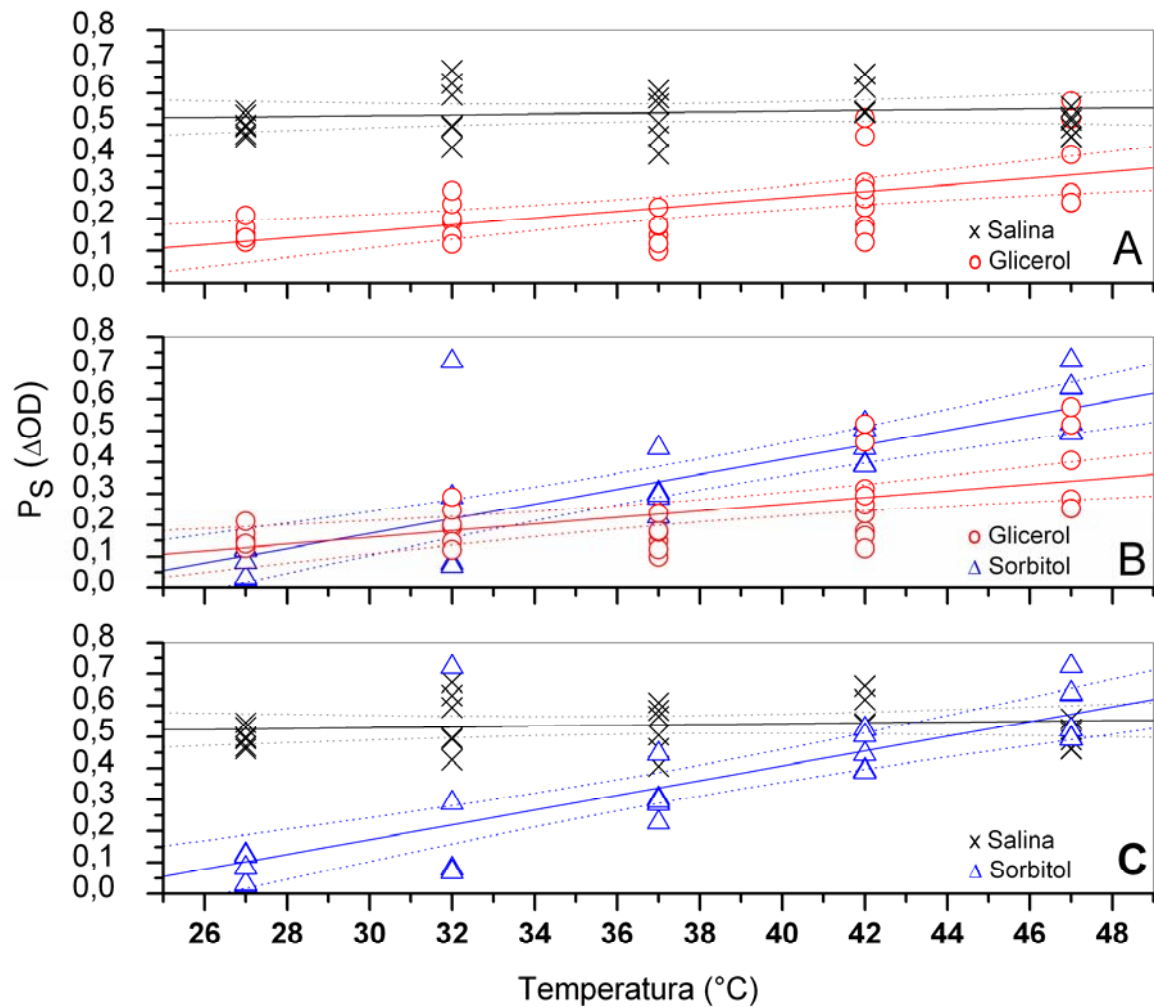


Figura 2.10. Comparação das retas de regressão da dependência térmica das profundidades das curvas de estabilização (P_S) de eritrócitos humanos. Em solução salina fisiológica pura: $Y = 0,490 + 0,0013 X$; $N = 30$; $R = 0,126$; $P = 0,507$. Em solução salina com glicerol a 1 mol.L^{-1} : $Y = -0,155 + 0,0105 X$; $N = 34$; $R = 0,591$; $P < 0,001$. Em salina com sorbitol a 1 mol.L^{-1} : $Y = -0,531 + 0,0235 X$; $N = 28$; $R = 0,813$; $P < 0,0001$. As linhas contínuas centrais constituem as retas de regressão, as quais se encontram entre curvas pontilhadas que delimitam seus respectivos intervalos de 95% de confiança.

Tabela 2.4. Efeito da temperatura e da composição do solvente sobre a profundidade da curva de transição de lise ou desestabilização (P_D) do estado T de eritrócitos humanos pelo etanol, dada em variação de densidade óptica (ΔOD). A quantidade de amostras em cada situação aparece entre parênteses.

Solvente	27 °C	32 °C	37 °C	42 °C	47 °C	P
Solução salina pura	0,415±0,0578 (6)	0,459±0,101 (6)	0,536±0,132 (6)	0,681±0,0552 (6)	0,595±0,119 (6)	*
Solução salina com glicerol a 1 mol.L ⁻¹	0,0923±0,0265 (10)	0,179±0,0413 (6)	0,200±0,0749 (4)	0,417±0,112 (8)	0,413±0,137 (6)	*
Solução salina com sorbitol a 1 mol.L ⁻¹	0,0279±0,0127 (6)	0,0921±0,0560 (4)	0,189±0,0372 (6)	0,405±0,162 (6)	0,488±0,110 (6)	*
P	a,b,c	a	a,b,c	a,b,c	c	

*P<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre as temperaturas (anova).

^aP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina e salina com glicerol (teste de Tukey).

^bP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina e salina com sorbitol (teste de Tukey).

^cP<0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre salina com glicerol e salina com sorbitol (teste de Tukey).

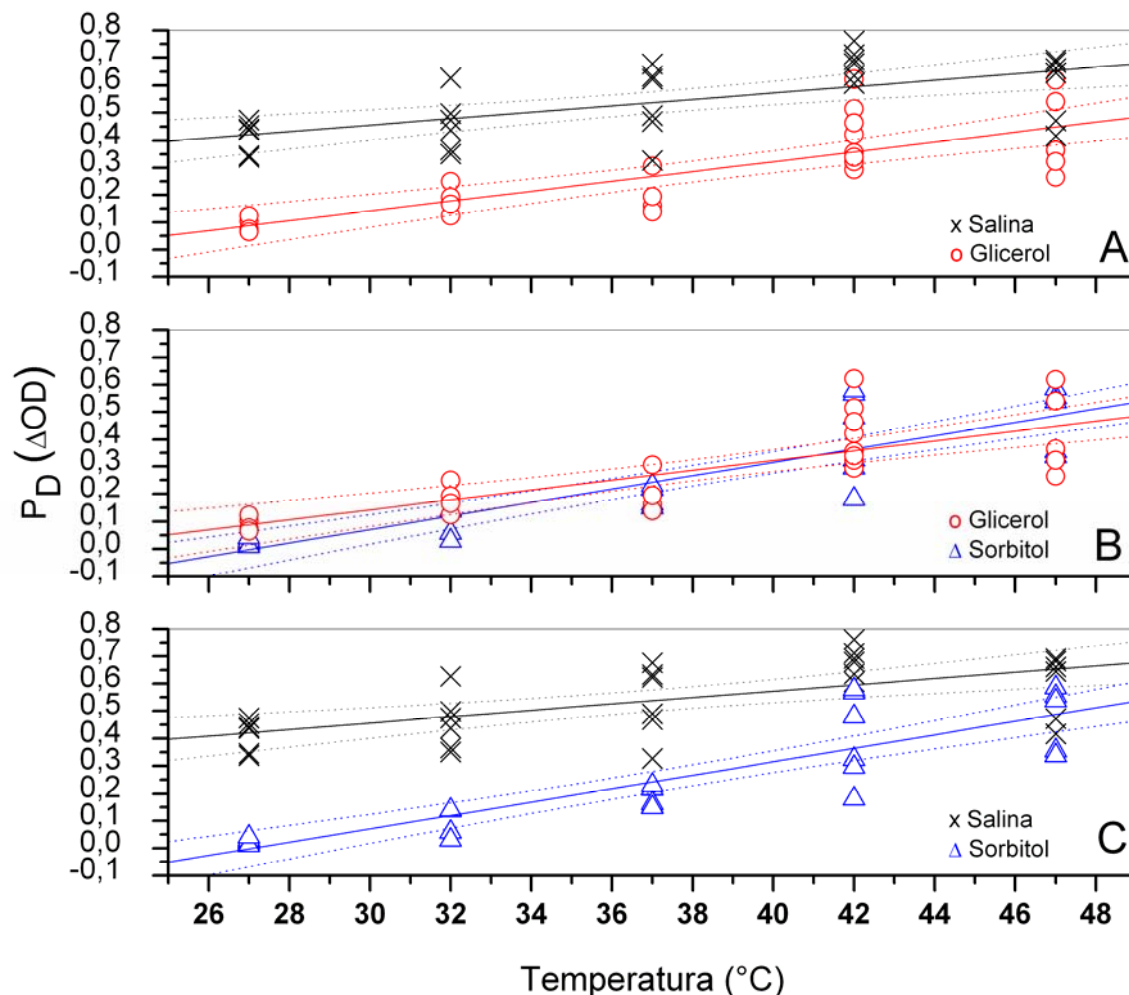


Figura 2.11. Comparação das retas de regressão da dependência térmica das profundidades das curvas de destabilização (P_D) de eritrócitos humanos. Em solução salina fisiológica pura: $Y = 0,106 + 0,0116 X$; $N = 30$; $R = 0,630$; $P = 0,000190$. Em solução salina com glicerol a 1 mol.L^{-1} : $Y = -0,399 + 0,0180 X$; $N = 28$; $R = 0,787$; $P < 0,0001$. Em solução salina com sorbitol a 1 mol.L^{-1} : $Y = -0,663 + 0,0245 X$; $N = 28$; $R = 0,883$; $P < 0,0001$. As linhas contínuas centrais constituem as retas de regressão, as quais aparecem entre curvas pontilhadas que delimitam seus respectivos intervalos de 95% de confiança.

Tabela 2.5. Ocorrência de diferença significativa entre as retas de regressão para a dependência térmica dos parâmetros analisados*.

Parâmetro	Salina x glicerol	Glicerol x sorbitol	Salina x sorbitol
S ₅₀	S	S	S
D _{50T}	S	S	S
P _S	S	S	S
P _D	S	S	S

*S indicando ocorrência de diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre retas de dependência térmica.

DISCUSSÃO

O “buraco de estabilização” do etanol

A dependência entre a taxa de hemólise, dada pela absorvância em 540 nm, e a concentração de etanol (**Figura 2.1**) tem uma aparência de poço ou buraco e foi designada na literatura como “buraco de estabilização” do etanol [BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006; GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

Neste trabalho, procuramos estudar o efeito da temperatura e de dois diferentes osmólitos sobre aquele “buraco de estabilização” do etanol.

Para dirigir melhor a análise de nossos resultados, vamos considerar separadamente os efeitos da temperatura e de cada um dos osmólitos, para então, construirmos uma análise de natureza mais global.

Efeito da temperatura sobre a transição de estabilização dos eritrócitos por etanol em solução salina

A transição de estabilização dos eritrócitos pelo etanol, que está mostrada ilustrativamente pela linha da esquerda (em vermelho) da **Figura 2.1**, foi determinada em 27, 32, 37, 42 e 47 °C, em solução salina fisiológica pura (**Figura 2.2**). Foi usada uma única escala para cada gráfico do painel, com o objetivo de propiciar uma melhor visualização do efeito da temperatura sobre a transição.

O aumento da temperatura promove uma migração da curva para a esquerda (**Figura 2.2**), de tal forma que o ponto de meia-transição de estabilização (S_{50}) estaria diminuindo com o aumento da temperatura. Antes de tentar analisar o significado dessa diminuição de S_{50} é necessário nos certificarmos se este efeito está estatisticamente fundamentado. Na **Tabela 2.1** podemos ver que há diferenças estatisticamente significantes entre os valores médios de S_{50} de cada uma das temperaturas consideradas. De fato, há uma dependência linear negativa e significativa entre S_{50} e a temperatura (**Figura 2.8**). Esse padrão de dependência é concordante com aquele descrito por GOUVÊA-e-SILVA [2006].

De posse da informação de que o aumento da temperatura promove uma diminuição estatisticamente significativa no valor de S_{50} , passamos a analisar o significado dessa tendência.

Por se tratar de um efeito de estabilização, a diminuição de S_{50} pelo aumento da temperatura não se deve à exacerbação do efeito caotrópico do etanol pelo aumento da temperatura. Entretanto, o aumento da temperatura diminui o valor de D_{50} do que seria o estado R dos eritrócitos [Bernardino Neto, 2006; Finotti, 2006], o que significa que o calor está agindo em sinergismo com o etanol na promoção da lise do estado R dos eritrócitos, pois o calor, assim como o etanol, também é um agente caotrópico [FONSECA *et al.*, 2006; NEURATH *et al.*, 1944; SCHELLMAN, 2002; TANFORD, 1970], capaz de promover mesmo *in vivo* a ocorrência de hemólise [LEPOCK *et al.*, 1989].

Se o aumento na temperatura e o etanol promovem hemólise pela alteração das propriedades tanto de lipídeos quanto de proteínas da membrana [BETZ *et al.*, 2007; CHI e WU, 1991; SVETINA *et al.*, 2004; VERTESSY e STECK, 1989; ZAVODNIK, PILETSKAIA e STEPURO, 1994], a que se deveria a diminuição de S_{50} pela temperatura? A explicação para esse efeito estabilizador poderia residir na ação do etanol como um osmólito, de tal maneira que a causa da estabilização seria a pressão osmótica imposta pelo etanol (GOUVÊA-e-SILVA, 2006).

A pressão osmótica (Π) é dada pela equação:

$$\Pi = MRT \quad (2.3),$$

onde M é a concentração molar dos solutos, R é a constante universal dos gases ($1,984 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta, dada em Kelvin.

Assim, a elevação na temperatura promoveria um aumento na pressão osmótica e uma estabilização dos eritrócitos a uma menor concentração de etanol do que ocorre em temperaturas mais baixas.

Um aumento na pressão osmótica por etanol foi apresentado como a causa da estabilização de proteínas por esse soluto [USHA *et al.*, 2006]. Essa estabilização do eritrócito estaria associada à estabilização tanto de proteínas quanto da própria malha lipídica da membrana.

O aumento da temperatura e o próprio etanol não estão deixando de agir como caotrópicos, mas concomitantemente eles ajudam a estabilizar o estado T dos eritrócitos pelo aumento na pressão osmótica. Na faixa de concentração em torno de S_{50} , o resultado líquido dessa ação dualística e antagônica do etanol é a estabilização do eritrócito.

A profundidade do efeito de estabilização (P_s) é uma medida da quantidade de eritrócitos que sofreu estabilização (**Figura 2.2**). A comparação estatística entre os valores de profundidade da estabilização em solução salina (**Tabela 2.3**) revelou que as diferenças não são estatisticamente significantes. Por outro lado, também não houve dependência significativa ($P = 0,507$) entre os valores de P_s e a temperatura (**Figura 2.10**). Isto significa que o aumento da temperatura não afetou a quantidade de eritrócitos que foram estabilizados pelo aumento na concentração do etanol em solução salina.

Efeito da temperatura sobre a transição de estabilização dos eritrócitos por etanol em solução salina de glicerol

O glicerol é um osmólito da classe dos álcoois polidroxílicos, muito utilizado em estudos de osmoestabilização de eritrócitos [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996; BERNARDINO NETO, 2006; DE LOECKER *et al.*, 1993; PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; WAGNER *et al.*, 2002].

Na presença de glicerol a 1 mol.L^{-1} em solução salina, o aumento da temperatura também promove uma migração da curva para a esquerda (**Figura 2.3**), de tal forma que o ponto de meia-transição de estabilização (S_{50}) também estaria diminuindo com o aumento da temperatura. A diminuição de S_{50} com o aumento na temperatura também foi estatisticamente significativa na presença de glicerol a 1 mol.L^{-1} como foi na ausência deste osmólito (**Tabela 2.1**). Um corolário útil para sustentação dessa afirmação é a significância estatística da reta de regressão linear obtida para a dependência entre S_{50} e a temperatura (**Figura 2.8**).

A diminuição em S_{50} também é coerente com a natureza osmolar do efeito de estabilização pelo etanol.

Uma comparação dos valores de profundidade da estabilização pelo etanol (em solução salina de glicerol) entre as diferentes temperaturas revela que o aumento da temperatura altera significativamente os valores de P_s (**Tabela 2.3**). De fato, P_s aumenta de forma significativa com o aumento da temperatura (**Figura 2.10**). Isso significa que, na presença de glicerol a 1 mol.L^{-1} , o aumento da temperatura aumenta a quantidade de eritrócitos que está sofrendo estabilização pelo etanol.

Efeito da temperatura sobre a transição de estabilização dos eritrócitos por etanol em solução salina de sorbitol

O sorbitol, assim como o glicerol, é também um osmólito da classe dos álcoois polidroxílicos muito estudado para estabilização de eritrócitos [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996; DE LOECKER *et al.*, 1993; FINOTTI, 2006; PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; WAGNER *et al.*, 2002].

Na presença de solução salina de sorbitol a 1 mol.L^{-1} , também houve mudança (**Figura 2.3**), estatisticamente significativa (**Tabela 2.1**), do ponto de meia-transição de estabilização (S_{50}) com o aumento da temperatura. Realmente, os valores de S_{50} apresentaram uma dependência negativa significativa com o aumento da temperatura na presença de sorbitol, dentro do intervalo térmico considerado (**Figura 2.8**).

Como o sorbitol é um co-solvente que estabiliza complexos biológicos pelo aumento da osmolaridade do meio, ele vai agir de modo sinérgico com o etanol e a temperatura, promovendo um aumento na pressão osmótica. Esta observação reforça a idéia de que o efeito estabilizador tem uma origem osmótica.

O aumento da temperatura altera significativamente a profundidade da estabilização (**Tabela 2.3**). De fato, os valores de P_S aumentaram significativamente com o aumento da temperatura (**Figura 2.10**). Isso mostra que, na presença de sorbitol a 1 mol.L^{-1} , o aumento da temperatura aumenta a quantidade de eritrócitos que está sofrendo estabilização pelo etanol.

Efeito de osmólitos sobre a dependência térmica da transição de estabilização dos eritrócitos por etanol em solução salina

Tanto em solução salina pura quanto em solução salina de glicerol ou de sorbitol o aumento da temperatura promoveu diminuição estatisticamente significativa em S_{50} (**Figura 2.8**).

Mas será que a incorporação de glicerol ou sorbitol promoveu alterações significantes em S_{50} ?

Essa pergunta pode ser respondida pela comparação entre os valores de S_{50} obtidos na presença de cada um dos solventes (**Tabela 2.1**). Houve diferença estatisticamente significativa nos valores de S_{50} obtidos em solução salina em relação aos valores obtidos em solução salina de sorbitol em todas as

temperaturas utilizadas, exceto a 32 °C. Esse mesmo padrão de significância também foi encontrado entre os valores de S_{50} obtidos em solução salina de sorbitol em relação àqueles obtidos em solução salina de glicerol. Mas os valores de S_{50} em solução salina foram significativamente diferentes dos valores obtidos em solução salina de glicerol apenas a 32 e 42 °C (**Tabela 2.1**).

Esse padrão não-homogêneo no comportamento dos solventes utilizados pode ser mais bem caracterizado pela análise da influência do solvente na dependência térmica de S_{50} . A **Figura 2.8** mostra as comparações possíveis da dependência térmica de S_{50} nos três solventes utilizados. As diferenças entre as linhas de dependência térmica entre os solventes foram estatisticamente significantes (**Tabela 2.5**).

Se a origem do efeito estabilizador do etanol é osmótica e a incorporação do osmólito aumenta a pressão osmótica do meio, com certeza a incorporação de glicerol ou sorbitol deveria promover estabilização dos eritrócitos. De fato, esta estabilização pode ser inferida pelo abaixamento significativo (**Tabela 2.5**) da linha de dependência térmica de S_{50} tanto na presença de glicerol quanto de sorbitol em relação à solução salina pura (**Figura 2.8**).

A influência do solvente pode manifestar-se não somente no ponto de meia-transição de estabilização (S_{50}), mas também na profundidade dessa transição (P_S).

Houve diferença significativa entre os valores de P_S nos três solventes, analisados dois a dois, a 27, 37 e 42 °C (**Tabela 2.3**). Os valores de P_S aumentaram significativamente com o aumento da temperatura na presença de solução salina de glicerol e de sorbitol, mas não de solução salina pura (**Figura 2.10**). Porém houve significância estatística nas diferenças entre os padrões de dependência térmica de P_S nos diferentes solventes (**Tabela 2.5**). Isso significa que a incorporação de glicerol ou sorbitol à solução salina altera a população de eritrócitos que é estabilizada pelo etanol (estado **T**). Nas temperaturas inferiores do intervalo térmico considerado, a incorporação de glicerol ou sorbitol diminuiu bastante a população de eritrócitos estabilizados. Entretanto, com o aumento na temperatura aumenta também a população de eritrócitos estabilizados (**Figura 2.10**).

O efeito estabilizante do etanol sobre eritrócitos não deve ter uma natureza puramente osmótica, mas deve também estar relacionado com uma ação direta sobre a membrana. A capacidade do etanol em preservar constante a população de eritrócitos no estado **T** dentro da faixa térmica utilizada (**Figura 2.10**) estaria também associada a sua capacidade de interagir diretamente com a malha lipídica da membrana. O etanol é capaz de aumentar a fluidez da membrana do eritrócito [YAMADA *et al.*, 1999]. A incorporação de glicerol ou sorbitol a temperaturas mais baixas está prejudicando essa ação do etanol sobre o estado **T** dos eritrócitos, pois os valores de P_s diminuem com a diminuição da temperatura e aumentam com o aumento da temperatura pela ação daqueles solutos (**Figura 2.10**).

Efeito da temperatura sobre a transição de desestabilização do estado T dos eritrócitos por etanol em solução salina

A transição de lise dos eritrócitos pelo etanol em solução salina, que está mostrada ilustrativamente pela linha da direita (em azul) da **Figura 2.1**, foi determinada em 27, 32, 37, 42 e 47 °C (**Figura 2.5**). Foi usada uma única escala para cada gráfico do painel, a fim de permitir uma melhor visualização do efeito da temperatura sobre a transição.

O aumento da temperatura promove um deslocamento da curva para a esquerda (**Figura 2.5**), de tal forma que o ponto de meia-transição de hemólise (D_{50T}) estaria diminuindo com o aumento da temperatura. De fato, há diferenças estatisticamente significantes entre os valores de D_{50T} obtidos às diferentes temperaturas consideradas (**Tabela 2.2**). Além disso, os valores de D_{50T} apresentaram uma dependência negativa significativa com o aumento da temperatura (**Figura 2.9**).

Por se tratar de um efeito de desestabilização, a diminuição de D_{50T} com o aumento da temperatura deve-se à exacerbação do efeito caotrópico do etanol. Com o aumento na temperatura, há necessidade de uma menor concentração de etanol para promover 50% de lise dos eritrócitos, o que significa que o calor está agindo em sinergismo com o etanol na promoção da lise do estado **T** dos eritrócitos.

Entretanto, como o valor de D_{50} do estado **T** a 37 °C (Tabela 2.2), 35,77 mL de etanol por dL de solução salina (**Tabela 2.2**), é muito maior do que o valor de D_{50} reportado para o estado **R** dos eritrócitos, 14,28 mL de etanol por dL de solução salina [GOUVÊA-e-SILVA, 2006], a lise do estado **T** dos eritrócitos está também associada à ação do etanol como um osmólito. Existe um valor crítico de osmolaridade além do qual o etanol passa a estimular a lise em detrimento da estabilização do eritrócito.

A profundidade da curva de desestabilização (P_D) ou lise do estado **T** é uma medida da quantidade de eritrócitos que está sofrendo a transição de lise. Os valores de P_D foram significativamente diferentes nas temperaturas utilizadas (**Tabela 2.4**). O aumento significativo de P_D com o aumento na temperatura (**Figura 2.11**) é uma evidência da origem osmótica da transição de lise do estado **T** dos eritrócitos pelo etanol em solução salina.

Efeito da temperatura sobre a transição de desestabilização do estado T dos eritrócitos por etanol em solução salina de glicerol

Na presença de solução salina de glicerol a 1 mol.L⁻¹, o aumento da temperatura também promove uma migração da curva para a esquerda (**Figura 2.6**), de tal forma que o ponto de meia-transição de desestabilização (D_{50}) do estado **T** dos eritrócitos também estaria diminuindo com o aumento da temperatura. De fato, houve diferença estatisticamente significativa nos valores de D_{50T} obtidos nas diferentes temperaturas utilizadas (**Tabela 2.2**). Os valores de D_{50T} diminuíram significativamente com o aumento na temperatura (**Figura 2.9**), o que sugere uma natureza osmolar para a desestabilização do estado **T** dos eritrócitos pelo etanol.

Os valores de profundidade da desestabilização (P_D) pelo etanol (em solução salina de glicerol) foram significativamente alterados pela temperatura (**Tabela 2.3**), de tal modo que P_D aumenta com o aumento da temperatura (**Figura 2.10**). Isso mostra que, na presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹, o aumento da temperatura aumenta a quantidade de eritrócitos que está sofrendo desestabilização pelo etanol.

Efeito da temperatura sobre a transição de desestabilização do estado T dos eritrócitos por etanol em solução salina de sorbitol

Em solução salina de sorbitol a 1 mol.L^{-1} , também houve mudança (**Figura 2.7**), estatisticamente significativa (**Tabela 2.2**), do ponto de meia-transição de desestabilização (D_{50T}) com as mudanças na temperatura. Os valores de D_{50T} diminuiriam significativamente com o aumento da temperatura na presença de sorbitol, dentro do intervalo térmico considerado (**Figura 2.8**), o que suporta a idéia de que o efeito desestabilizador tenha uma origem osmótica.

A mudança na temperatura também altera significativamente a profundidade da curva de desestabilização (**Tabela 2.3**). Houve aumento significativo nos valores de P_D (**Figura 2.10**), o que mostra que, na presença de sorbitol a 1 mol.L^{-1} , o aumento da temperatura aumenta a quantidade de eritrócitos que está sofrendo lise pelo etanol.

Efeito de osmólitos sobre a dependência térmica da transição de desestabilização do estado T dos eritrócitos por etanol em solução salina

O aumento da temperatura promoveu diminuição estatisticamente significativa em D_{50T} tanto em solução salina pura quanto em solução salina de glicerol ou de sorbitol (**Figura 2.9**).

Mas será que houve diferenças significantes de D_{50T} entre os solventes?

Houve diferença significativa nos valores de D_{50T} entre os três solventes somente a $27 \text{ }^\circ\text{C}$. A 32 e $42 \text{ }^\circ\text{C}$ houve diferença significativa entre salina e salina com glicerol e entre salina e salina com sorbitol, mas não entre salina com glicerol e salina com sorbitol. A $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a diferença foi significativa apenas entre a solução salina e a solução salina de sorbitol (**Tabela 2.2**).

Entretanto, a forma mais apropriada de lidar com a questão é pela análise do padrão de dependência térmica entre os solventes (**Figura 2.9**). Uma comparação entre as linhas de regressão de D_{50T} em função da temperatura mostrou a existência de significância entre todos os três solventes quando comparados dois a dois (**Tabela 2.5**).

Os menores valores de D_{50} na reta de dependência térmica de D_{50T} (**Figura 2.9**) observados na presença de glicerol e sorbitol significam que esses osmólitos estão potencializando a lise osmótica do estado T dos eritrócitos. Lise osmótica

de eritrócitos pode ocorrer por ação do próprio glicerol e do sorbitol [ARAKAWA *et al.*, 1977; EBER *et al.*, 1992] e é considerada dependente da fluidez lipídica da membrana [ARAKI e RIFKINDI, 1981]. Como o etanol e o calor alteram a fluidez de membrana, o valor de D_{50} do estado **T** é resultante do conjunto de ações dualísticas e antagônicas tanto do etanol e do calor quanto dos próprios osmólitos.

Em relação à profundidade da desestabilização (P_D), houve diferença significativa entre os valores de P_D nos três solventes, analisados dois a dois, a 27, 37 e 42 °C (**Tabela 2.4**). A 32 °C, a diferença foi significativa apenas entre salina e glicerol. Mas a 47 °C, a diferença foi significativa entre salina e sorbitol (**Tabela 2.4**).

Também aqui a forma mais apropriada de lidar com a questão é pela comparação da dependência térmica de P_D (**Figura 2.11**). Em todos os solventes, os valores de P_D aumentaram significativamente com o aumento da temperatura (**Figura 2.11**). Além disso, as retas de dependência térmica de P_D também foram diferentes entre os diferentes solventes quando comparadas duas a duas (**Tabela 2.5**). Como os valores de P_D foram sempre menores na presença de glicerol ou sorbitol, isso deve significar que esses osmólitos estariam diminuindo a população de eritrócitos do estado **T** que sofre lise pelo etanol no intervalo térmico considerado (**Figura 2.11**).

Em suma, glicerol ou sorbitol a 1 mol.L^{-1} em solução salina fisiológica, o aumento na concentração de etanol e na temperatura agem em sinergismo, aumentando a pressão osmótica do meio até um valor crítico, onde a formação do estado **T** dos eritrócitos é favorecida, mas além desse valor crítico, um aumento na pressão osmótica por qualquer um daqueles agentes (glicerol, sorbitol, etanol ou calor) promove a lise do estado **T** dos eritrócitos.

CONCLUSÕES

Os valores de S_{50} apresentaram declínios lineares significantes com o aumento na temperatura tanto em salina pura quanto em solução salina de glicerol ou sorbitol; além disso, as retas de dependência térmica de S_{50} apresentaram valores de S_{50} mais baixos em salina com glicerol ou sorbitol do que em salina pura. Isso deve significar que o efeito de estabilização dos eritrócitos tem uma origem osmótica, pois tanto o aumento da temperatura quanto a incorporação de glicerol ou sorbitol aumentam a pressão osmótica do meio.

Embora P_S não tenha sido significativamente afetado pela temperatura, a presença do glicerol ou do sorbitol produziu uma dependência térmica significativa em P_S . Em temperaturas mais baixas a presença de glicerol ou sorbitol diminuiu a população de eritrócitos estabilizados, mas o aumento da temperatura elevou a população de eritrócitos estabilizados. Isso sugere que o efeito estabilizador do etanol sobre os eritrócitos não tenha exclusivamente uma origem osmótica, mas esteja relacionado com uma interação direta com a malha lipídica da membrana.

Os valores de D_{50T} apresentaram uma dependência negativa com o aumento da temperatura, tanto em salina pura quanto em salina de glicerol ou sorbitol. Como os valores de D_{50T} das retas de dependência térmica foram menores na presença de glicerol e de sorbitol do que de salina pura, isso indica que a lise do estado T dos eritrócitos teria uma origem osmolar.

Os valores de P_D apresentaram dependências positivas significantes tanto em salina pura quanto em salina de glicerol e sorbitol. Os baixos valores de P_D observados em salina de glicerol ou sorbitol às temperaturas mais baixas do intervalo térmico considerado são devidos à pequena população de eritrócitos estabilizados nessas condições.

Em suma, glicerol ou sorbitol a 1 mol.L^{-1} em solução salina fisiológica e o aumento na temperatura aumentam a pressão osmótica do meio e agem em sinergismo com o etanol tanto na formação quanto na lise do estado T dos eritrócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arakawa, M.; Kondo, T.; Mitsui, H.; Suzuki, S.; Shiba, M. Glycerol-induced hemolysis of mammalian erythrocytes and inhibition of the lysis by fructose. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 73, p. 541-547, 1977.

Baier, S.K., Decker, E.A., McClements, D.J. Impact of glycerol on thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 91-100, 2004.

Baier, S.K.; McClements, D.J. Impact of sorbitol on the thermostability and heat-induced gelation of bovine serum albumin. **Food Research International**, v. 36, p. 1081-1087, 2003.

Bakaltcheva, I.B.; Odeyale, C.O.; Spargo, B.J. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1280, n. 1, p. 73-80, 1996.

Bernardino Neto, M. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2006. Nilson Penha-Silva (Orientador).

Bessis, M. Red cell shapes. An illustrated classification and its rationale. **Nouvelle Revue Française d'Hématologie**, v. 12, p. 721-746, 1972.

Betz, T.; Bakowsky, U.; Müller, M.R.; Lehr, C.-M.; Bernhardt, I. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. **Bioelectrochemistry**, v. 70, p. 122-126, 2007.

Bogner, P.; Sipos, K.; Ludány, A.; Somogyi, B.; Miseta, A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. **European Biophysical Journal**, v. 31, p. 145-152, 2002.

Bolen, D.W.; Baskakov, I.V. Review: the osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, n.5, p. 955-963, 2001.

Borowitzka, L.J.; Brown, A.D. The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. **Archiv fur Mikrobiologie**, v. 96, n. 1, p. 37-52, 1974.

Bowlus, R.D.; Somero, G.N. Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 208, n. 2, p. 137-151, 1979.

Campbell, M.K. **Bioquímica**. 3^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Chi, L.-M; Wu, W.-G. Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1062, p. 46-50, 1991.

Cribier, S.; Morrot G.; Zachowski, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 48, p. 27-32, 1993.

Danielli J.F.; Davson H. A contribution to the theory of permeability of thin films. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 5, p. 495-508, 1935.

De Loecker R.; Goossens W.; Van Duppen V.; Verwilghen, R.; de Loecker W. Osmotic effect of the dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. **Cryobiology**, v. 30, p. 279-285, 1993.

Eber, S.W.; Pekrun, A.; Neufeldt, A.; Schroter, W. Prevalence of increased osmotic fragility of erythrocytes in German blood donors: screening using a modified glycerol lysis test. **Annals of Hematology**, v. 64, p. 88-92, 1992.

Elias, F.; Lucas, S.R.R.; Hagiwara, M.K.; Kogika, M.M.; Mirandola, M.S. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 413-418, mar-abr, 2004.

Eroglu A.; Russo M.J.; Bieganski R.; Fowler A.; Cheley S.; Bayley H.; Toner M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 163-167, 2000.

Fields, P.A. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, N.Y., v. 129, p. 417-431, 2001.

Finotti, C.J. **Dependência térmica da osmoestabilização de eritrócitos por glicerol**. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2006. Nilson Penha-Silva (Orientador).

Firmino, C.B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos. Uberlândia**, 2007. 89f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

Fonseca, L.C.; Corrêa, N.C.R.; Garrote-Filho, C.C.; Penha-Silva, N. Effects of the solvent on the stability of proteins in aqueous solutions. **Química Nova**, v. 29, p. 543-548, 2006.

Gekko, K.; Timasheff, S.N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. **Biochemistry**, v. 20, n. 16, p. 4667-4676, 1981a.

Gekko, K.; Timasheff, S.N. Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glicerol. **Biochemistry**, v. 20, n. 16, p. 4677-4686, 1981-b.

Gouvêa e Silva, L.F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**. Uberlândia, 2006, 53f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

Ivanov, I.T. Incorporation of sphingomyelin increases thermostability of human erythrocyte membrane and resistance of erythrocytes against thermal hemolysis. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, p. 285–289, 2002.

Krijnen, H.W.; Kuivenhoven, A.C.; Wit, J.J. The preservation of blood cells in the frozen state. Experiences and current methods in the Netherlands. **Cryobiology**, n. 5, p. 3024-3029, 1968.

Kulmyrzaev, A.; Bryant, C. M.; McClements, D. J. Influence of sucrose on thermal denaturation, gelation and emulsion stabilization of whey proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1593–1597, 2000.

Kulmyrzaev, A.; Cancelliere, C.; McClements, D. J. Influence of sucrose on cold-gelation of heat-denatured whey protein isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1314–1318, 2000.

Ladha, S.; Kingston, C.A.; Manning, R.; Bowler, K. Effect of dietary modulation of membrane lipid composition on the thermostability of HTC cells and of a membrane enzyme. **International Journal of Hyperthermia**, v. 9, n. 4, p. 503-515, 1993.

Lepock J.R.; Frey, H.E.; Bayne, H.; Markus, J. Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 980, p. 191-201, 1989.

Liu, Y.; Bolen, D.W. The peptid backbone plays a dominant role in proteins stabilization by naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**, v. 34, n. 39, p. 12884-12889, 1995.

Makinde, M.O.; Bobade, P.A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science**, v.57, n.3, p.343-348, 1994.

Marigliano, V.; Tarzia, A.; Modesti, D.; Masella, R.; Cantafora, A.; Bauco, C.; Salvati, A.M.; Scuteri, A.; Caprari, P. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 34, n. 1, p., 47-57, 1999.

Marra, M.; Pieri, C.; Moroni, F. Food restriction increase the protection of erythrocytes against the hemolysis induced by peroxy radicals. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 87, p. 15-23, 1996.

Mazzanti, L.; Franceschi, C.; Nanetti, L.; Salvolini, E.; Staffolani, R.; Moretti, N.; Rabini, R.A. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 657-663, 2002.

McClements, D.J. Modulation of globular protein functionality by weakly interacting cosolvents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 45(2), 417-471, 2002.

Moeckel, G.W.; Shadman, R.; Fogel, J.M.; Sadrzadeh, S.M.H. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life Sciences** v. 71, n. 20, p. 2413-2424, 2002.

Murray, R.K. Eritrócitos e leucócitos. In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. **Harper's Biochemistry**. 9^a. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 919 p. Cap. 60, p. 763-779, 2002.

Murray, R.K.; Granner, D.K. Membranas: estrutura, montagem e função. In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. **Harper's Biochemistry**. 9^a. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 919 p., cap. 43, p. 505-533, 2002.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: Worth, 2005.

Neurath, H.; Greenstein, J.P.; Putnam, F.W.; Erickson, J.O. The chemistry of protein denaturation. **Chemical Reviews**, v. 34, p. 157-265, 1944.

Nikolopoulos, D.; Manetas, Y. Compatible solutes and *in vitro* stability of *salsola soda* enzymes: proline incompatibility. **Phytochemistry**, v. 30, p. 411-413, 1991.

Oyabu, H.; Tsumoto, S.; Kageyama, T. Clinical investigation on the osmotic fragility of erythrocytes in cirrhosis of the liver. **Bulletin of the Osaka Medical School**, v.28, p.33-45, 1982.

Pellerin-Mendes, C.; Million L.; Marchand-Arvier, M.; Labrude, P.; Vigneron C. In vitro study of the protective effect of the trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 35, p. 173-186, 1997.

Pfeil, W.; Rishi, V.; Anjum, F.; Ahmad, F. Role of non-compatible osmolytes in the stabilization of proteins during heat stress. **Biochemical Journal**, v. 329, p. 137-143, 1998.

Pollard A.; Wyn-Jones, R.G. Enzyme activities in concentrated solution of glycinebetaine and other solutes. **Planta**, v. 144, p. 291-298, 1979.

Qu, Y.; Bolen, C.L.; Bolen D.W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D.C., v. 95, n. 16, p. 9268-9273, 1998.

Record, M. T., Zhang, W., & Anderson, C. F. Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts. **Advances in Protein Chemistry**, 51, 281-353, 1998.

Rowe, A.W.; Eyster, E.; Kellner, A. Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion; a low glycerol-rapid freeze procedure. **Cryobiology** 5, 119-128, 1968.

Russell, N.J.; Fukunaga, N. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 75, p. 171-182, 1990.

Saunders, A.J.; Davis-Searles, P.R.; Allen, D.L.; Pielak, G.J.; Erie, D.A. Osmolyte induced changes in protein conformational equilibria. **Biopolymers**, New York, N.Y., v. 53, p. 293-307, 2000.

Saunders, D.; Aldrich, K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 26, p. 179-182, 2001.

Schellman, J.A. Fifty years of solvent denaturation. **Biophysical Chemistry**, v. 96, p. 91-101, 2002.

Scott, K.L.; Lecak, J.; Acker J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 19, n. 2, p. 127-142, 2005.

Singer S.J.; Nicholson G.L. The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

Spector, A.A.; Burns, C.P. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. **Cancer Research**, v. 47, n. 17, p. 4529-4537, 1987.

Srinivasan, K.; Kempaiah, R.K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 471-478, 2006.

Stege, G.J.; Wierenga, P.K.; Kampinga, H.H.; Konings, A.W. Hyperthermia, intracellular free calcium and calcium ionophores. **International Journal of Radiation Biology**, v. 64, n. 4, p. 459-468, 1993.

Storey, K.B.; Mosser, D.D.; Douglas, D.N.; Grundy, J.E.; Storey, J.M. Biochemistry below 0 degrees C: nature's frozen vertebrates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 3, p. 283-307, 1996.

Storry, J.R. Review: The function of blood group specific RBC membrane components. **Immunohematology**, v. 20, n. 4, p. 206-216, 2004.

Svetina, S.; Kuzman, D.; Waugh, R.E.; Zihlerl, P.; Zeks, B. The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. **Bioelectrochemistry**, v. 62, p. 107-113, 2004.

Tanford, C. Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 24, p. 1-95, 1970.

Taylor, L.S.; York, P.; Williams, A.C.; Edwards, H.G.M.; Mehta, C.; Jackson, G.S.; Badcoe, I.G.; Clarke, A.R. Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, The Netherlands, v. 1253, n. 1, p. 39-46, 1995.

Telen, M.J.; Kaufman, R.E. The mature erythrocyte. In: LEE, G.R. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. Baltimore: Williams & Wilkins, Cap.10, p.193-227, 1999.

Timasheff, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 22, 67-69, 1993.

Timasheff, S.N.; Arakawa, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: **Protein Structure: a practical approach**, Creighton, T.E. (Ed), Oxford: IRL Press, p. 331-345, 1989.

Usha, R.; Maheshwari, R.; Dhathathreyan, A.; Ramasami, T. Structural influence of mono and polyhydric alcohols on the stabilization of collagen, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 48, 101-105, 2006.

Vertessy, B.G.; Steck, T.L. Elasticity of the human red cell membrane skeleton. Effects of temperature and denaturants. **Biophysical Journal**, v. 55, p. 255-262, 1989.

Vieira, E.C.; Gazzubelli, G.; Mares-Guia, M. **Bioquímica Celular e Biologia Molecular**. 2^a. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

Wagner, C.T.; Martowicz, M.L.; Livesey S.A.; Connor J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 45, p. 153-166, 2002.

Walker, R.H. **Technical Manual**, 12th ed., American Association of Blood Banks, Bethesda, MD, 1996.

Wang, A.; Bolen, D.W. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. **Biochemistry**, Washington, D.C., v. 36, n. 30, p. 9101-9108, 1997.

Wang, A.; Robertson, A.D.; Bolen, D.W. Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A. **Biochemistry**, Washington, D.C., v. 34, n. 46, p. 15096-15104, 1995.

Weber, F.J.; Bont, J.A. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. **Bochimica et Biophysica Acta**, 1286, 225-245. 1996.

Yamada, S.; Itoh, E.; Murakami, Y.; Asano, M. Prevention of ethanol-induced erythrocyte transformations by fructose and natural honey in low alcohol tolerance mice. **Pathophysiology**, v. 6, p. 163-170, 1999.

Yancey, P.H. Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes. **In: Transport Processes, Iono- and Osmoregulation**, Gilles, R.; Gilles-Baillien, M., (Ed.) p. 424-436, Springer-Verlag, New York, 1985.

Yancey, P.H. Water stress, osmolytes and proteins. **American Zoologist**, Utica N.Y., v. 41, n. 4, p. 699-709, 2001.

Yancey, P.H.; Clark M.E.; Hand S.C.; Bowlus R.D.; Somero G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v.21, p. 1214-1222, 1982.

Yatvin, M.B.; Gipp, J.J.; Klessing, D.R.; Dennis, W.H. Hyperthermic sensitivity and growth stage in *Escherichia coli*. **Radiation Research**, v. 106, p. 78-88, 1986.

Yatvin, M.B.; Gipp, J.J.; Rusy, B.F.; Dennis, W.H. Correlation of bacterial hyperthermic survival with anaesthetic potency. **International Journal of Radiation Biology**, v. 42, p. 141-149, 1982.

Zavodnik, J. B.; Piletskaia, T.P.; Stepuro, H. Kinetics of ethanol-induced lysis of human erythrocytes. **Biofizika**, v. 39, p. 1033-1039, 1994.