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

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS

Estudante: Liandra Freitas Marquez Bernardes

Orientador: Prof. Dr. Nilson Penha-Silva

**UBERLÂNDIA, MG
2012**

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS

Estudante: Liandra Freitas Marquez Bernardes

Orientador: 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
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B522i Bernardes, Liandra Freitas Marquez, 1977-
2012 Influência da concentração de glicose na estabilidade de
membrana de eritrócitos humanos / Liandra Freitas Marquez
Bernardes. -- 2012.
44 f. : il.


Orientador: Nilson Penha-Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Eritrócitos - Teses. 3. Glicose -
Teses. 4. Membranas de eritrócitos - Teses. I. Penha-Silva,
Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

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

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS

Estudante: **Liandra Freitas Marquez Bernardes**
Orientador: **Nilson Penha-Silva**

OMISSÃO EXAMINADORA

Examinador (T): Professor Dr. Nilson Penha-Silva (presidente)	[UFU]
Examinador (T): Professora Dra. Maria Lúcia Pedrosa	[UFOP]
Examinador (T): Professor Dr. Kléber Luiz de Araújo e Souza	[UFRJ]
Examinador (T): Professora Dra. Ana Graci Brito Madurro	[UFU]
Examinador (T): Professora Dra. Luciana Karen Calábria	[UFU]

Data da defesa: 19/07/2012

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

Nilson Penha-Silva
(Orientador)

DEDICATÓRIA

A Deus, meu Senhor,
que sempre me mostrou o caminho a seguir e que foi meu alicerce nos momentos de tribulação,
me suportando com a Sua infinita graça e misericórdia.

Ao meu marido, Sérgio Robbs Bernardes,
meu companheiro e cúmplice nos momentos bons e nos ruins,
que sempre me apoiou e a quem eu dedico meu amor e gratidão.

Aos meus filhos, Gabriel Marquez Bernardes e Isabela Marquez Bernardes,
que souberam com incrível maturidade compreender a minha ausência em alguns momentos.

A eles meu eterno e incondicional amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Nilson Penha-Silva, que foi realmente um mestre, exercendo com excelência a arte da docência. Quem me ensinou muito além da ciência da bioquímica, sendo exemplo de ética e incrível sabedoria sem perder a humildade.

Aos meus colegas do Laboratório de Biofísicoquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, em especial Guilherme Santos Duarte Lemos, Lara Ferreira Paraíso e Letícia Ramos Arvelos.

APOIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS



SUMÁRIO

	Página
Abreviaturas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Apresentação	01
CAPÍTULO I [FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA]	
Importância das Membranas Biológicas	03
Composição e Estrutura de Membranas	03
Alterações na Composição e Estrutura de Membranas	06
Relação das Membranas Biológicas com Processos Degenerativos	08
Oxidação de Membranas	10
Deformabilidade de Membranas	11
Estabilidade de Membranas	12
Considerações finais	13
Referências	15
CAPÍTULO II [TRABALHO EXPERIMENTAL]	
Resumo	24
Abstract	25
Introdução	26
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	30
Referências	40

LISTA DE ABREVIATURAS

$A_{540\text{ nm}}$	Absorvância em comprimento de onda de 540 nm
A_{max}	Absorvância no platô de hemólise máxima
A_{min}	Absorvância no platô de hemólise mínima
ATP	Adenosina trifosfato
dX	Variação na concentração de NaCl que promove 100% de hemólise
NaCl	Cloreto de sódio
R	Estado relaxado ou expandido de eritrócitos
T	Estado tenso ou compacto de eritrócitos
X_{50}	Concentração de NaCl capaz de provocar 50% de hemólise

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Comparison of the osmotic stability curves of erythrocytes in different concentrations of glucose	35
Figura 2	Comparison of osmotic stability curves of erythrocytes in presence of 4.0 (A) and 6.0 (B) g/dl glucose	36
Figura 3	Dependence of absorbance at 540 nm of hemoglobin with NaCl (A) and glucose (B) concentrations	37
Figura 4	Influence of glucose concentration on the percentage of hemolysis in 0.9 g/dl NaCl (A) and in water (B) at 37 °C	38

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 1 Values (mean \pm sd) of half-transition of the hypotonic hemolysis (X_{50}) in absence and in presence of different concentrations of glucose.....	39

APRESENTAÇÃO

O **capítulo 1** desta tese apresenta alguns fundamentos teóricos sobre estrutura e composição das membranas biológicas e suas relações com estabilidade, função e degeneração.

O **capítulo 2**, que constitui a parte experimental da tese, apresenta a influência da concentração da glicose sobre a estabilidade de membranas de eritrócitos humanos, revelando que o aumento da osmolalidade do meio pelo aumento na concentração de glicose promove estabilização de eritrócitos. A possível origem desse efeito, que deve ter importância na patofisiologia do diabetes, é discutida à luz do que se conhece sobre a osmoestabilização de proteínas.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Importância das Membranas Biológicas

A membrana citoplasmática constitui uma condição essencial para a existência da célula, uma vez que ela delimita o espaço intracelular e limita a saída de substâncias ali produzidas, bem como a entrada de substâncias indesejáveis provenientes do meio extracelular. Esta propriedade é conhecida como permeabilidade seletiva e basicamente exerce uma seleção à entrada de solutos polares [NELSON e COX, 2011; BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

As organelas celulares também são delimitadas por membranas que possuem características comuns com a membrana do citoplasma, porém dotadas de especificidades de acordo com a natureza e função da organela [BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

As membranas não são meras barreiras físicas ao trânsito de substâncias do ambiente interno da célula para o externo e vice-versa, sua estrutura bidimensional composta por lipídeos, proteínas e alguns glicídeos ligados a estas moléculas, confere à célula um ambiente propício para a ocorrência de catálise, transporte, adesão celular, transdução de sinais e geração de energia [NELSON e COX, 2011; BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

Composição e Estrutura de Membranas

As membranas biológicas são estruturas bilaminares constituídas principalmente de lipídeos e proteínas, os quais podem conter grupamentos glicídicos em suas estruturas. A estrutura bilaminar tem o interior hidrofóbico e suas faces externas hidrofílicas [BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

A distribuição dos constituintes varia de acordo com a localização e a função da membrana. As células possuem mecanismos para controlar a síntese e o direcionamento de lipídeos e proteínas específicos para diferentes membranas [NELSON e COX, 2011].

Existem três classes de lipídeos constituintes de membranas em eucariontes: fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol livre. Os fosfolipídeos são os mais abundantes e podem ser derivados do glicerol (glicerofosfolipídeos ou fosfoglicerídeos) ou da esfingosina (esfingomielina) [BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

Os glicerofosfolipídeos são derivados do ácido fosfatídico e apresentam necessariamente uma plataforma (o glicerol) à qual se prende um ou mais ácidos graxos, um fosfato e um álcool unido a este último. As unidades alcoólicas comuns dos fosfoglicerídeos são o aminoácido serina, a etanolamina, a colina, o glicerol e o inositol, formando fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, difosfatidilglicerol e fosfatidilinositol, respectivamente [BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

No caso da esfingomielina, a plataforma é a esfingosina que se liga a um ácido graxo por uma ligação amida, e a um grupamento fosforilcolina por uma ligação éster fosfórica [BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

A distribuição de lipídeos na bicamada da membrana é assimétrica, estando os fosfolipídeos distribuídos da seguinte maneira: a fosfatidilcolina e esfingomielina são mais abundantes na face externa da membrana plasmática, que é topologicamente equivalente à face luminal de organelas internas. Em contraste, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina são localizadas preferencialmente na face citoplasmática. Porções minoritárias de fosfolipídeos como ácido fosfatídico e fosfatidilinositol também estão mais abundantes no lado citofacial da membrana [CORSETTO et al., 2011].

Os glicoesfingolipídeos também são derivados da esfingosina, assim como a esfingomielina, mas diferem-se dela por terem sua hidroxila ligada a um ou mais grupos glicídicos (oses) em vez da fosforilcolina. Os mais simples, os cerebrosídeos, contêm uma só ose, glicose ou galactose. Glicoesfingolipídeos mais complexos, como os gangliosídeos, contêm uma cadeia ramificada de até sete oses. Os glicoesfingolipídeos são distribuídos de maneira completamente assimétrica entre as duas bicamadas, com as oses sempre no lado extracelular da membrana [BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

A última classe de lipídeos de membranas, os esteróis, tem o colesterol como principal representante, o qual apresenta uma estrutura de quatro anéis hidrocarbonados ligados. Nas membranas as moléculas de colesterol estão dispostas paralelas às cadeias de ácidos graxos de fosfolipídeos de maneira que suas hidroxilas interagem com as cabeças dos fosfolipídeos próximos [BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2008].

As proteínas de membranas podem estar dispostas de três maneiras. Elas podem ser proteínas integrais, que estão inseridas na membrana e podem atravessar a bicamada lipídica, a cujo interior apolar se acham associadas por meio de ligações hidrofóbicas, de modo que somente podem ser removidas por solventes orgânicos, detergentes ou agentes desnaturantes. As proteínas de membrana também podem ser proteínas periféricas, as quais estão situadas, como o próprio nome diz, na periferia das membranas, ou seja, nas faces e não no interior. Elas se associam com as membranas através de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com domínios hidrofílicos de proteínas integrais e com grupos polares de lipídeos de membranas, podendo ser liberadas por tratamentos relativamente brandos. Por fim, as proteínas de membrana também podem ser anfitrópicas, quando se localizam nas faces externas ou internas da membrana ou mesmo no citosol; sua afinidade com as membranas resulta de interações não covalentes com outra proteína ou lipídeos de membrana, e, em alguns casos, pela associação covalente com um ou mais lipídeos [NELSON e COX, 2011].

O modelo do mosaico fluido propõe basicamente que as membranas plasmáticas constituem um mar de lipídeos no qual diferentes proteínas flutuam. Tanto essas proteínas quanto os lipídeos possuem um deslocamento lateral que resulta em constante movimentação e assimetria da membrana [NELSON e COX, 2011].

A difusão dos lipídeos na bicamada é realizada de duas formas: um movimento de ponta cabeça (*flip-flop*), ou seja, de uma lâmina da bicamada para a outra, que consiste em uma movimentação lenta; e um deslocamento lateral rápido. No primeiro caso existem enzimas que catalisam o processo e permitem um caminho energeticamente mais favorável e mais rápido [NELSON e COX, 2011].

A fluidez de biomembranas é determinada pelo seu conteúdo de colesterol e fosfolípídeos ricos em ácidos graxos insaturados [ALLEN et al., 2006]. Esta característica é modulada tanto por oscilações nestes componentes de membranas quanto pela temperatura [NELSON e COX, 2011].

Para melhor compreender a estrutura dinâmica das membranas falta ainda o entendimento das *balsas lipídicas*. Os glicosfingolípídeos (cerebrosídeos e gangliosídeos), que tipicamente contêm cadeias longas de ácidos graxos insaturados, formam agregados na lâmina externa da membrana plasmática, ladeados por glicerofosfolípídeos, que por sua vez contêm normalmente um grupo acil graxo insaturado e um grupo acil saturado menor [NELSON e COX, 2011]. Os grupos acil saturados longos de glicosfingolípídeos podem formar associações mais estáveis e compactas com o sistema de anéis longos do colesterol. Estas associações esfingolípídeos-colesterol são levemente mais espessas (menos fluidas) e mais ordenadas do que os fosfolípídeos vizinhos, e comportam-se como *balsas* de esfingolípídeos líquidos ordenados à deriva em um oceano de fosfolípídeos líquidos desordenados [MACDONALD e PIKE, 2005; BROWN e LONDON, 2000; FRIDRIKSSON et al., 1999; PIKE et al., 2002]. Estudos apontam que estas *balsas lipídicas* estão envolvidas em inúmeros de processos celulares, incluindo transporte e sinalização celular [MACDONALD e PIKE, 2005; HELMS e ZURZOLLO, 2004; SMART et al., 1999; PIKE, 2003; SIMONS e TOOMRE, 2000; SALTIEL e PESSIN, 2003].

Alterações na Composição e Estrutura de Membranas

A composição da membrana biológica determina sua estrutura e ambas determinam suas funções. Portanto, alterações na composição vão influenciar na estrutura e funções da membrana. Alterações nas características estruturais de membranas plasmáticas podem modificar a atividade de proteínas de membrana que atuam como canais de íons, transportadores, receptores, transdutores de sinais ou enzimas [CORSETTO et al., 2011; MENENDEZ et al., 2006; STUBBS e SMITH, 1984; GRIMBLE e TAPPIA, 1995; JOLLY et al., 1997; DE PABLO e ALVAREZ, 2000].

Muitos trabalhos têm relatado consequências das alterações de composição, principalmente no conteúdo de ácidos graxos de membranas [CORSETTO et al., 2011; FIELD e SCHLEY, 2004; DAS, 2002; CHIU, COI e WAN, 2001]. Corsetto e colegas [2011] relataram que a incorporação de ácidos graxos poliinsaturados n-3 às células mamárias tumorais induziram modificações na estrutura e função dessas membranas celulares, provavelmente pelo aumento do grau de insaturação. Os autores cogitaram que essas alterações na membrana plasmática devem modificar a arquitetura e também os processos de sinalização celular, provocando redução na proliferação celular e na indução de apoptose [CORSETTO et al., 2011].

Mudanças no conteúdo de ácidos graxos também podem influenciar a fragilidade osmótica de membranas de células vermelhas sanguíneas. Ácidos graxos livres e ácidos graxos de cadeia curta provavelmente interagem com estas membranas, alterando a fluidez e a resistência osmótica das mesmas [MINEO e HARA, 2005, 2007; YAJIMA, 1985; ZAVODNIK et al., 1997; UDDEN, 2002; ZAVODNIK et al., 1996; KOGAWA et al., 1998].

Outro ponto importante na modulação de lipídeos de membranas é a modificação de sua fluidez pela alteração no conteúdo de colesterol. O aumento do conteúdo de colesterol em membranas de eritrócitos de diabéticos causa rigidificação das mesmas, contribuindo para as complicações microvasculares apresentadas nesta doença [ALLEN et al., 2006; GARNIER et al., 1990]. O acúmulo de colesterol na membrana de tecidos extra-hepáticos em diabéticos pode resultar em menor número de receptores de insulina e consequente diminuição de sua ação [ALLEN et al., 2006]. Também em pacientes diabéticos, alterações lipídicas podem determinar consequências importantes, pois o *pool* de fosfatidatos está diminuído, podendo resultar em diminuição de fosfatidilinositol, importante fosfolípido de membrana envolvido nas rotas de sinalização celular, inclusive na transdução de sinal hormonal [ALLEN et al., 2006; KAMADA, MCMILLAN e OTSUJI, 1992].

A fluidez de membrana também pode ser alterada pela presença de ácidos graxos insaturados (mono- ou poliinsaturados), sendo que quanto maior o teor de insaturação, maior é a fluidez da membrana. Uma forma de medir o grau de fluidez de mem-

brana é a relação entre o conteúdo total de colesterol e fosfolípidos ou a relação entre os ácidos graxos saturados e os insaturados [ALLEN et al., 2006]. Berlin e colegas [1989] demonstraram uma relação direta entre fluidez de membranas de eritrócitos e ligação do receptor de insulina nessas membranas.

De igual modo, outras propriedades reológicas das membranas de eritrócitos podem ser alteradas por mudanças no conteúdo lipídico. Por exemplo, derivados do ácido benzóico alteram a forma, rigidez e tempo de relaxamento de membranas plasmáticas de eritrócitos [MINEO e HARA, 2007; CHEN et al., 2004]. A diminuição na deformabilidade de células vermelhas sanguíneas compromete a passagem dessas células através dos capilares e pode ser considerada parte da complicação patológica envolvida em processos vasculares que resultam em amputações em diabéticos [ALLEN et al., 2006].

Relação das Membranas Biológicas com Processos Degenerativos

As membranas biológicas são compostas de uma mistura de vários lipídeos com proteínas integrais ancoradas ou dissolvidas em uma rede bidimensional formando uma geometria hexagonal simples conhecida como esqueleto da membrana [GIRASOLE et al., 2010].

Durante o envelhecimento, as membranas também são expostas aos processos degenerativos. As células vermelhas sanguíneas, por exemplo, sofrem alterações de sua forma normal (denominada discócito) para uma forma mais esférica (denominada equinócito) e coberta de espículas [GIRASOLE et al., 2010].

Esta transformação envolve um desacoplamento do esqueleto da membrana da bicamada lipídica. Os fatores que determinam este processo degenerativo de eritrócitos são: a depleção de ATP, a exaustão de 2,3-bifosfoglicerato, a diminuição do pH interno e a liberação íons cálcio citossólicos [GIRASOLE et al., 2010].

À medida que se aproxima do tempo máximo da meia-vida dessas células, a área de suas superfícies e seu conteúdo de lipídeo decrescem aproximadamente 20%. Estas modificações podem ser iniciadas ou aceleradas por diversos fatores, como a-

gentes aniônicos ou catiônicos anfipáticos, concentrações salinas, pH do meio e teor de colesterol [GIRASOLE et al., 2010].

Todas essas transformações que ocorrem no processo de envelhecimento de eritrócitos são amplamente determinadas pelas propriedades do esqueleto da membrana [MINEO e HARA, 2007; ALLEN et al., 2006]. Uma forma de se estimar estas alterações é a utilização de microscopia de força atômica para caracterizar e comparar rugosidades de superfícies celulares de células vermelhas sanguíneas [GIRASOLE et al., 2010].

Contudo, o processo de envelhecimento das células vermelhas sanguíneas está relacionado ao ciclo de vida dessas células, o que é diferente do impacto da senescência sobre os eritrócitos. Tal impacto relaciona-se com os efeitos do envelhecimento na homeostase de complexos biológicos. Isto porque as degenerações que caracterizam o processo de envelhecimento biológico, inclusive a degeneração dos mecanismos homeostáticos, vão se manifestar também na composição, estrutura e funções dos eritrócitos [MASCARENHAS NETTO, 2009].

A idade exerce influência tanto na fragilidade osmótica de eritrócitos [BAUTISTA et al., 2003] quanto no padrão de assimetria da membrana, um vez que o envelhecimento leva a alterações na composição em fosfolipídeos [RIFKIND, ARAKI e HADLEY, 1983], afetando propriedades elétricas da membrana e o equilíbrio entre a célula e o meio [MUTUS et al., 2000]. Com a idade, o teor de ácidos graxos insaturados sofre diminuição [PRISCO et al., 1991; BECKMAN e AMES, 1998], enquanto o teor de ácidos graxos saturados aumenta [PRISCO et al., 1991].

Outra consequência do processo de senescência para as membranas biológicas é a formação de produtos finais de glicação avançada, os quais reagem inespecificamente com proteínas e lipídeos de membrana (reação de Maillard), alterando assim a estrutura e função de macromoléculas que desempenham papéis fundamentais em membranas [SHIN et al., 2008; PAMPLONA, BARJA e PORTERO-OTIN, 2002].

A peroxidação de lipídeos de membranas é também um fator que pode resultar em danos para as proteínas celulares (inclusive as membranares) e ao DNA. Estes da-

nos podem significar morte celular e, quando analisados de maneira sistêmica, podem estar envolvidos nos processos degenerativos que causam o envelhecimento [PAMPLONA, 2011; HULBERT et al., 2007].

Oxidação de Membranas

A maioria dos seres vivos requer um constante suprimento de oxigênio para manutenção de seus processos vitais e, como resultado, suas células produzem espécies reativas do oxigênio como subprodutos do metabolismo [GRIM et al., 2011].

As espécies reativas do oxigênio podem ser radicais livres (por conterem um elétron desemparelhado em sua camada de valência) ou precursores de radicais livres. Entre as espécies reativas do oxigênio estão o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o ácido hipocloroso, o óxido nítrico, o peroxinitrito, o oxigênio singlete, o radical hidroxila, o radical peroxila e os radicais orgânicos [SMITH, 2007].

As espécies reativas do oxigênio podem atacar, alterar e danificar macromoléculas de extrema importância para as células, como as proteínas e o DNA. As membranas biológicas também constituem um alvo para as reações em cadeia que formam radicais livres e peróxidos lipídicos [SMITH, 2007].

A susceptibilidade das membranas ao dano oxidativo é consequente de dois fatores importantes. O primeiro é que as espécies reativas do oxigênio são várias vezes mais solúveis em lipídeos que constituem a matriz da bicamada do que em solução aquosa [HULBERT et al., 2007; MOREAU et al., 2005]. O segundo fator que predispõe as membranas a este processo é a presença de múltiplas duplas ligações nas cadeias acílicas presentes na estrutura dos fosfolipídeos de membrana [HULBERT et al., 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999].

A oxidação de lipídeos de membrana por mecanismo radicalar é chamada de lipoperoxidação. Esse processo ocorre primeiramente por um iniciador (como um radical hidroxila produzido na reação de Fenton) que extrai um átomo de hidrogênio, preferencialmente de um átomo de carbono de uma dupla ligação, em um ácido graxo poliinsaturado do lipídeo de membrana. A reação em cadeia é propagada quando o

oxigênio é adicionado para formar peroxi-radicais lipídicos e peróxidos lipídicos [SMITH, 2007].

A peroxidação de lipídeos é um processo autopropagativo, no qual os lipídeos danificados podem iniciar a peroxidação de outros lipídeos e os subprodutos destas reações podem fazer ligações cruzadas com proteínas (reagem com grupos hidrofílicos nas mesmas), danificando-as e estendendo este dano também ao DNA [SMITH, 2007].

Nas reações de lipoperoxidação são formados produtos como hidroperóxidos e endoperóxidos, os quais podem sofrer fragmentação para produzirem produtos intermediários como alcanos, alquenos e aldeídos. O malondialdeído e a acroleína são exemplos deste produtos finais e que podem ser úteis indicadores do estresse oxidativo. Estes compostos carbonílicos podem migrar com relativa facilidade através das membranas hidrofóbicas ao meio citosólico hidrofílico [HULBERT et al., 2007].

Os produtos da lipoperoxidação podem reagir de forma não-enzimática, gerando uma variedade de aductos denominados de produtos finais de lipoxidação avançada. Eles podem também reagir com grupos amino exocíclicos da desoxiguanosina, desoxiadenosina e desoxicitosina, e formar vários produtos alquilados. [HULBERT et al., 2007].

O grupamento amino de aminofosfolipídeos pode também reagir com compostos carbonílicos e iniciar algumas das reações que ocorrem em proteínas, expandindo então os efeitos biológicos negativos da modificação não-enzimática. Neste contexto, podem ser afetados processos biológicos como distribuição assimétrica de aminofosfolipídeos em diferentes membranas, translocação intramembranar e difusão lateral nas membranas, propriedades físicas de membrana, biossíntese e *turnover* de fosfolipídeos de membrana, e atividade de proteínas ligantes de membranas que requerem aminofosfolipídeos para suas funções [HULBERT et al., 2007].

Assim, a peroxidação lipídica não deve se restringir a um cenário de lipídeos danificados, pois ela é uma fonte endógena significativa de danos a outras macromoléculas como proteínas e DNA [HULBERT et al., 2007].

Comportamento de Membranas

A deformabilidade é uma importante propriedade da membrana plasmática. Ela pode ser definida como a capacidade da membrana de se alongar, sem se romper, a um determinado nível máximo, quando uma força de cisalhamento constante é aplicada sobre ela [RIQUELME et al., 2005]. A deformabilidade pode ser estimada, em eritrócitos por meio da razão entre fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina [ALLEN et al., 2006; LABROUCHE et al., 1996]. A deformabilidade da membrana também sofre influência da composição do meio. Uma menor deformabilidade foi associada à incubação de eritrócitos em meio de elevada osmolaridade [SHIN et al., 2008; RIQUELME et al., 2005; QUAN et al., 2011].

A estabilidade pode ser definida como a capacidade da membrana em se manter íntegra diante de agentes ou condições desnaturantes, sendo fundamental para a preservação de suas funções [ARVELOS, 2007; CUNHA et al., 2007; GOUVÊA-E-SILVA, 2006]. A estabilidade está intimamente relacionada com a fluidez de membrana, sendo maior no ponto de fluidez crítica, onde a membrana pode congrega estabilidade com funcionalidade [BERNARDINO NETO, 2011], propriedade dependente da própria deformabilidade, anteriormente descrita.

A estabilidade de membrana pode ser afetada por vários fatores, que incluem agentes estabilizantes como, os osmólitos, e agentes desnaturantes, como os extremos de temperatura [CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2008] e de pH [DE FREITAS et al., 2008], e uma gama variada de solutos caotrópicos. Além disso, a estabilidade da membrana é também afetada pelo volume da célula, pelo envelhecimento [PENHA-SILVA et al., 2007], pela oxidação e por alterações na composição e estrutura da membrana [DE FREITAS et al., 2010]. Elevações na concentração de homocisteína no sangue estão associadas com alterações na composição da membrana em fosfolípidos e, conseqüentemente, em sua estabilidade [MASCARENHAS-NETTO, 2009].

O etanol é um bom exemplo de agente caotrópico, ou seja, que desorganiza a estrutura de um complexo biológico como a membrana. Quando incubado com amostras de sangue, o etanol é capaz de aumentar a taxa de hemólise [TYULINA et al., 2000]. O efeito desnaturante do etanol não é causado por sua interação com as membranas dos

eritrócitos [TYULINA et al., 2002], mas pela diminuição da força hidrofóbica, o que diminui a estabilidade da membrana. Ao mesmo tempo em que o etanol apresenta esse efeito desnaturante, ele também eleva a osmolaridade do meio, o que tem implicações estabilizadoras [ARVELOS, 2007; BERNARDINO NETO, 2006; DE FREITAS REIS, 2007; FINOTTI, 2006; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; PENHA-SILVA et al., 2008].

De fato, foram relatadas elevações na estabilidade osmótica quando eritrócitos humanos foram incubados em soluções de glicerol, sorbitol ou do próprio etanol. Esse efeito de estabilização osmótica deve ser decorrente do aumento da pressão osmótica exercida pelo osmólito, o que provoca a exclusão de água intracelular e, consequentemente, a contração celular, com aumento na estabilidade estrutural da membrana. Essa exclusão de água causaria uma alteração na forma e volume da célula, que passaria de um estado R (relaxado) para um estado T (tensionado) [CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2008].

Considerações finais

A glicose é um soluto que, dentro de uma perspectiva fisiológica, além de seu papel energético, também participa na determinação da osmolaridade do meio interno dos organismos vivos. Certamente, a quebra homeostática associada ao diabetes mellitus deve ter implicações patofisiológicas decorrentes da elevação da osmolaridade decorrente do quadro de hiperglicemia.

Riquelme et al. [2005] mostraram que a reconstituição do sangue com glóbulos vermelhos incubados durante duas horas em soluções de glicose (1, 2, 5 e 10 g/dl) foi associada com o aumento da viscosidade do sangue e diminuição da deformabilidade dos eritrócitos. Shin et al. [2008] também encontraram uma diminuição na deformabilidade e ocorrência de agregação dos eritrócitos após incubação dessas células por duas horas em soluções de glicose (0,7, 1, 2, 3 e 5 g/dl). Em ambas as situações, os autores postularam que a origem dessas modificações seria a ocorrência de glicação de componentes da membrana de eritrócitos.

O estudo descrito no capítulo II desta tese avaliou a influência da concentração de glicose (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 g/dl) sobre a estabilidade osmótica de eritrócitos, utilizando incubação durante apenas 30 minutos de amostras de sangue total, condição em que alterações fundamentadas na modificação das propriedades físicoquímicas do meio devem adquirir maior importância em relação aos processos de glicação.

Referências

ALLEN, H.G.; ALLEN, J.C.; BOYD, L.C.; ALSTON-MILLS, B.P.; FENNER, G.P. Determination of membrane lipid differences in insulin resistant diabetes mellitus type 2 in whites and blacks. **Nutrition**, v.22, p.1096–1102, 2006.

ARVELOS, C.C.C. **Efeitos do glicerol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos**. 2007. 40f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

BAUTISTA, M.L.; ALTAF, W.; LALL, R.; WAPNIR, R.A. Cord blood red cell osmotic fragility: a comparison between pre-term and full-term newborn infants. **Early Human Development**, v.72, n.1, p.37-46, 2003.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v.78, p.547-581, 1998.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

BERLIN, E.; BHATHENA, S.J.; JUDD, J.T.; NAIR, P.P.; JONES, D.Y.; TAYLOR, P.R. Dietary fat and hormonal effects on erythrocyte membrane fluidity and lipid composition in adult women. **Metabolism**, v.38, p.790–6, 1989.

BERNARDINO NETO, M. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

BERNARDINO NETO, M. **Análises de correlações entre estabilidade de membrana de eritrócitos, níveis séricos de lipídeos e variáveis hematimétricas**. 2011. 100f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

BROWN, D.A.; LONDON, E. Structure and function of sphingolipid-and cholesterol-rich membrane rafts. **Journal of Biology and Chemistry**, p.17221–17224, 2000.

CHEN, Z.Y.; REX, S.; TSENG, C.C. Kruppel-like factor 4 is transactivated by butyrate in colon cancer cells. **Journal of Nutrition**, v.134, p.792-798, 2004.

CHIU, L.C.M.; OOI, V.E.C.; WAN, J.M.F. Eicosapentaenoic acid modulates cyclin expression and arrests cell cycle progression in human leukemic K-562 cells. **International Journal of Oncology**, v.19, p.845-849, 2001.

CORSETTO, P. A.; MONTORFANO, G.; ZAVA, S.; JOVENITTI, I. E.; CREMONA, A.; BERRA, B.; RIZZO, A. M. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. **Lipids in Health and Disease**, v.73, n.10, p.1-16, 2011.

CUNHA C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.39, p.341-347, 2007.

DAS, U.N. A radical approach to cancer. **Medical Science Monitor**, v.8, p.RA79-92, 2002.

DE FREITAS, M.V.; DE OLIVEIRA, M.R.; DOS SANTOS, D.F.; MASCARENHAS-NETTO R.C.; FENELON, S.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. **The Journal of Membrane Biology**, v.233, p.127-134, 2010.

DE FREITAS, M.V.; NETTO, RDE C.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.219-224, 2008.

DE FREITAS REIS, F.G. **Influência de glicerol e sorbitol sobre a dependência térmica da estabilização e desestabilização in vitro de eritrócitos humanos**. 2007. 74f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

DE PABLO, M.A.; ALVAREZ, D.C. Modulatory effects dietary lipids on immune system functions. **Immunology Cell Biology**, v.78, p.31-39, 2000.

FIELD, C.J.; SCHLEY, P.D. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.1190S-1198S, 2004.

FINOTTI, C.J. **Dependência térmica da osmoestabilização de eritrócitos por glicerol**. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

FRIDRIKSSON, E.K.; SHIPKOVA, P.A.; SHEETS, E.D.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B.; MCLAFFERTY, F.W. Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. **Biochemistry**, p.8056–8063, 1999.

GARNIER, M.; ATTALI, J.R.; VALENSI, P.; DELATOUR-HANSS, E.; GAUDEY, F.; KOUTSOURIS, D. Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. **Metabolism**, v.30, p.794 –798, 1990.

GIRASOLE, M.; POMPEO, G.; CRICENTI, A.; LONGO, G.; BOUMIS, G.; BELLELLI, A.; AMICONI, S. The how, when and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.6, p.760-768, 2010.

GOUVÊA-E-SILVA, L.F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

GRIM, J.M.; HYNDMAN, K.A.; KRISKA, T.; GIROTTI, A.W.; CROCKETT, E.L. Relationship between oxidizable fatty acid content and level of antioxidant glutathione peroxidases in marine fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.214, 3751-3759, 2011.

GRIMBLE, R.F.; TAPPIA, P.S. Modulatory influence of unsaturated fatty acids on the biology of tumour necrosis factor- α . **Biochemical Society Transactions**, v.23, p.282-287, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd. ed. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, 1999.

HELMS, J.B.; ZURZOLO C. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. **Traffic**, p.247–254, 2004.

HULBERT, A.J.; PAMPLONA, R.; BUFFENSTEIN, R.; BUTTEMER, W.A. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. **Physiological Reviews**, v.87, p.1175–1213, 2007.

JOLLY, C.A.; JIANG, Y.H.; CHAPKIN, R.S.; MCMURRAY, D.N. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. **Journal of Nutrition**, v.127, p.37-43, 1997.

KAMADA, T.; MCMILLAN, D.E.; OTSUJI, S. Changes in polyphosphoinositides and phosphatidic acid of erythrocyte membranes in diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.16, p.85–90, 1992.

KOGAWA, H.; YABUSHITA, N.; NAKAJIMA, T.; KAGEYAMA, K. Studies on in vitro effect of free fatty acids on water content and osmotic fragility of rabbit (*Lepus cuniculus*) erythrocytes. **Life Science**, v.62, p.728–823, 1998.

LABROUCHE, S.; FREYBURGER, G.; GIN, H.; BOISSEAU, M.R.; CASSAGNE, C. Changes in phospholipid composition of blood cell membranes (erythrocyte, platelet, and polymorphonuclear) in different types of diabetes - clinical and biological correlations. **Metabolism**, v.45, p.57–71, 1996.

MACDONALD, J. L.; PIKE, L. J. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. **Journal of Lipid Research-Methods**, v.46, p.1061-1067, 2005.

MASCARENHAS-NETTO, R. C. **Estabilidade de membrana de eritrócitos em portadores de depressão**. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

MINEO, H.; HARA H. Chemical specificity in short-chain fatty acids and their analogues in increasing osmotic fragility in rat erythrocytes in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1768, p.1448-1453, 2007.

MINEO, H.; HARA H. Structure-dependent and receptor-independent increase in osmotic fragility of rat erythrocytes by short-chain fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1713, p.113–117, 2005.

MOREAU, R.; NGUYEN, B.T.; DONEANU, C.E.; HAGEN, T.M. Reversal by aminoguanidine of the age-related increase in glycoxidation and lipoxidation in the cardiovascular system of Fischer 344 rats. **Biochemical Pharmacology**, v.69, p.29–40, 2005.

MUTUS, B.; RABINI, R.A.; FRANCESCHI, C.; PAOLISSO, G.; RIZZO, M.R.; RANGO, E.; RAPELLI, A.; BRACONI, M.; MAZZANTI, L. Cellular Resistance to Homocysteine: a key for longevity? **Atherosclerosis**, v.152, p.527-528, 2000.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 5ª ed., Porto Alegre: Sarvier / Artmed, 2011.

PAMPLONA, R. Mitochondrial DNA Damage and Animal Longevity: Insights from Comparative Studies. **Journal of Ageing Research**, v.2011, p.1-9, 2011.

PAMPLONA, R.; BARJA, G.; PORTERO-OTÍN, M. Membrane Fatty Acid Unsaturation, Protection Against Oxidative Stress, and Maximum Life Span. **Annals of New York Academy of Science**, v.959, p.475-490, 2002.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOUVÊA-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNARDINO-NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v.73, p.23-29, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; DE FREITAS REIS, F.G.; HUSS, J.C.C.; DE SOUZA, T.M.T.; DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.128, p.444-449, 2007.

PIKE, L.J. Lipid rafts: bringing order to chaos. **Journal of Lipid Research**, p.655–667, 2003.

PIKE, L.J.; HAN, X.; CHUNG, K-N.; GROSS R. Lipid rafts are enriched in plasmalogens and arachidonate-containing phospholipids and the expression of caveolin does not alter the lipid composition of these domains. **Biochemistry**, p.2075–2088, 2002.

PRISCO, D.; ROGASI, P.G.; PANICCIA, R.; ABBATE, R.; GENSINI, G. F. Age-related changes in red blood cell lipids. **Angiology**, v.42, p.316-322, 1991.

QUAN, G.B.; HAN, Y.; LIU M.X.; FRANG, L.; DU, W.; REN, S.P.; WANG, J.X.; WANG, Y. Addition of oligosaccharide decreases the freezing lesions on human red blood cell membrane in the presence of dextran and glucose. **Cryobiology**, v.62, p.135-144, 2011.

RIFKIND, J.M.; ARAKI, K.; HADLEY, E.C. The relationship between the osmotic fragility of human erythrocytes and cell age. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.222, n.2, p.582-589, 1983.

RIQUELME, B.; FORESTO, P.; D'ARRIGO, M.; VALVERDE, J.; RASIA, R. A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.62, p.131-141, 2005.

SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. **Traffic**, p.711–716, 2003.

SHIN, S.; KU, Y.H.; SUH, J.S.; SINGH, M. Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.38, p.153-161, 2008.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, p.31–41, 2000.

SMITH, Collen. **Bioquímica Médica Básica de Marks**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.779, p.89-137, 1984.

TYULINA, O.V.; HUENTELMAN, M.J.; PROKOPIEVA, V.D.; BOLDYREV, A.A.; JOHNSON, P. Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis? **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1535, p.69-77, 2000.

TYULINA, O.V.; PROKOPIEVA, V.D.; DODD, R.D.; HAWKINS, J.R.; CLAY, S.W.; WILSON, D.O.; BOLDYREV, A.A.; JOHNSON, P. In vitro effects of ethanol, acetaldehyde and fatty acid ethyl esters on human erythrocytes. **Alcohol and Alcoholism: International Journal of the Medical Council on Alcoholism**, v.37, n.2, p.179-186, 2002.

UDDEN, M.M. In vitro sub-hemolytic effects of butoxyacetic acid on human and rat erythrocytes. **Toxicological Science**, v.69, p.258–264, 2002.

YAJIMA, T. Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. **The Journal of Physiological Science**, v.368, p.667–668, 1985.

ZAVODNIK, I.B.; LAPSHINA, E.A.; PALECZ, D.; BRYSEWSKA, M. The effects of palmitate on human erythrocyte membrane potential and osmotic stability. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.56, p.401–407, 1996.

ZAVODNIK, I.B.; ZABOROWSKI, A.; NIEKURZAK, A.; BRYSEWSKA, M. Effect of free fatty acids on erythrocyte morphology and membrane fluidity. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.42 p.123–133, 1997.

CAPÍTULO II

TRABALHO EXPERIMENTAL

Este capítulo foi redigido de acordo com os padrões da revista *Cell Biochemistry and Biophysics*, onde foi publicado

Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes

Guilherme Santos Duarte Lemos • Liandra Freitas Márquez-Bernardes • Letícia Ramos Arvelos • Lara Ferreira Paraíso • Nilson Penha-Silva

G. S. D. Lemos • L. F. Márquez-Bernardes • L. R. Arvelos • L. F. Paraíso • N. Penha-Silva (✉)

N. Penha-Silva (✉) e-mail: nspenha@ufu.br

Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil

Cell Biochem Biophys (2011) 61:531–537. DOI 10.1007/s12013-011-9235-z.

KeyWords Plus: Red-Blood-Cells; Naturally-Occurring Osmolytes; Protein Stabilization; Thermal-Dependence; Surface-Area; Glycerol; Water; Denaturation; Mechanism; Hydration.

Publisher: Humana Press Inc, 999 Riverview Drive Suite 208, Totowa, NJ 07512 USA

Web of Science Category: Biochemistry & Molecular Biology; Biophysics; Cell Biology

Subject Area: Biochemistry & Molecular Biology; Biophysics; Cell Biology

IDS Number: 849ZE

ISSN: 1085-9195

PMID: 21735128 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Resumo

A ação de glicose como um osmólito em relação às células do sangue não é bem caracterizada na literatura. Este trabalho teve como objetivo estudar a influência da concentração de glicose sobre a estabilidade das células vermelhas do sangue. A estabilidade dos eritrócitos foi avaliada pelo ponto de meia-transição obtido a partir das curvas de lise induzida pela glicose, na ausência de sal ou por aumento na hipotonicidade do médio na ausência e na presença de diferentes concentrações de glicose. Na presença de 0,9 g/dl de NaCl não houve hemólise com concentração de glicose de 0-10 g/dl. Na ausência de NaCl, a dependência de hemólise com a 0-10 g de glicose/dl foi descrita por uma sigmóide decrescente, com células totalmente lisadas e células totalmente protegidas sendo encontradas na presença de 0-2 e 4-10 g de glicose/dl, respectivamente. A possível origem de tal efeito de estabilização é discutida com base no que se conhece sobre a osmoestabilização de complexos biológicos e a respeito da influência da glicose sobre as propriedades reológicas de eritrócitos.

Palavras-chave: glicose; estabilidade de membrana; eritrócitos; osmólitos; lise hipotônica

Abstract

The action of glucose as an osmolyte in relation to blood cells is not well characterized in the literature. This work aimed to study the influence of glucose concentration on the stability of red blood cells. The stability of erythrocytes was evaluated by the half-transition point obtained from the curves of lysis induced by glucose in absence of salt or by increase in medium hypotonicity in absence and presence of different concentrations of glucose. In presence of 0.9 g/dl NaCl, there was no hemolysis with increasing concentration of glucose from 0 to 10 g/dl. In absence of NaCl, the dependence of hemolysis with the 0-10 g/dl glucose was described by a decreasing sigmoid, with fully lysed and fully protected cells being encountered in presence of 0-2 and 4-10 g/dl glucose, respectively. The possible origin of such stabilization effect is discussed with base of what is known about osmostabilization of biological complexes and about the influence of glucose on the rheological properties of erythrocytes.

Keywords: Glucose, membrane stability, erythrocytes, osmolytes, hypotonic lysis

Introduction

Stability is an essential property for preservation of the functions of membranes and other biological complexes. It is defined as the capacity of the biological complex in keeping its structure against chaotropic conditions.

Among the various homeostatic mechanisms that nature uses to preserve the stability of biological complexes is the control of the osmolarity of the medium by the action of solutes collectively referred to as osmolytes [1-8].

The action of osmolytes is opposed by the action of other solutes called chaotropes, such as ethanol and urea.

Many studies have examined the origin of stabilization of proteins by osmolytes [9-19]. However, most studies investigating the action of osmolytes on membranes have been predominantly biotechnological purposes [20-23]. But to characterize the mechanism of membrane stabilization by osmolytes is an important task.

The erythrocyte has become a widely used model to study the behavior of membrane due to its wide availability and ease of isolation. This experimental model have been used to study the influence of solutes such as ethanol, glycerol and sorbitol [7-8], natural products [24], detergents [25-27], and degenerative processes [28-30] on the stability of erythrocyte membrane.

Glucose is an osmolyte whose elevation in blood exposes blood cells to changes in their properties. In this work, we studied the in vitro influence of different glucose concentrations on the stability of human erythrocytes. Since a stabilizing effect was observed, the possible origin of this effect was examined in the light of what is known about the effects of osmolytes on the stability of erythrocytes [7-8] and about the influence of glucose on the rheological properties of these cells [31-32].

Materials and Methods

The study was previously approved by the institutional ethics committee on human research.

Blood sample collection

Blood samples (5 ml) were collected from female volunteers (20-35 y), after nocturnal fasting (8-12 h), using vacuum tubes containing 1 g/dl K₄EDTA as an anticoagulant. The volunteers were randomly recruited among healthy, non-smokers, no alcohol, drugs and medicine users.

Reagents and equipments

NaCl and D(+)-glucose were ACS grade (ISOFAR, Duque de Caxias, RJ, Brazil). Volume measurements were carried out with automatic pipettes (Labsystems, Helsinki, Finland). Measures of mass were done in digital balance (model HR-120, AND, Japan). Temperature controlled experiments were done in water bath (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil). Absorbance was measured with a UV-VIS spectrophotometer (model UV-1650P, Shimadzu, Kyoto, Japan). The centrifugations were performed in a centrifuge model Hitachi Koki CF15RX II (Hitachinaka, Japan).

The hemoglobin used in this study was obtained from blood samples of volunteers. The blood samples (4 ml) were centrifuged at 1600 x *g* for 10 min. After removal of the supernatant, the precipitate erythrocytes were washed three times with a solution of NaCl 0.154 M. Hemoglobin was then obtained by lysis of erythrocytes (1 ml) in deionized water (2 ml) (20 min) and again centrifuged under the same conditions in order to separate it from the cellular debris.

Determination of erythrocyte stability against hypotonic stress

Eight sets of assay tubes (Eppendorf™) containing 2 ml of 0.1-1.0 g/dl NaCl solutions with glucose at 0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 2.0, 4.0 and 6.0 g/dl in each set were pre-incubated at 37 °C for 10 min. After addition of 20 µl of blood aliquots to the tubes, they were capped, gently mixed, and incubated at 37 °C for 30 min, before being cen-

trifuged at 1500 x *g* for 10 min. The erythrocytes lysis was followed by measuring absorbance of the supernatants at 540 nm (A_{540}) [7-8].

Determination of the erythrocyte stability against glucose

A set of assay tubes containing 2 ml of 0 to 10 g/dl glucose solutions were pre-incubated at 37 °C for 10 min. After addition of 20 μ l of blood aliquots, the tubes were capped, gently mixed and incubated at 37 °C for 30 min. After incubation, the tubes were centrifuged at 1500 x *g* for 10 min and their supernatants were analyzed by spectrophotometry at 540 nm (A_{540}) [7-8].

Influence of NaCl concentration on A_{540} nm of hemoglobin

A set of assay tubes containing 1.4 ml of 0 to 1.0 g/dl NaCl solutions was pre-incubated at 37 °C for 10 min. After addition of 10 μ l of hemoglobin solution to the tubes, they were capped, gently mixed and incubated at 37 °C during 30 min. After incubation, the tubes were centrifuged at 1500 x *g* for 10 min. The supernatants were used for determination of their values of A_{540} .

Determination of the hemoglobin stability against glucose

A set of assay tubes containing 1.4 ml of 0 to 10 g/dl glucose solutions was pre-incubated at 37 °C for 10 min. After addition of 10 μ l of hemoglobin solution to the tubes, they were capped, gently mixed and incubated at 37 °C for 30 min. After incubation, the samples were centrifuged at 1500 x *g* by 10 min and their supernatants were used for determination of their values of A_{540} [7-8].

Determination of the transition curves of hemolysis and denaturation of hemoglobin

The values of A_{540} were plotted against the concentration of NaCl and the points were fitted to a sigmoid derived from the Boltzmann equation,

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(X - X_{50})/dX}} + A_2 \quad (1),$$

where A_{\max} and A_{\min} represent the maximal and minimal plateaus of A_{540} of the sigmoid, respectively, X is the concentration of solute (NaCl or glucose) or the osmolality of the solution, X_{50} is the concentration of solute (NaCl or glucose) or osmolality of the solution that cause 50% of hemolysis or denaturation of hemoglobin, and dX is the amplitude of X variation in the sigmoidal transition between A_{\max} and A_{\min} [7-8].

The values of A_{540} were converted into percentage of hemolysis or hemoglobin denaturation according to the following equation:

$$\% \text{ Hemolysis} = \frac{A_{540}}{A_{\max}} \times 100\% \quad (2).$$

Results and Discussion

Hypotonic lysis of erythrocytes was studied under different glucose concentrations (0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.2 and 2 g/dl). The half-transition points obtained from the curves of lysis (X_{50}) suffered only slight changes with the increase in sugar concentration (Table 1). The differences between the values of X_{50} , expressed in g/dl NaCl, were significant only between media with larger variations in the concentration of sugar, such as between 0 and 1.2 or 0 and 2.0 g/dl of glucose. As sugar decreased the value of X_{50} , in g/dl NaCl, this means that the erythrocyte lysis started to occur in conditions of higher hypotonicity, so that there was stabilization of the cells due to the presence of glucose in solution.

As the presence of glucose in the solution increases the osmolality of the medium, this could be the mechanism by which stabilization occurs. That is why the curves of erythrocyte lysis in the presence of different concentrations of glucose were shown as a function of osmolality of the solution (Fig. 1). The increase in glucose concentration within the range studied increases the range of osmolality associated with hemolysis. That must mean that the stabilizing effect determined by glucose (Table 1) is associated with increased osmolality.

The study of hypotonic lysis at higher concentrations of glucose (4 and 6 g/dl) showed no lysis in both glucose concentrations (Fig. 2). This behavior would be attributed to modifications in the spectral properties of hemoglobin by changes in NaCl and glucose concentration. In fact, an absorbance decrease at 540 nm was observed with the increase both in NaCl and glucose concentration (Fig. 3). That decrease in A_{540} was more intense with the increase in glucose than in NaCl concentration. But those discrete changes in the spectral properties of hemoglobin cannot be responsible for the absence of changes in the values of A_{540} associated to the incubation of human erythrocytes in solutions with 4 and 6 g/dl glucose (Fig. 2).

The behavior of erythrocytes shown in Fig. 2 shall be related to a more substantial stabilization promoted by glucose concentrations above 4 g/dl. In fact, when human erythrocytes were incubated with 0-10 g/dl glucose in the presence of 0.9 g/dl NaCl, there was no hemolysis in the whole range of glucose concentration (Fig. 4A).

However, when this incubation was done in the absence of that salt, the dependence of percentage of hemolysis with the glucose concentration was characterized by a decreasing sigmoid (Fig. 4B). At 0-2 g/dl glucose concentrations, there was no protection of cells against lysis, but above approximately 4 g/dl erythrocytes were fully protected even in the absence of NaCl. The half-transition point of the sigmoid was 2.87 ± 0.023 g/dl glucose or 0.1637 ± 0.0014 osmol/kg H₂O. This means that above approximately 2.87 g/dl glucose or 0.1637 ± 0.0014 osmol/kg H₂O, half of the erythrocytes were protected against lysis.

These results show that increasing concentrations of glucose can protect erythrocytes against lysis, with full protection happening around 4 g/dl.

The half-transition of lysis (X_{50}) promoted by a decrease in glucose concentration (in a salt-free solution) occurred in an osmolality (0.1637 ± 0.0014 osmol/kg H₂O) (Fig 4B) close to that observed for the half-transition of lysis determined by hypotonicity (in a glucose-free solution) ($X_{50} = 0.1642 \pm 0.00042$ osmol/kg H₂O) (Fig 1A). This means that glucose has a stabilizing effect based on osmolality or osmolarity of the medium.

This increase in erythrocyte stability may be explained by several different mechanisms that will surely include the osmostabilization effect of glucose on membrane proteins.

It is very well known that the osmolytes increase the free energy barrier for protein denaturation [9-11,14-15,33]. The more acceptable explanation for this fact is based in the preferential interaction of water with proteins in relation to the osmolyte [18]. The incorporation of an osmolyte (X) in a water solution of protein (P) changes the equilibrium $P(H_2O)_n + X = PX + nH_2O$ and the competition between water and osmolyte for the protein. This competition is won by water, because the protein prefer linking water molecules than the osmolyte, which is excluded from the protein surface by an effect called solvophobic [9,10] or osmophobic [34]. This effect can be explained by the greater affinity for water than for the mixture water-osmolyte [9,10] of apolar groups and peptide backbone of the protein [15]. Anyway, the competition between osmolyte and water for the protein increases the free energy of hydration for both

protein states, native and denatured. Since the apolar groups and the peptide skeleton are more exposed to the solvent in denatured than native state, there is more destabilization of the denatured state in relation to the native one [33].

The osmophobic stabilization of proteins is probably associated with many another factors, such as spatial exclusion of the osmolyte or changes in the dielectric constant and viscosity of the solution [6,16,17,35-37].

But surely the main stabilizing effect of glucose on erythrocytes must be related to an action on the cell membrane. An increase in the osmotic stability of erythrocytes was previously associated to increase in the osmolarity of the medium by incorporation of solutes considered as stabilizing agents, such as glycerol and sorbitol, and even a chaotropic solute, such as ethanol [7,8]. Since such stabilization effect occurs with volume contraction that can be reverted after dilution of the solute excess [21,38,39,40], this fact was used in the proposition of an equilibrium model between two morphological states of erythrocytes [7,8]. On one hand, in medium with lower osmolarity, there would be cells with expanded volume, which would constitute the morphological state R (relaxed), similar to the R state of hemoglobin. On the other hand, in medium with high osmolarity, there would be contracted volume cells, which would constitute the morphological state T (tense), like the T state of hemoglobin. A RT transition would occur in association with the exclusion of water from the cell and its consequent contraction [7,8].

Other authors also studied the effects of glucose on human erythrocyte membranes [31,32]. Riquelme et al. [31] showed that the reconstitution of the blood with red cells incubated for two hours in solutions of glucose (1, 2, 5 and 10 g/dl) was associated with decreased blood viscosity and deformability of erythrocytes. Shin et al. [32] also found a decrease in deformability and the occurrence of aggregation of erythrocytes after incubation of these cells for two hours in glucose solutions (0.7, 1, 2, 3, and 5 g/dl). In both situations, the authors postulated that the origin of these changes could be the occurrence of glycation of erythrocyte membrane components.

In our study, we evaluated the stability of erythrocytes due to the hypotonicity of the medium and the concentration of glucose (0, 1, 2, 3, 4; 5, 6, 7, 8, 9, and 10 g/dl),

using incubation for only 30 minutes of whole blood samples. We believe that the results here obtained in the stability analysis of erythrocytes not disagree with those reported by Riquelme et al. [31] and Shin et al. [32], quite the contrary. In natural conditions of blood osmolarity, in which predominates the relaxed state [R], which has greater volume, will certainly be greater the deformability of the red blood cells and also the blood viscosity. On the other hand, contracted erythrocytes (T) due to hyperosmolarity of the medium should have a lower deformability and should give to blood a lower viscosity. In fact, lower deformability was associated with decrease in erythrocyte size [41].

This model agrees with some of the ideas of the so-called theory of preferential hydration of Timasheff [14,18,19]. As the physical and chemical laws governing the behavior of macromolecules in solution are also present in the behavior of cells in the same type of solution, it is quite possible that the mechanistic rationality of Timasheff is also valid for the distribution of forms of blood cells. The presence of osmolyte increases the free energy of hydration of both states (R and T) of the biological complex, but the increase is greater for the more bulky structure, so that the structure of lower volume becomes more stable compared to the more bulky structure. This mechanism of action, originally used to explain the stabilization of a protein by an osmolyte, also would explain the stabilization of a blood cell. As the rise in glucose concentration means an increase in osmolarity of the medium, the increase in the stability of erythrocytes associated with an increase in glucose concentration would be due to the increase in osmolarity of the solution.

This increase in stability does not necessarily mean an increase in the functionality of this membrane. Both excess and lack of stability can impair the function of a biological complex, including biological membranes. The increased stability of red cells that have undergone contraction by elevating the osmolarity of the medium does not mean advantage for the rheological properties of blood and gas exchange. In the same way that occurs in proteins, greater stability does not necessarily mean better functionality [42], so that these contracted cells, although more stable, should not have the same functionality of expanded cells.

Within a physiological context, it is possible that discrete changes in cell stability as a function of medium composition are related to various degenerative processes associated with aging or hereditary defects. In fact, aging was associated to increase in stability [28] and decrease in the size of erythrocytes [43,44]. Although the glucose concentrations used here are far greater than those present in the blood even of diabetic patients, the maintenance of elevated steady levels of glucose in blood might mean excessive increase in the stability and damage to functionality of blood cells, with important clinical implications. Even slight changes in the function of the erythrocyte membrane can affect mechanisms such as viscoelastic changes necessary for the passage of the cells in small capillaries and gas exchange. That would be one more reason to ensure a good blood glucose control in treatment of diabetic patients.

Within a biotechnological context, our results suggest the possibility of using glucose as a means of preserving red blood cells in blood banks. Osmostabilization strategies for cryopreservation of erythrocytes and other cells for long periods have frequently used glycerol, sorbitol, trehalose and dextran [20-23]. The use of glucose as an osmostabilizing agent will require a thorough evaluation of the reversibility of the stabilization effect observed here and of the conditions that could minimize the occurrence of glycation of erythrocyte membrane components.

In summary, the origin of the stabilizing effect of glucose would be explained by cell compaction due increase in the osmotic pressure [7,8], preventing the entry of water into the erythrocyte and its lysis by increased volume, and also by the preferential hydration theory of Timasheff [18]. But whatever are the mechanisms involved, high glucose concentrations can protect human erythrocytes against hypotonic lysis, which does not mean an increase in the cell functionality.

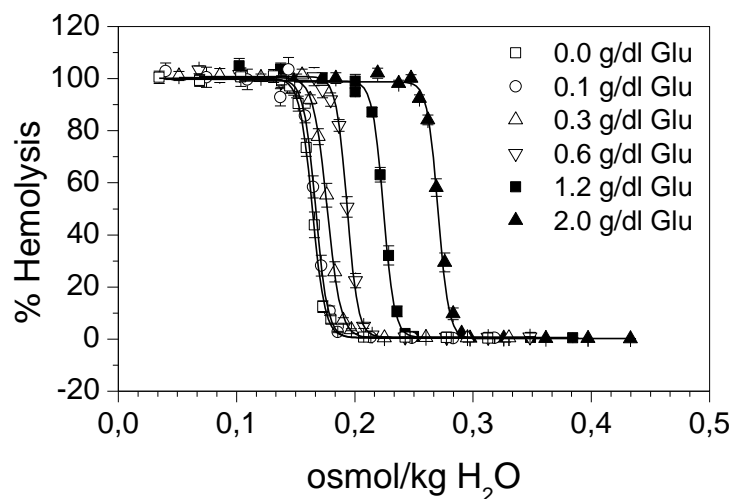


Fig. 2 Comparison of the osmotic stability curves of erythrocytes in different concentrations of glucose. Condition: 37 °C. The percentage of hemolysis showed significant sigmoidal dependences with the osmolality of the solution at 0 ($N=179$, $R^2= 0.9658$, $X_{50}=0.1642\pm0.0004$ osmol/kg H_2O), 0.1 ($N=171$, $R^2= 0.9484$, $X_{50}=0.1667\pm0.0005$ osmol/kg H_2O), 0.3 ($N=179$, $R^2=0.9717$, $X_{50}=0.1770\pm0.0004$ osmol/kg H_2O), 0.6 ($N=174$, $R^2=0.9742$, $X_{50}=0.1938\pm0.0004$ osmol/kg H_2O), 1.2 ($N=170$, $R^2= 0.9782$, $X_{50}=0.2242\pm0.0004$ osmol/kg H_2O) and 2.0 ($N=187$, $R^2= 0.9827$, $X_{50}=0.2709\pm0.0003$ osmol/kg H_2O) g/dl glucose.

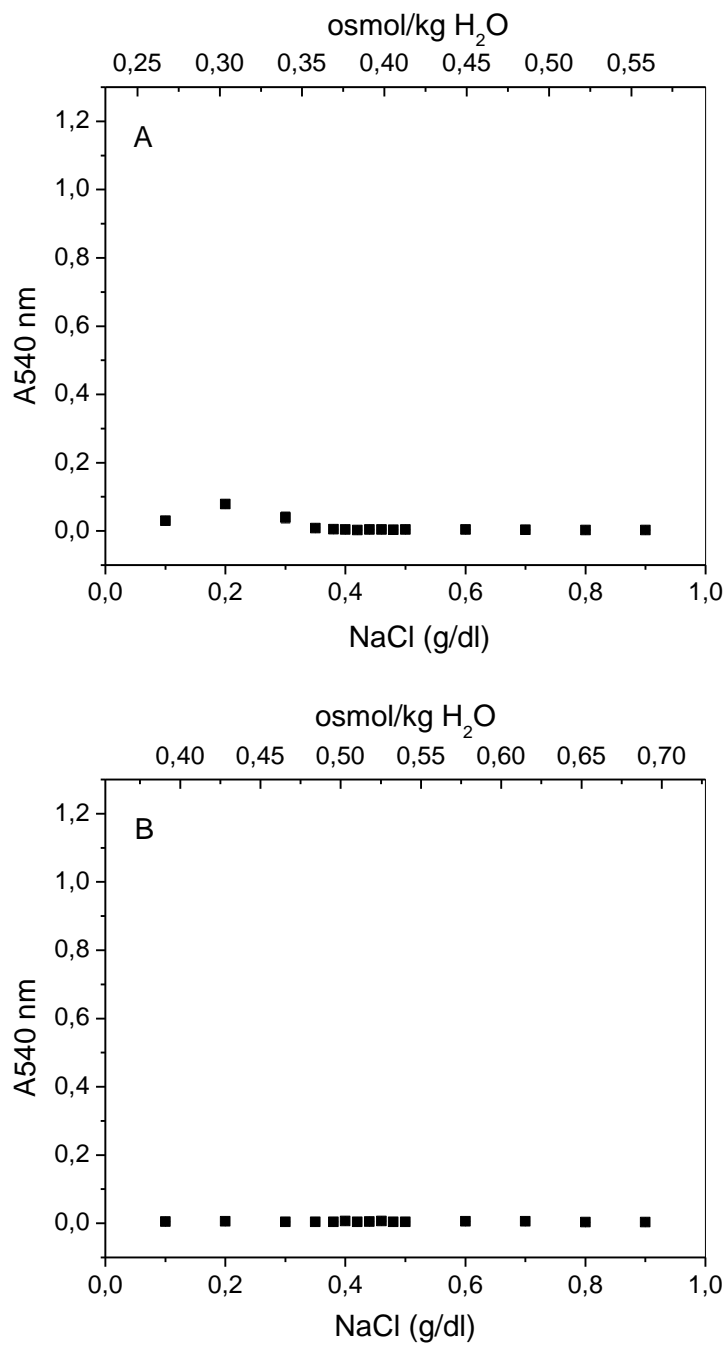


Fig. 2 Comparison of osmotic stability curves of erythrocytes in presence of 4.0 (a) and 6.0 (b) g/dl glucose. Condition: 37 °C.

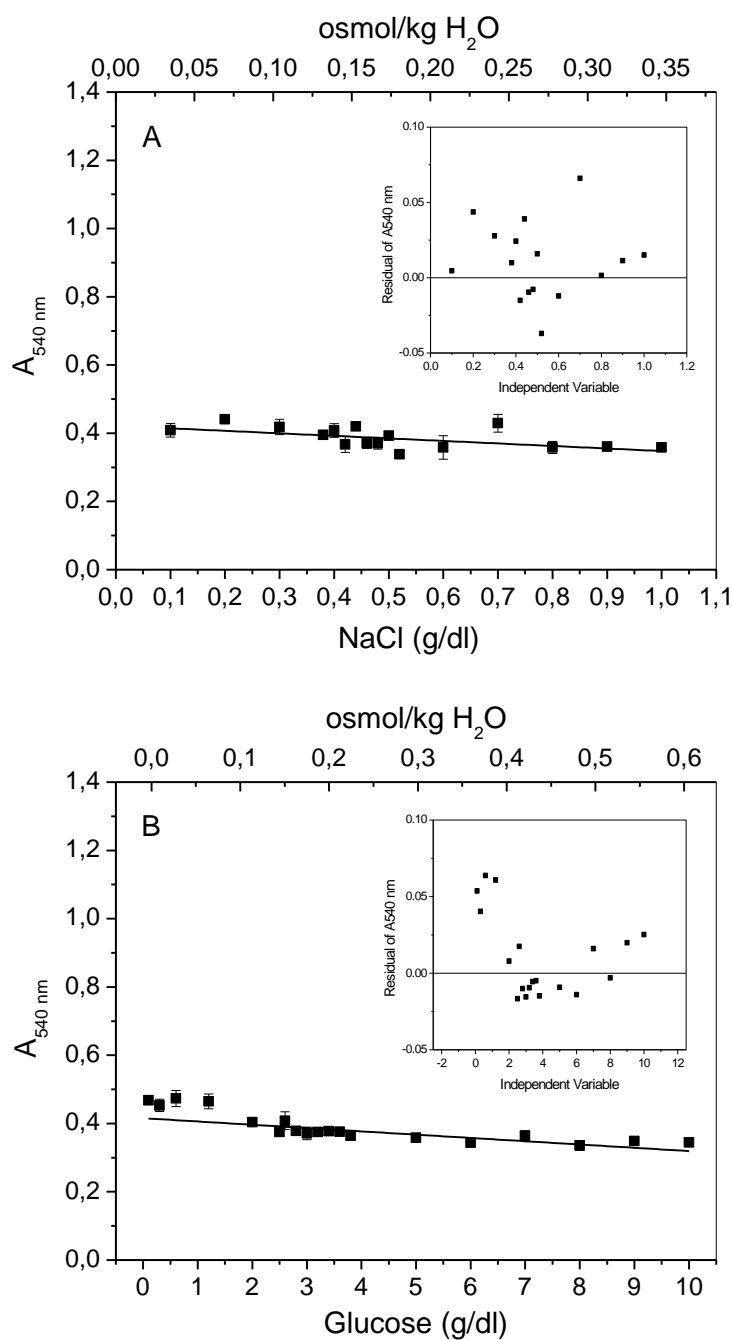


Fig. 3 Dependence of absorbance at 540 nm of hemoglobin with NaCl (A) and glucose (B) concentrations. Conditions: in water, 37 °C. Significant linear decreases, albeit very small, were observed for NaCl ($Y = 0.4219 - 0.0741 X$, $N = 63$, $R^2 = 0.2627$, $P = 0.025$) and also for glucose ($Y = 0.4155 - 0.0096 X$, $N = 112$, $R^2 = 0.5672$, $P = 0.0001$).

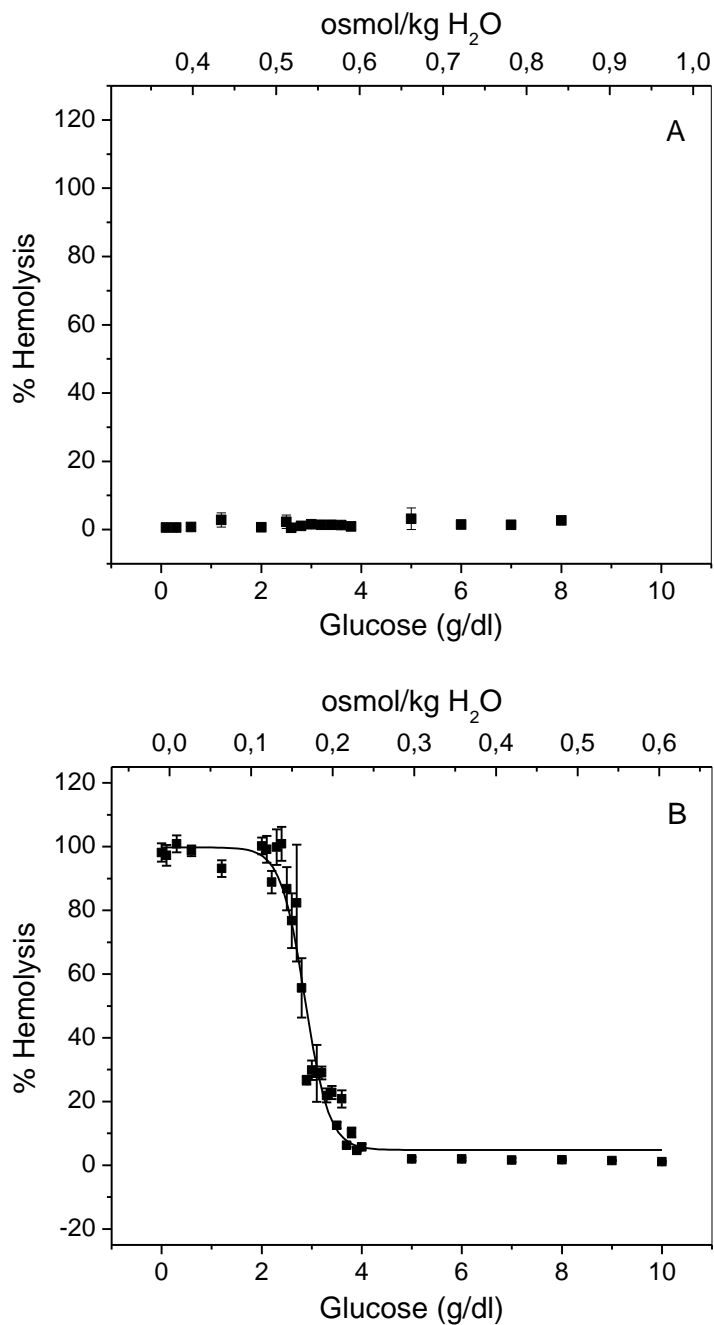


Fig. 4 Influence of glucose concentration on the percentage of hemolysis in 0.9 g/dl NaCl (A) and in water (B) at 37 °C. The percentage of hemolysis showed significant sigmoidal dependences ($N=272$, $R^2=0.9138$) with the glucose concentration and with the osmolality of the solution, with mid-transition points at 2.865 ± 0.0232 g/dl of glucose and 0.1637 ± 0.0014 osmol/kg H₂O.

Table 1 Values (mean \pm sd) of half-transition of the hypotonic hemolysis (X_{50}) in absence and in presence of different concentrations of glucose.

Glucose (g/dl)	X_{50} g/dl	P^*
0	0.475 \pm 0.00917	a
0.1	0.466 \pm 0.00920	b
0.3	0.462 \pm 0.00954	c
0.6	0.461 \pm 0.00750	
1.2	0.448 \pm 0.00727	a.b
2.0	0.446 \pm 0.00887	a.b.c

* Statistically significant differences ($P < 0.05$) between pairs of values indicated by the same letter (Tukey test).

References

1. Borowitzka LJ, Brown AD (1974) The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. *Arch Microbiol.* 96, 37-52
2. Bowlus RD, Somero GN (1979) Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. *J Exp Zool.* 208, 137-151
3. Pollard A, Wyn-Jones RG (1979) Enzyme activities in concentrated solution of glycinebetaine and other solutes. *Planta* 144, 291-298
4. Yancey PH (1985) Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes. In: *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation* (Gilles R, Gilles-Ballien M, eds), Springer-Verlag, Berlin, pp. 424-436
5. Santoro MM, Liu Y, Khan SMA, Hou LX, Bolen DW (1992) Increase thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 31, 5278-5283
6. Yancey PH (2001) Water stress, osmolytes and proteins. *Am Zool.* 41, 699-709
7. Cunha CC, Arvelos LR, Costa JO, Penha-Silva N (2007). Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr* 39, 341-347
8. Penha-Silva N, Arvelos LR, Cunha CC, Aversi-Ferreira TA, Gouvêa-Silva LF, Garrote-Filho MS, Finotti CJ, Bernardino-Neto M, De Freitas Reis FG (2008) Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry* 73, 23-29
9. Gekko K, Timasheff SN (1981) Mechanism of proteins stabilization by glycerol – preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20, 4667-4676
10. Gekko K, Timasheff SN (1981) Thermodynamic and kinetic examination of proteins

stabilization by glycerol. *Biochemistry* 20, 4677-4686

11. Lee JC, Timasheff SN (1981) The stabilization of proteins by sucrose. *J Biol Chem* 256, 7193-7201
12. Jaenicke R, Závodsky P (1990) Proteins under extreme physical conditions, *FEBS Lett.* 268, 344-349
13. Lien YHH, Pacelli MM, Braun EJ (1993) Characterization of organic osmolytes in avian renal medulla – a nonurea osmotic gradient system. *Am J Physiol.* 264, R1045-R1049
14. Timasheff SN (1993) The control of proteins stability and association by weak-interactions with water – how do solvents affect these processes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 22, 67-97
15. Liu Y, Bolen DW (1995) The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* 34, 12884-12891
16. Taylor LS, York P, Williams AC, Edwards HGM, Mehta C, Jackson GS, Badcoe IG, Clarke AR (1995) Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by chaotropic agent. *Biochim Biophys Acta* 1253, 39-46
17. Wang A, Bolen DW (1997) A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* 36, 9101-9108
18. Timasheff SN (1998) Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Prot Chem* 51, 355-432
19. Timasheff SN (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9721-9726
20. Boutron P, Arnaud F (1984) Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. *Cryobiology* 21, 348-358

21. Pellerin-Mendes C, Million L, Marchand-Arvier M, Labrude P, Vigneron C (1997) In vitro study of the effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. *Cryobiology* 35, 173-186
22. Wagner CT, Martowicz ML, Livesey SA, Connor J (2002) Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. *Cryobiology* 45, 153-166
23. Scott KL, Lecak J, Acker JP (2005) Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. *Transfus Med Rev.* 19, 127-142
24. de Freitas MV, Netto RCM, Huss JCC, de Souza TMT, Costa JO, Firmino CB, Penha-Silva N (2008) Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro* 22, 219-224
25. Buttafava A, Balduini C, Minetti G, Paula E (2008) Resistance of human erythrocyte membranes to Triton X-100 and C12E8. *J Membr Biol.* 227, 39-48
26. Domingues CC, Malheiros SVP, de Paula E (2008) Solubilization of human erythrocyte membranes by ASB detergents. *Braz J Med Biol Res.* 41, 758-764
27. Fonseca L, Arvelos L, Netto R, Lins A, Garrote-Filho M, Penha-Silva N (2010) Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. *J Bioenerg Biomembr.* 42, 413-418
28. Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, Huss JCC, de Souza TMT, de Freitas MV, Netto RCM (2007) Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev.* 128, 444-449
29. de Freitas MV, de Oliveira MR, dos Santos DF, de Cássia Mascarenhas Netto R, Fenelon SB, Penha-Silva N (2010) Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *J Membr Biol.* 233, 127-134
30. Mansur PHG, Cury LKP, Leite JOB, Pereira AA, Penha-Silva N, Andrade AO (2010) The approximate entropy of the electromyographic signals of tremor correlates with the osmotic fragility of human erythrocytes. *Biomed Eng OnLine*, 9:29

31. Riquelme B, Foresto P, D'Arrigo M, Valverde J, Rasia R (2005) A dynamic and stationary rheological study of erythrocytes incubated in a glucose medium. *J Biochem Biophys Meth.* 62, 131-141
32. Shin S, Ku Y-H, Suh J-S, Singh M (2008) Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media. *Clin Hemorheol Microcirc.* 38, 153-161
33. Fonseca LC, Correa NCR, Garrote MD, Cunha CC, Penha-Silva N (2006) Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous solutions. *Quim Nova* 29, 543-548
34. Bolen DW, Baskakov IV (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol.* 310, 955-963
35. Wang A, Robertson AD, Bolen DW (1995) Effects of a naturally-occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease-A. *Biochemistry* 34, 15096-15104
36. Saunders AJ, Davis-Searles PR, Allen DL, Pielak GJ, Erie DA (2000) Osmolyte-induced changes in protein conformation equilibria. *Biopolymers* 53, 293-307
37. Qu Y, Bolen CL, Bolen DW (1998) Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9268-9273
38. Bakaltcheva IB, Odeyale CO, Spargo BJ (1996) Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochim Biophys Acta* 1280, 73-80
39. De Loecker R, Gossens W, Van Duppen V, Verwilghen R, De Loecker W (1993) Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. *Cryobiology*, 30, 279-285
40. Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, Häussinger D (1998) Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78, 247-306
41. Bransky A, Korin N, Nemirovski Y, Dinnar U (2007) Correlation between erythro-

cytes deformability and size: a study using a microchannel based cell analyzer. *Microvasc Res.* 73, 7-13

42. Fields PA (2001) Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp Biochem Physiol A* 129, 417-431
43. Waugh RE, Sarelius IH (1996) Effects of lost surface area on red blood cells and red blood cell survival in mice. *Amer J Physiol.* 271, C1847-1852
44. Waugh RE, Narla M, Jackson CW, Mueller TJ, Suzuki T, Dale GL (1992) Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood* 79, 1351-1358