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

**EFEITOS DO GLICEROL SOBRE A DEPENDÊNCIA TÉRMICA
DA ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Cleine Chagas da Cunha Arvelos**

UBERLÂNDIA, MG

2007



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


**EFEITOS DO GLICEROL SOBRE A DEPENDÊNCIA TÉRMICA
DA ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Cleine Chagas da Cunha Arvelos**

Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

UBERLÂNDIA, MG

2007

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

**EFEITOS DO GLICEROL SOBRE A DEPENDÊNCIA TÉRMICA
DA ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Cleine Chagas da Cunha Arvelos**
Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

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

UBERLÂNDIA, MG

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A795e Arvelos, Cleine Chagas da Cunha, 1978-
Efeitos do glicerol sobre a dependência térmica da estabilidade de
eritrócitos humanos / Cleine Chagas da Cunha Arvelos - 2007.
40 f.: il.


Orientador: Nilson Penha-Silva.
Dissertação (mestrado) - 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

Descritores: estabilidade de membranas; eritrócitos; etanol; glicerol, temperatura, termodinâmica biológica.

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

**EFEITOS DO GLICEROL SOBRE A DEPENDÊNCIA TÉRMICA
DA ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Cleine Chagas da Cunha Arvelos**

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Examinador: Professora Dra. **Maria Goreti de Almeida Oliveira** (UFV)

Examinador: Professor Dr. **Marcelo Matos Santoro** (UFMG)

Data da defesa: **18/06/2007**

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

Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**

(Orientador)

*“Os que esperam no Senhor
renovam as suas forças,
sobem com asas como águias,
correm e não se cansam,
caminham e não se fatigam.”*

(Isaías 40: 31, Bíblia Sagrada)

DEDICATÓRIA

A Deus,

por tudo que tenho e sou. Por essa conquista que, sem fé e otimismo eu não conseguiria.

Aos meus pais,

exemplos de retidão de caráter, luta, humildade e fé, por todo carinho, preocupação e amor, por estarem sempre presentes, em todas as horas, apoiando e não medindo esforços para que meus sonhos se realizassem.

Ao meu marido Kelson,

pelo companheiro e amigo que é, pelo estímulo que representa em minha vida, pela compreensão, incentivo e paciência que teve diante de minhas ausências e, principalmente, pelo seu amor e dedicação, o que prova a importância de uma vida a dois.

A vocês, agradeço e dedico a minha festa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar e me guiar...

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram. Aos meus pais, **Manoel Lourenço da Cunha e Ondina Chagas da Cunha**, que me deram não somente a vida, mas principalmente a educação e condições de estudo. Aos meus irmãos, amigos para todas as horas, **Cleide Chagas e Clebes Lourenço**, pela força e incentivo. Aos meus cunhados, **Sislene Rodrigues e Clésio de Assis**, por sempre torcerem por mim. Aos meus sobrinhos **Victor Henrique, Izadora Faria, Maria Eduarda e Mateus Henrique**, pela alegria.

Eu fortemente agradeço ao meu marido, **Kelson Arvelos Alves**, por sua extensa paciência, pelo seu amor, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, que me acolheu como estudante e permitiu a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, **Doutor Nilson Penha Silva**, por compartilhar comigo sua imensa sabedoria, também seu tema de pesquisa, sendo sempre disposto a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgem durante o processo de reflexão. Por ser paciente e generoso e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.

À minha amiga e colega de laboratório **Leticia Ramos de Arvelos** pela inestimável ajuda na execução da parte prática desse trabalho e por seu companheirismo. À **Natássia Caroline Resende Corrêa** pela amizade e exemplo de competência. À colega **Lúbia Cristina Fonseca**, pela acolhida no laboratório e em sua casa no início do meu mestrado. Aos **demais colegas do laboratório**, pelos ensinamentos, trocas, auxílios e convívio.

Aos **funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica**, pelo auxílio,

colaboração, simpatia e boa vontade.

E também à **Sociedade de Ensino Superior de Patos de Minas** e à **Faculdade Cidade de Coromandel**, por entenderem as minhas ausências e pelo incentivo.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xi
Introdução geral.....	01
Resumo.....	02
Abstract.....	04
Introdução.....	06
Material e métodos.....	13
Resultados.....	17
Discussão.....	29
Conclusões.....	35
Referências bibliográficas.....	36

ABREVIATURAS

<i>A₁</i>	Absorvância antes da transição de lise dos eritrócitos por etanol ou depois da transição de lise por estresse hipotônico
<i>A₂</i>	Absorvância depois da transição de lise dos eritrócitos por etanol ou antes da transição de lise por estresse hipotônico
<i>D</i>	Desnaturante (etanol)
<i>D₅₀</i>	Concentração de etanol que produz 50% de hemólise
<i>D_{50R}</i>	Concentração de etanol que produz 50% de lise do estado R dos eritrócitos
<i>D_{50T}</i>	Concentração de etanol que produz 50% de lise do estado T dos eritrócitos
<i>dD</i>	Amplitude da concentração do desnaturante na transição de desnaturação
Estado <i>R</i>	Estado expandido dos eritrócitos
Estado <i>T</i>	Estado compactado dos eritrócitos
<i>H₅₀</i>	Concentração de NaCl que produz 50% de hemólise
<i>S₅₀</i>	Concentração de etanol que produz 50% de estabilização
<i>Salina</i>	Solução de NaCl a 0,9 g.dL ⁻¹

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ações do etanol sobre eritrócitos em solução salina fisiológica...	11
Figura 2. Dependência da lise de eritrócitos com a concentração de etanol.....	12
Figura 3. A. Lise de eritrócitos humanos por choque hipotônico. B. Lise de eritrócitos humanos por etanol.....	19
Figura 4. Efeito da temperatura sobre a curva de lise de eritrócitos humanos por etanol na presença (A) e ausência (B) de glicerol a 1,5 mol.L ⁻¹	20
Figura 5. Efeito do glicerol (1,5 mol.L ⁻¹) sobre as linhas de dependência térmica da meia-transição de lise (<i>D</i> _{50R}) de eritrócitos humanos por etanol em solução salina.....	22
Figura 6. Efeito de glicerol a 1,5 mol.L ⁻¹ sobre a curva de lise de eritrócitos humanos por etanol.....	23
Figura 7. Efeito da concentração de glicerol sobre as curvas de lise de eritrócitos humanos por etanol.....	24
Figura 8. Dependência da meia-transição de lise (<i>D</i> _{50R}) de eritrócitos humanos por etanol com a concentração de glicerol (P<0,001)...	26
Figura 9. Efeito do glicerol sobre a lise de eritrócitos por estresse hipotônico a 7°C.....	27

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Efeito da temperatura e do glicerol sobre os valores de D_{50R} para a lise de eritrócitos humanos por etanol em solução salina.....	21
Tabela 2. Efeito da concentração de glicerol sobre os valores de D_{50R} para a lise de eritrócitos humanos por solução salina de etanol a 7 °C.....	25
Tabela 3. Efeito do glicerol sobre os valores de H_{50} para a lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico a 7 °C.....	28

INTRODUÇÃO GERAL

O Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob a coordenação do Professor Doutor Nilson Penha Silva, inicialmente centrado no efeito de agentes caotrópicos e osmólitos sobre a estabilidade de enzimas, vem há algum tempo estudando a estabilidade de membranas.

Para isso padronizou um método para análise da estabilidade das membranas de eritrócitos em função de agentes caotrópicos (estresse hipotônico, etanol, uréia e altas temperaturas) na ausência e presença de agentes promotores de osmoestabilização (como o glicerol e o sorbitol), fundamentado na monitoração da taxa de hemólise pela determinação da absorvância à 540 nm.

Os resultados permitiram o desenvolvimento, em nosso laboratório, de um modelo que considera que os eritrócitos existiriam em dois estados morfológicos distintos, um estado **R**, expandido, e um estado **T**, contraído. Cada um desses estados seria formado por um conjunto de diferentes formas.

Este trabalho avalia os efeitos de um osmólito de ocorrência natural, o glicerol, sobre a estabilidade do estado **R** dos eritrócitos.

Os osmólitos têm sido extensamente estudados para a criopreservação de complexos biológicos.

Mas agora têm surgido novas vertentes de estudo, com uso do glicerol no tratamento de condições patológicas como o edema cerebral e na promoção de proteção de complexos biológicos contra o envelhecimento (geroproteção).

Assim, esse trabalho apresenta uma grande relevância diante da biotecnologia, da biogerontologia e das ciências da saúde de uma maneira em geral.

Ele apresenta a dependência térmica dos efeitos do glicerol sobre a estabilidade de eritrócitos humanos submetidos à ação do etanol e do estresse hipotônico.

Os resultados obtidos foram coerentes com os trabalhos desenvolvidos anteriormente. Eles são analisados e discutidos à luz do modelo desenvolvido em nosso laboratório.

RESUMO

[EFEITOS DO GLICEROL SOBRE A DEPENDÊNCIA TÉRMICA DA ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS]

A incubação de eritrócitos humanos com etanol em solução salina fisiológica, por 30 minutos, pode produzir lise do estado morfológico expandido (**R**), de menor estabilidade, ou formação de um estado morfológico contraído (**T**), de maior estabilidade. O estado **R** ocorre em condições fisiológicas e sofre lise sob concentrações pouco elevadas de etanol. A lise do estado **R** por etanol pode ser caracterizada pela concentração de etanol no ponto de meia-transição da curva de lise dos eritrócitos por etanol (D_{50R}). A lise do estado **R** por hipotonicidade pode ser caracterizada pela concentração salina no ponto de meia-transição da curva de lise dos eritrócitos por estresse hipotônico (H_{50}). O estado **T** ocorre em condições de hiperosmolaridade e sofre lise em concentrações mais elevadas de etanol. Dependendo de sua concentração, o próprio etanol pode produzir lise ou osmoestabilização de eritrócitos humanos. O objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos da concentração de glicerol e da temperatura sobre a estabilidade do estado **R** de eritrócitos humanos (D_{50R}) em função da ação de etanol e da concentração salina. Foram utilizadas amostras de sangue de 12 voluntárias sadias com 24 ± 3 anos de idade. A percentagem de hemólise, após incubação por 30 minutos, em função da concentração de etanol (0-36%) em solução salina fisiológica foi estudada por espectrofotometria em 540 nm na ausência e na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes temperaturas (7, 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42 e 47°C) e na presença de diferentes concentrações de glicerol (0; 0,5; 1,0; 1,5; $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$) a 7°C . A percentagem de hemólise, após incubação por 30 minutos, também foi determinada em função da concentração salina na ausência e na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e à 7°C . As percentagens de hemólise em função da concentração de etanol em solução salina fisiológica ou em função da concentração salina foram ajustadas a curvas de regressão sigmoideal. Os ajustes às curvas de regressão e a existência de diferenças entre os grupos foram considerados significantes quando **P** era menor do que 0,05. Os valores de D_{50R} diminuíram significativamente, de acordo com

curvas de caimento sigmoidal, com o aumento da temperatura na ausência e na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Isso mostra que o aumento na temperatura induz uma transição em dois estados no padrão de estabilidade dos eritrócitos, um estado de menor estabilidade (**R**) e um estado de maior estabilidade (**T**). Os valores de D_{50R} também declinaram significativamente, de acordo com uma curva de caimento sigmoidal, com o aumento na concentração de glicerol. Isso mostra que a concentração de glicerol também induz uma transição de estados nos eritrócitos, de um estado de menor estabilidade (**R**), presente sob menores concentrações de glicerol, para um estado de maior estabilidade (**T**), presente sob maiores concentrações de glicerol. A presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ diminui progressivamente a estabilidade dos eritrócitos com a diminuição da temperatura entre 32 e $7 \text{ }^\circ\text{C}$, mas aumenta a estabilidade dos eritrócitos acima de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Esse comportamento foi atribuído à existência de uma pressão osmótica crítica gerada pela ação conjunta do etanol, do glicerol e da temperatura. Abaixo dessa pressão osmótica crítica haveria predomínio do estado **R** e acima dela haveria predomínio do estado **T** dos eritrócitos. Embora a presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ diminua a estabilidade dos eritrócitos contra a ação do etanol, ela aumenta a estabilidade contra a lise por hipotonicidade, a $7 \text{ }^\circ\text{C}$, uma vez que os valores de H_{50} foram significativamente menores na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ do que na ausência desse osmólito. Nessa temperatura, a conjunção das ações do etanol, da temperatura e do glicerol determinaria o predomínio do estado **R** dos eritrócitos, que tem uma menor estabilidade e sofre mais facilmente a ação caotrópica do etanol. Entretanto, na ausência do etanol, a presença do glicerol determinaria uma menor entrada de água nos eritrócitos, o que tornaria mais difícil sua lise por hipotonicidade.

Descritores: estabilidade de membranas, eritrócitos, etanol, glicerol, temperatura, termodinâmica biológica.

ABSTRACT

[EFFECTS OF GLYCEROL ON THE THERMAL DEPENDENCE OF THE STABILITY OF HUMAN ERYTHROCYTES]

The incubation of human erythrocytes with ethanol in saline physiologic solution, by 30 minutes, can produce lysis of the expanded morphological state (**R**), which presents a lower stability, or formation of the contracted morphological state (**T**), which has a higher stability. The **R** state occurs in physiological conditions and suffers lysis under less elevated concentrations of ethanol. The lysis of the **R** state by ethanol can be characterized by the ethanol concentration at the mid-transition point (D_{50R}) of the lysis curve of the erythrocytes by ethanol. The lysis of the **R** state by hypotonicity can be characterized by the saline concentration at the mid-transition point (H_{50}) of the lysis curve of the erythrocytes by hypotonic stress. The **T** state occurs in hyperosmolar conditions and suffers lysis at more elevated ethanol concentrations. Depending on its concentration, the proper ethanol can produce lysis or osmostabilization of the human erythrocytes. The objective of this work was to study the effects of glycerol concentration and temperature on the stability (D_{50R}) of the **R** state of the human erythrocytes in function of the chaotropic actions of ethanol and hypotonicity. The blood samples were collected from 12 healthy female volunteers (24 ± 3 years). The percentage of hemolysis, after incubation by 30 minutes, in function of the ethanol concentration (0-36%) in saline physiologic solution, was studied by spectrophotometry at 540 nm in the absence and in the presence of 1.5 mol.L^{-1} glycerol at different temperatures (7, 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42 and 47°C) and in the presence of different glycerol concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mol.L^{-1}) at 7°C . The percentage of hemolysis, after incubation by 30 minutes, was also evaluated in function of the saline concentration at the absence and in the presence of 1.5 mol.L^{-1} glycerol at 7°C . The percentage of hemolysis in function of the ethanol concentration in saline physiologic solution or in function of the saline concentration, were fitted to sigmoidal regression curves. The fittings to the regression curves and the existence of difference among groups were considered significant only when **P** values were smaller than 0.05. The values of D_{50R}

decreased significantly, according decaying sigmoidal curves, with the increase in the temperature in the absence and in the presence of 1.5 mol.L^{-1} glycerol. This means that the temperature increase induces a transition between two states, one with a lower stability (**R**) and the other with a higher stability (**T**). The values of D_{50R} also have declined significantly, according a sigmoidal decaying curve, with the increase in the glycerol concentration. This means that the glycerol concentration also induces a states transition in the erythrocytes, from a lower stability state (**R**), present at the lower glycerol concentrations, to a higher stability state (**T**), present at the higher glycerol concentrations. The presence of 1.5 mol.L^{-1} glycerol decreases progressively the erythrocytes stability with the decrease in the temperature from 32 to 7 °C, but it increases the erythrocytes stability above 37 °C. This behaviour was attributed to the existence of a critical value of osmotic pressure generated by a combination of the ethanol, glycerol and temperature actions. Below this critical value of osmotic pressure there would be predominance of the **R** state and above that value there would be a predominance of the **T** state of the erythrocytes. Although the presence of 1.5 mol.L^{-1} glycerol diminishes the stability of erythrocytes against the ethanol action, it increases the erythrocytes stability against lysis by hypotonicity, at 7 °C, since the H_{50} values were significantly lower in the presence of the osmolyte than in its absence. At this temperature, the conjunction of the ethanol, temperature and glycerol actions would determine the predominance of **R** state of the erythrocytes, which has a lower stability and suffers more easily the chaotropic action of the ethanol. However, in the absence of ethanol, the presence of glycerol would determine a lower water entrance in the erythrocytes, making more difficult its lysis by hypotonicity.

Key words: membrane stability, erythrocytes, ethanol, glycerol, temperature, biological thermodynamics.

INTRODUÇÃO

As membranas biológicas são complexos organizacionais que devem manter suas estruturas para preservação de suas funções. A capacidade de uma membrana biológica em manter sua estrutura diante de agentes ou condições caotrópicas é definida como estabilidade. Uma baixa estabilidade de membrana vai determinar alterações estruturais que comprometerão suas funções.

A estabilidade da membrana pode ser aumentada pela capacidade da própria célula em aumentar a concentração de fosfolípídeos com ácidos graxos saturados e de colesterol na dupla camada lipídica. A produção e concentração de solutos orgânicos de baixa massa molecular, denominados osmólitos é outra estratégia celular de preservação da estabilidade celular [BOROWITZA e BROWN, 1974; BOWLUS e SOMERO, 1979; POLLARD e WYN JONES, 1979; YANCEY *et al.*, 1982; YANCEY, 1985; NIKOLOPOULOS e MANETAS, 1991; SANTORO *et al.*, 1992].

Entretanto, um aumento excessivo na estabilidade irá diminuir a fluidez e comprometer as funções da membrana. Dessa forma, alterações que comprometam a estabilidade ou a fluidez das membranas podem afetar as funções celulares. Assim, as membranas devem equilibrar estabilidade e fluidez para preservação das funções celulares.

A osmoestabilização é uma estratégia também usada em procedimentos biotecnológicos, como a criopreservação de eritrócitos e outras células por longos períodos. Os osmoestabilizadores mais usados são pequenos solutos como glicerol, sorbitol, trealose e dextrana [BOUTRON e ARNAUD, 1984; SANTORO *et al.*, 1992; PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; LANG *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 2002; SCOTT, LECAK e ACKER, 2005].

A natureza da ação estabilizadora do osmólito sobre as membranas biológicas é ainda controversa e pouco descrita pela literatura. Finotti [2006] e Bernardino Neto [2006] atribuíram essa ação a um mecanismo originalmente usado para explicar a estabilização de proteínas por co-solventes, chamado de efeito solvofóbico [TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1998] ou osmofóbico [BOLEN e BASKAKOV, 2001].

A osmoestabilização de eritrócitos ocorre com contração de volume e

alterações morfológicas que podem ser revertidas após a diluição do excesso de soluto [PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; LANG *et al.*, 1998; DE LOECKER *et al.*, 1993; BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996]. Isto indica a existência de dois estados morfológicos, um expandido ou relaxado (**R**), presente nas condições naturais do sangue, e um estado condensado ou tenso (**T**), presente em altas concentrações de osmólitos.

A existência desses dois estados foi considerada no modelo elaborado em nosso laboratório (**Figura 1**) [AVERSI-FERREIRA, 2004; BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; REIS, 2007].

O que motivou a idealização do modelo foi o padrão de dependência da porcentagem de lise de eritrócitos humanos em função da concentração de etanol (**Figura 2**). Sob concentrações mais baixas de etanol em solução salina, os eritrócitos sofrem uma transição de lise com o aumento na concentração de etanol (**Figura 2A**). Entretanto, sob concentrações mais elevadas de etanol, também em solução salina fisiológica, a curva de lise de eritrócitos por etanol apresenta um poço de estabilização (**Figura 2B**). Esse poço foi atribuído à existência da junção de uma curva de estabilização (porção descendente da curva na região do poço) com uma curva de transição de lise desse estado estabilizado (porção ascendente da curva na região do poço) [GOUVÊA-E-SILVA, 2006]. Realmente, os eritrócitos foram vistos, por microscopia de luz, em um estado expandido antes da primeira transição de lise (**Figura 2A**), mas contraídos no fundo do poço de estabilização da **Figura 2B** [GOUVÊA-E-SILVA, 2006].

Com um aumento moderado na concentração de etanol, os eritrócitos do estado **R** poderiam sofrer lise (rota 1 da **Figura 1**), segundo uma curva sigmoideal crescente caracterizada pelo seu ponto de meia-transição, D_{50R} (**Figura 2A**). Com um aumento mais expressivo na concentração de etanol, os eritrócitos sofreriam estabilização (rota 2 da **Figura 1**), com geração do estado **T**, segundo uma curva sigmoideal decrescente caracterizada pelo seu ponto de meia-transição, S_{50T} (**Figura 2B**). Um aumento ainda mais expressivo na concentração de etanol levaria à lise do estado **T** dos eritrócitos (rota 3 da **Figura 1**), segundo uma curva crescente de transição sigmoideal caracterizada pelos valores de D_{50T} (**Figura 2B**) [GOUVÊA-E-SILVA, 2006].

O tipo ativado de rota seria determinado por fatores como a natureza do

soluto incorporado na solução salina fisiológica, a temperatura e a pressão osmótica.

O etanol, em solução salina fisiológica, produz aumento da pressão osmótica e diminuição da força hidrofóbica. Esses dois eventos devem contribuir para promoção da lise do estado **R** dos eritrócitos em função do aumento na concentração de etanol, que é representada pela rota 1 do modelo (**Figura 1**). Possivelmente, a lise do estado **R** do eritrócito, promovida pela ação do etanol, se deve à desnaturação da membrana. O etanol deve atenuar a força hidrofóbica, que é importante na formação e manutenção da bicamada lipídica, promovendo desnaturação de proteínas e fuga de fosfolipídios da membrana e sua solubilização no solvente. A ação da pressão osmótica deve ter um significado bem menor, praticamente insignificante, neste caso, uma vez que concentrações muito baixas de etanol são capazes de promover 50% de lise dos eritrócitos humanos, mas concentrações muito mais altas de glicerol não promovem lise rápida dos eritrócitos nas condições do ensaio [FINOTTI, 2006].

O etanol, que é um agente caotrópico de proteínas, tem sua ação fundamentada na atenuação da força hidrofóbica e em sua capacidade de acomodar melhor no solvente as cadeias laterais apolares dos aminoácidos [NOZAKI e TANFORD, 1971; CASTRONUOVO *et al.*, 1999; WANG, ROBERTSON e BOLEN, 1995]. Igualmente, o etanol deve atenuar a força hidrofóbica, que estabiliza a dupla camada lipídica da membrana.

A adição de etanol, em concentrações superiores àquela que causa 100% de hemólise, levaria a mudança na fase interna do eritrócito. Deve haver remoção de água de seu interior, em decorrência do aumento da pressão osmótica provocado pela adição de etanol, o que levaria a uma contração de volume do eritrócito, que seria tanto mais intensa quanto maior for a concentração de etanol. Assim, o eritrócito passaria do estado **R** para o estado **T** (rota 2 da **Figura 1**). A contração do eritrócito promoveria aproximação dos lipídios de membrana e intensificação das atrações de van der Waals no seu interior, levando ao segundo efeito do etanol, a estabilização dos eritrócitos (**Figura 2B**). Realmente, na presença de concentrações elevadas de agentes cosmotrópicos, que elevam substancialmente a pressão osmótica, os eritrócitos são mantidos estáveis por longos períodos, mas apresentando um menor volume [BAKALTCHEVA,

ODEYALE e SPARGO, 1996; PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997].

Entretanto, com a adição de mais etanol, a pressão do meio externo vai aumentar até a promoção do terceiro efeito do etanol (rota 3 da **Figura 1**), a lise do estado **T** dos eritrócitos, promovida pela alta pressão osmótica e a ação caotrópica do etanol (**Figura 2B**).

A temperatura pode interferir sobre os três estados dos eritrócitos, pela ação clássica desnaturante do calor e pelo aumento da pressão osmótica do meio. O calor aumenta a energia vibracional térmica dos constituintes químicos da membrana, o que enfraquece as atrações não covalentes, sejam elas iônicas, de hidrogênio ou de van der Waals. A pressão osmótica tem dependência direta com a temperatura, um aumento na temperatura deve intensificar os efeitos promovidos pelo aumento da pressão osmótica. Assim, a temperatura pode intensificar os três efeitos produzidos pelo etanol.

Se os três efeitos produzidos pelo etanol sobre os eritrócitos estão associados ao aumento na pressão osmótica, esses efeitos também seriam potencializados pelo glicerol. De fato, o glicerol potencializa as rotas 2 e 3 (**Figura 1**) [REIS, 2007].

No presente trabalho, nós vamos nos ater ao efeito do glicerol sobre a rota 1, caracterizada por pelo valor de D_{50R} do etanol, usando diferentes temperaturas e concentrações de glicerol.

A lise por etanol pode não refletir os mecanismos naturais da lise de eritrócitos *in vivo*. Por isso, nós também investigamos neste trabalho o efeito do glicerol sobre a estabilidade de eritrócitos em função da hipotonicidade. A hipotonicidade deve representar uma condição mais realisticamente presente nas condições naturais. Em meio hipotônico, as células aumentam até alcançar um volume crítico antes de serem lisadas [JAIN, 1973]. É por isso que fatores como o volume, o tamanho e a forma do eritrócito, mas também a composição química e a viscoelasticidade de suas membranas e a natureza da hemoglobina são importantes na determinação da estabilidade das células vermelhas do sangue [JAIN, 1986; PERK, FREI e HERZ, 1964] Todos esses fatores, em especial o controle ativo do volume celular, têm importância *in vivo* na determinação da estabilidade dos eritrócitos [MAKINDE e BOBADE, 1994].

Em suma, esse trabalho objetiva avaliar a estabilidade do estado **R** dos

eritrócitos contra lise por etanol e choque hipotônico, em diferentes temperaturas e concentrações de glicerol.

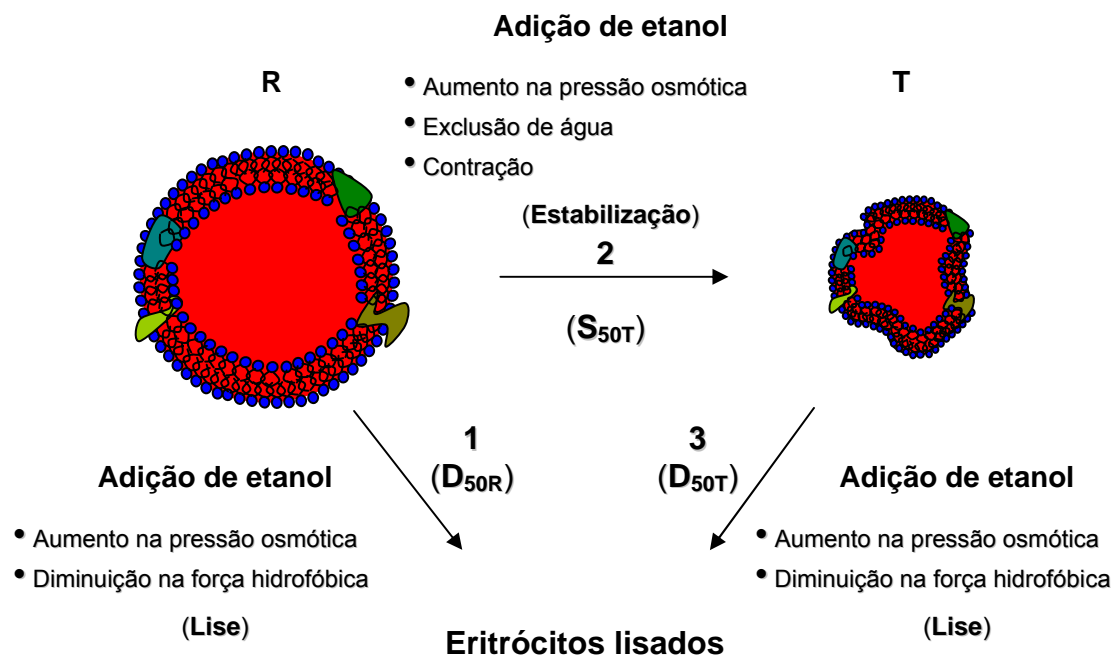


Figura 1. Ações do etanol sobre eritrócitos em solução salina fisiológica. Os eritrócitos existiriam em um estado morfológico expandido (**R**) e em um estado condensado (**T**). Cada estado morfológico seria constituído por um conjunto de diferentes formas. Baixas concentrações de etanol causariam lise do estado **R** (rota 1). Concentrações intermediárias de etanol causariam deslocamento do estado **R** dos eritrócitos para o estado **T** (rota 2), por aumento na pressão osmótica. Altas concentrações de etanol causariam lise do estado **T** (rota 3) [BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006; REIS, 2007].

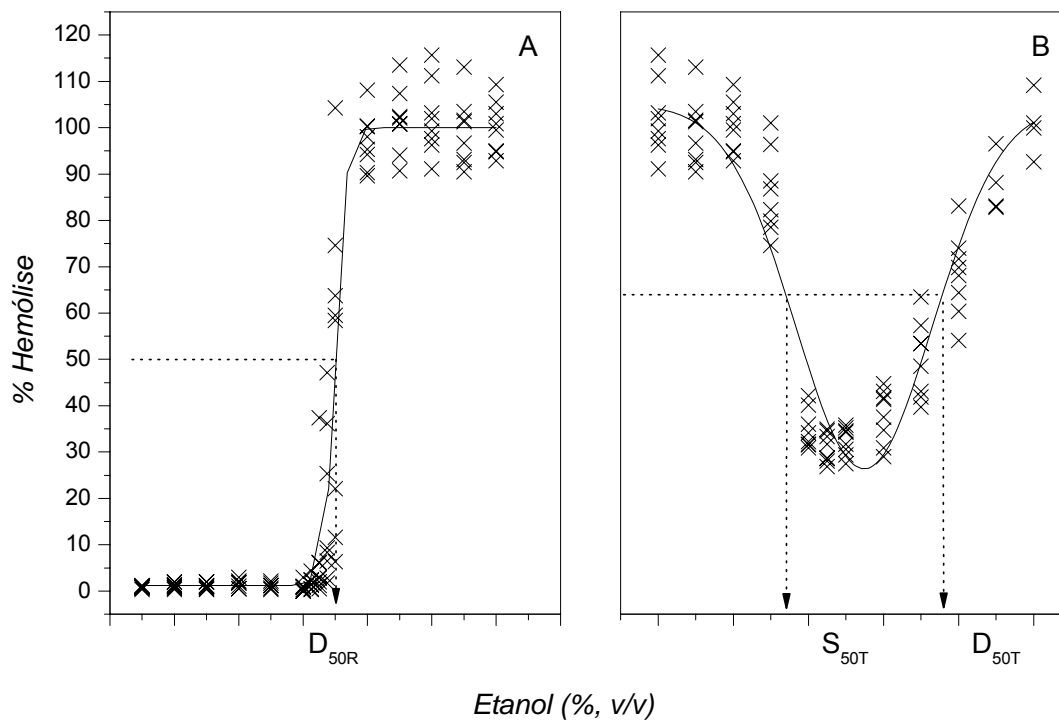


Figura 2. Dependência da lise de eritrócitos com a concentração de etanol. Condições experimentais: em solução salina fisiológica e a 37 °C. A lise por etanol do estado **R** dos eritrócitos, caracterizada pela concentração de etanol que promove 50% de lise (D_{50R}) do estado **R**, está mostrada à esquerda (**A**). A geração do estado estabilizado **T** dos eritrócitos, promovida pelo aumento na concentração de etanol, caracterizada pelo seu ponto de meia-transição (S_{50T}), seguida pela lise induzida por etanol do estado estabilizado **T**, caracterizada pelo seu ponto de meia-transição transição (D_{50T}) estão mostradas à direita (**B**) [GOUVÊA-e-SILVA, 2006].

MATERIAL E MÉTODOS

População

As amostras de sangue analisadas foram doadas por 12 voluntárias, com idade média de 24 ± 3 anos, saudáveis, não fumantes, não usuárias de medicamentos ou drogas e, especialmente, não consumidoras de bebidas alcoólicas. O estudo foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Cada voluntária assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Coleta das amostras de sangue

Amostras de 4 mL de sangue foram colhidas das voluntárias por punção endovenosa, após jejum noturno de 8 a 14 horas, em tubos evacuados (Vacuntainer®) contendo 50 μ L de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 1g/100mL, como anticoagulante.

Reagentes e equipamentos

Os reagentes usados (NaCl, glicerol e etanol) foram da marca Synth e tinham grau de pureza de 99,5%, o qual foi devidamente corrigido no preparo das soluções. As medidas de volume foram realizadas em bureta de vidro refratário e pipetas automáticas da marca Labsystems, modelo Finnpipette Digital. As medidas de massa foram feitas em uma balança digital da marca AND, modelo 870. As incubações foram feitas em banho termostatizado Marconi, modelo MA 184. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro Micronal modelo B-442.

Determinação da estabilidade de eritrócitos em solução salina fisiológica sob concentrações crescentes de etanol

Baterias de pequenos tubos de polietileno (Eppendorff®), em duplicada, contendo 1 mL de solução de etanol em concentrações de 0 a 36% em solução salina fisiológica (NaCl a 0,9%) foram pré-incubadas durante 10 minutos a 7, 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42 e 47 °C. Após adição de alíquotas de 25 μ L de sangue aos tubos, eles foram fechados, homogeneizados, incubados por 30 minutos em cada

temperatura e, em seguida, centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos. A desnaturação dos eritrócitos foi acompanhada pela medida da absorbância em 540 nm (A_{540}) do sobrenadante em função da concentração de etanol, em cada uma das temperaturas consideradas.

Determinação da estabilidade de eritrócitos em solução salina fisiológica e glicerol sob concentrações crescentes de etanol

A estabilidade dos eritrócitos sob a ação desnaturante do etanol foi analisada na presença de diferentes concentrações de glicerol. Soluções com 0 a 36% de etanol e 0,5, 1,0, 1,5 ou 2,0 mol.L⁻¹ de glicerol em NaCl a 0,9% foram preparadas para analisar o efeito da concentração de glicerol sobre a lise de eritrócitos humanos por etanol a 7 °C. Soluções com concentrações variando de 0 a 36% de etanol e 1,5 mol.L⁻¹ de glicerol em NaCl a 0,9% foram preparadas para avaliar o efeito da presença de glicerol na lise de eritrócitos humanos a 7, 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42 e 47 °C. A cada série de tubos de polietileno (Eppendorff®), em duplicata, foi adicionado 1 mL da solução teste nas diferentes concentrações de etanol e a uma única concentração de glicerol. Após pré-incubação por 10 minutos à temperatura do ensaio, foi feita adição de 25 µL de sangue a cada um dos tubos, que foram fechados, homogeneizados, incubados por 30 minutos na respectiva temperatura do ensaio e centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. A desnaturação dos eritrócitos foi acompanhada pela medida da absorbância em 540 nm (A_{540}) do sobrenadante em cada concentração do osmólito e temperatura.

Determinação da estabilidade de eritrócitos em função de estresse hipotônico

A estabilidade dos eritrócitos contra estresse hipotônico também foi analisada. A cada unidade (em duplicata) de uma série de tubos de polietileno (Eppendorff®) foi adicionado 1 mL de solução de NaCl em concentrações de 0,1 a 1,0%. Após pré-incubação por 10 minutos na temperatura 7 °C, adição de 25 µL de sangue aos tubos, eles foram fechados, homogeneizado, incubados por 30 minutos à mesma temperatura e centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. A lise dos eritrócitos foi acompanhada pela medida da absorbância em 540 nm ($A_{540 \text{ nm}}$) do sobrenadante em função da concentração salina.

Determinação da estabilidade de eritrócitos em solução de glicerol 1,5 mol.L⁻¹ contra estresse hipotônico

A uma série de baterias, em duplicata, de tubos de polietileno (Eppendorff®) contendo 1 mL de solução de NaCl em concentrações de 0,1 a 1,0% e glicerol a 1,5 mol.L⁻¹, pré-incubadas a 7 °C por 10 minutos, foram adicionadas alíquotas de 25 µL de sangue. Após homogeneização, os tubos eram incubados por 30 minutos e depois centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. Durante as incubações os tubos permaneciam fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes eram lidas em 540 nm contra um tubo controle contendo apenas água.

Determinação das curvas de transição de lise dos eritrócitos

A determinação das curvas foi realizada usando o aplicativo Origin 7.5 Professional (Microcal Inc., Massachusetts, EUA). A dependência de A_{540} com a concentração de etanol, em cada temperatura, foi ajustada por uma linha de regressão sigmoideal, dada pela equação de Boltzmann,

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(D - D_{50R})/dD}} + A_2 \quad (1),$$

em que A_1 e A_2 representam os valores mínimo e máximo de hemólise, D é a concentração do etanol, D_{50R} representa a concentração do etanol que causa 50% de hemólise e dD é a amplitude da transição sigmoideal entre A_1 e A_2 . A percentagem de hemólise em cada tubo de análise foi calculada usando a equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A_{540nm}}{A_2} \times 100\% \quad (2).$$

A dependência de A_{540} com a concentração de NaCl foi ajustada pela forma decrescente da equação de Boltzmann:

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(C - H_{50})/dC}} + A_2 \quad (3),$$

em que A_1 e A_2 representam os valores máximo e mínimo da A_{540} , C é a concentração de NaCl, H_{50} é a concentração de NaCl que causa 50% de hemólise e dC é a amplitude da transição sigmoideal entre A_1 e A_2 . A percentagem de hemólise em cada tubo de análise foi calculada usando a equação:

$$Hemólise (\%) = \frac{A_{540nm}}{A_t} \times 100\% \quad (4).$$

A dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos na ausência e na presença de glicerol 1,5 mol.L⁻¹ e a dependência da concentração de glicerol na estabilidade de eritrócitos também foram determinadas por ajuste não linear sigmoidal decrescente.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o aplicativo Origin 7.5 Professional (Microcal Inc., Massachusetts, EUA).

Cada análise de regressão somente foi considerada significativa quando P foi menor do que 0,05.

Os valores de **D**_{50R} foram comparados entre as diferentes temperaturas, na mesma temperatura na ausência e na presença de glicerol a 1,5 mol.L⁻¹ e na temperatura 7 °C nas várias concentrações de glicerol pelo teste de Tukey (P<0,05 indicando diferença significativa entre as médias).

A comparação dos valores de **H**₅₀ na ausência e na presença de glicerol foi realizada por ANOVA, com P<0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre as médias.

RESULTADOS

Todos os nossos resultados experimentais são decorrentes da incubação em tempo fixo (30 minutos) de eritrócitos humanos em soluções com diferentes concentrações salinas (estresse hipotônico) ou em soluções com diferentes concentrações de etanol em solução salina fisiológica, sob diferentes temperaturas (7, 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42 e 47 °C) ou concentrações de glicerol 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mol.L⁻¹).

A **Figura 3A** mostra um típico padrão de dependência obtido entre os valores de **A₅₄₀** e a concentração salina, para ilustrar como foram determinados os valores de **H₅₀**, que representa a concentração salina no ponto de meia-transição de lise dos eritrócitos.

A **Figura 3B** mostra um típico padrão de dependência obtido entre os valores de **A₅₄₀** e a concentração de etanol em solução salina fisiológica, para ilustrar como foram determinados os valores de **D_{50R}**, que representa a concentração de etanol no ponto de meia-transição de lise dos eritrócitos.

O efeito da temperatura sobre os valores de **D_{50R}** podem ser vistos na **Figura 4**, tanto na ausência quanto na presença de glicerol a 1,5 mol.L⁻¹. Um aumento progressivo na temperatura de 7 a 47 °C deslocou progressivamente para a esquerda as curvas de lise dos eritrócitos tanto na presença (**Figura 4A**) quanto na ausência de glicerol (**Figura 4B**).

Esse deslocamento determinou diminuições significantes (P<0,05) nos valores de **D_{50R}** com o aumento na temperatura tanto na ausência quanto na presença de glicerol a 1,5 mol.L⁻¹ (**Tabela 1**).

De fato, os valores de **D_{50R}** tanto na ausência quanto na presença de glicerol a 1,5 mol.L⁻¹ apresentaram declínios não-lineares com o aumento da temperatura (**Figura 5**).

A presença de glicerol a 1,5 mol.L⁻¹ determinou alterações evidentes nas curvas de lise dos eritrócitos em solução salina em todas as temperaturas estudadas (**Figura 6**), com alterações também nos valores de **D_{50R}** (**Tabela 1**). Entretanto, a natureza da alteração dependeu da temperatura usada. Os valores de **D_{50R}** diminuíram na presença do osmólito nas temperaturas mais baixas de nosso intervalo térmico (de 7 a 32 °C), mas aumentaram nas temperaturas

superiores, embora as diferenças entre os solventes tenham sido estatisticamente significantes somente a 7, 12, 17, 27 e 37 °C (**Tabela 1**).

Como a presença do osmólito apresentou um efeito importante sobre a natureza do efeito obtido, a lise dos eritrócitos por etanol em solução salina fisiológica foi também estudada na presença de diferentes concentrações de glicerol (0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mol.L⁻¹), na temperatura 7 °C (**Figura 7**). As alterações produzidas pelas diferentes concentrações do osmólito (**Figura 7**) estão associadas a alterações significantes nos valores de **D_{50R}** (**Tabela 2**). De fato, os valores de **D_{50R}** apresentaram um declínio sigmoidal significativo (P<0,05) com a concentração de glicerol (**Figura 8**).

A lise de eritrócitos por estresse hipotônico foi também avaliada na ausência e presença de glicerol a 1,5 mol.L⁻¹ e a 7 °C (**Figura 9**). Nesses experimentos, a estabilidade dos eritrócitos foi quantificada pelo valor na abscissa (**H₅₀**) do ponto de meia transição da sigmóide (**Figura 3A**). A presença de glicerol a 1,5 mol.L⁻¹ e a 7 °C causou uma diminuição estatisticamente significativa em **H₅₀** (**Tabela 3**).

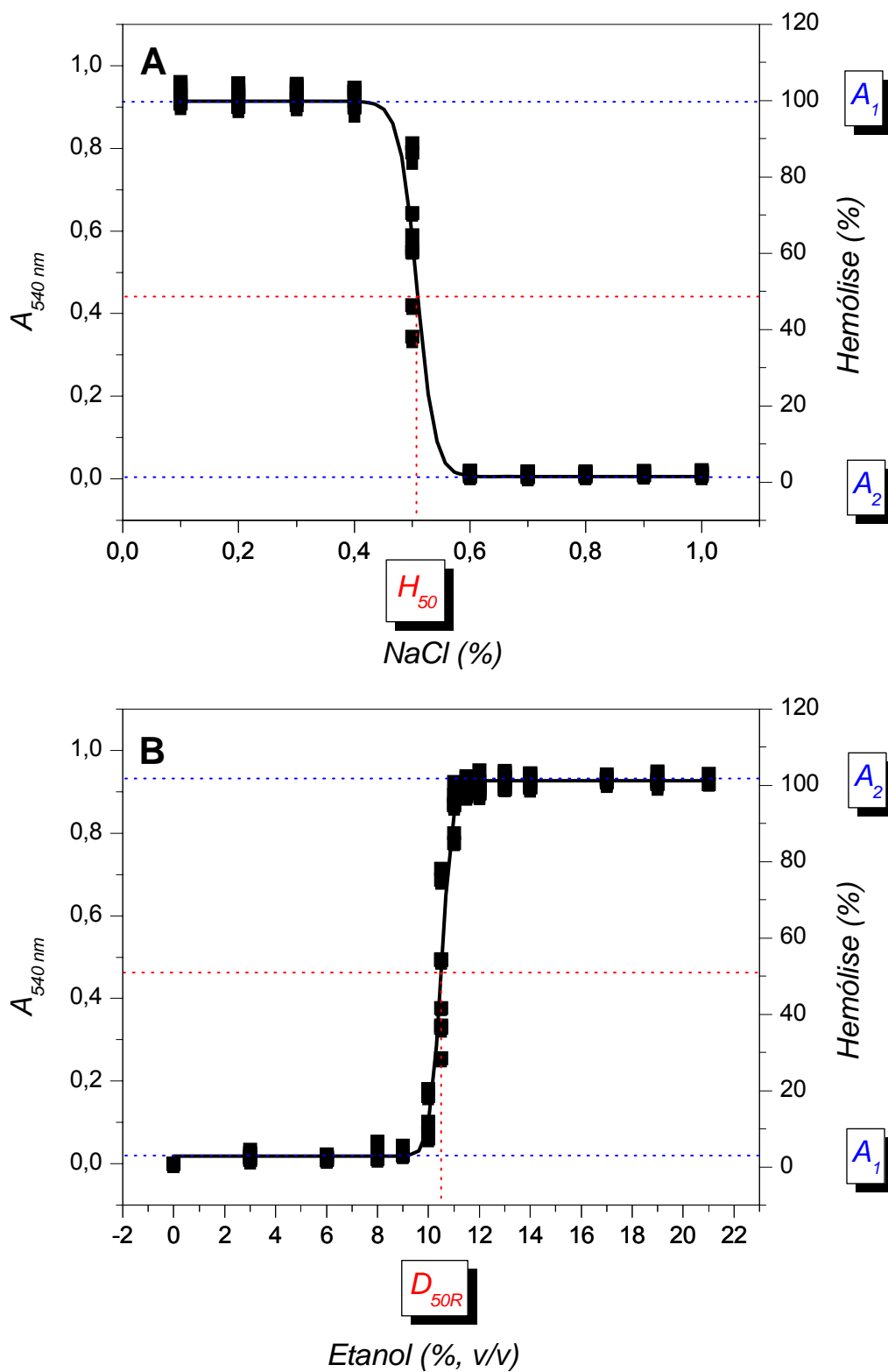


Figura 3. A. Lise de eritrócitos humanos por choque hipotônico. B. Lise de eritrócitos humanos por etanol.

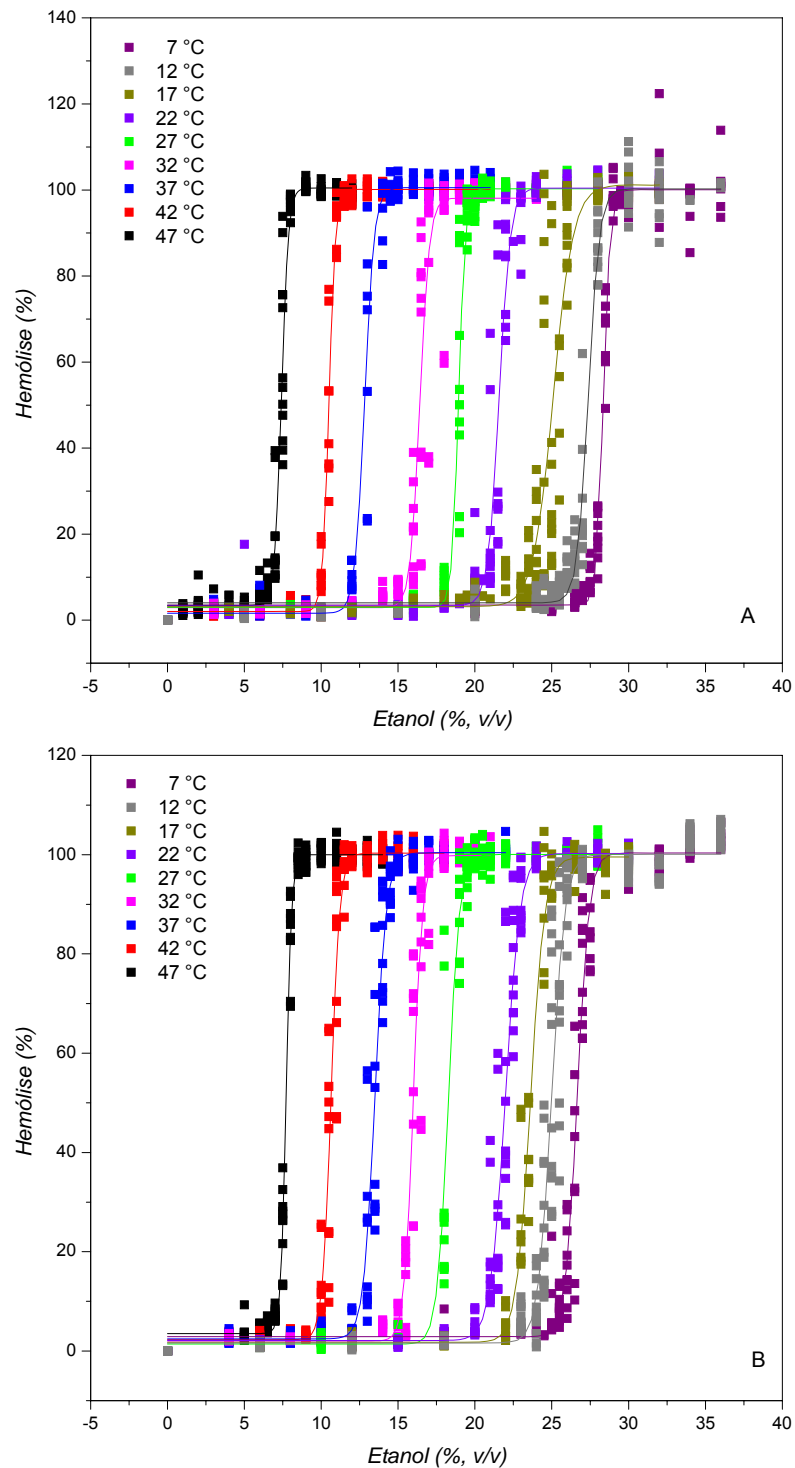


Figura 4. Efeito da temperatura sobre a curva de lise de eritrócitos humanos por etanol na presença (A) e ausência (B) de glicerol a 1,5 mol.L⁻¹. Condição experimental: em solução salina fisiológica.

Tabela 1. Efeito da temperatura e do glicerol sobre os valores de D_{50R} (média \pm desvio padrão) para a lise de eritrócitos humanos por etanol em solução salina.

Temperatura (°C)	Salina	Salina com glicerol a 1,5 mol. L⁻¹	P
07	28,35 \pm 0,09 (N = 9)	26,66 \pm 0,19 (N = 10)	a, b
12	27,37 \pm 0,19 (N = 12)	25,03 \pm 0,32 (N = 13)	a, b
17	24,92 \pm 0,63 (N = 13)	23,62 \pm 0,17 (N = 8)	a, b
22	21,55 \pm 0,41 (N = 10)	21,97 \pm 0,41 (N = 10)	a
27	18,90 \pm 0,27 (N = 10)	18,30 \pm 0,34 (N = 10)	a, b
32	16,57 \pm 0,56 (N = 10)	16,03 \pm 0,30 (N = 9)	a
37	12,85 \pm 0,39 (N = 8)	13,48 \pm 0,34 (N = 10)	a, b
42	10,50 \pm 0,15 (N = 8)	10,65 \pm 0,27 (N = 10)	a
47	7,41 \pm 0,19 (N = 11)	7,72 \pm 0,09 (N = 10)	a

^aP<0,05 indicando diferenças estatisticamente significantes entre as temperaturas num mesmo solvente (Teste de Tukey).

^bP<0,05 indicando diferenças estatisticamente significantes entre os solventes numa mesma temperatura (Teste de Tukey).

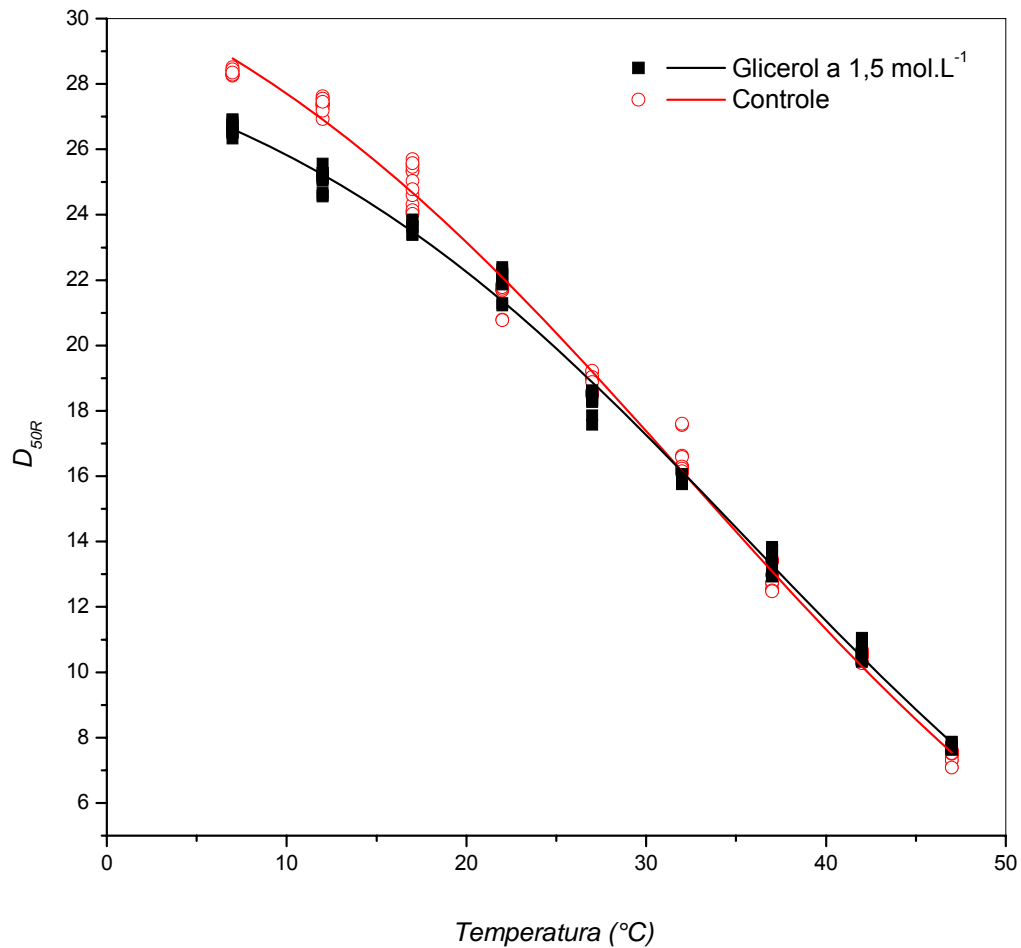


Figura 5. Efeito do glicerol ($1,5 \text{ mol.L}^{-1}$) sobre as linhas de dependência térmica da meia-transição de lise (D_{50R}) de eritrócitos humanos por etanol em solução salina. Em ambas as situações os dados foram ajustados a curvas de dependência sigmoideal ($P < 0,001$).

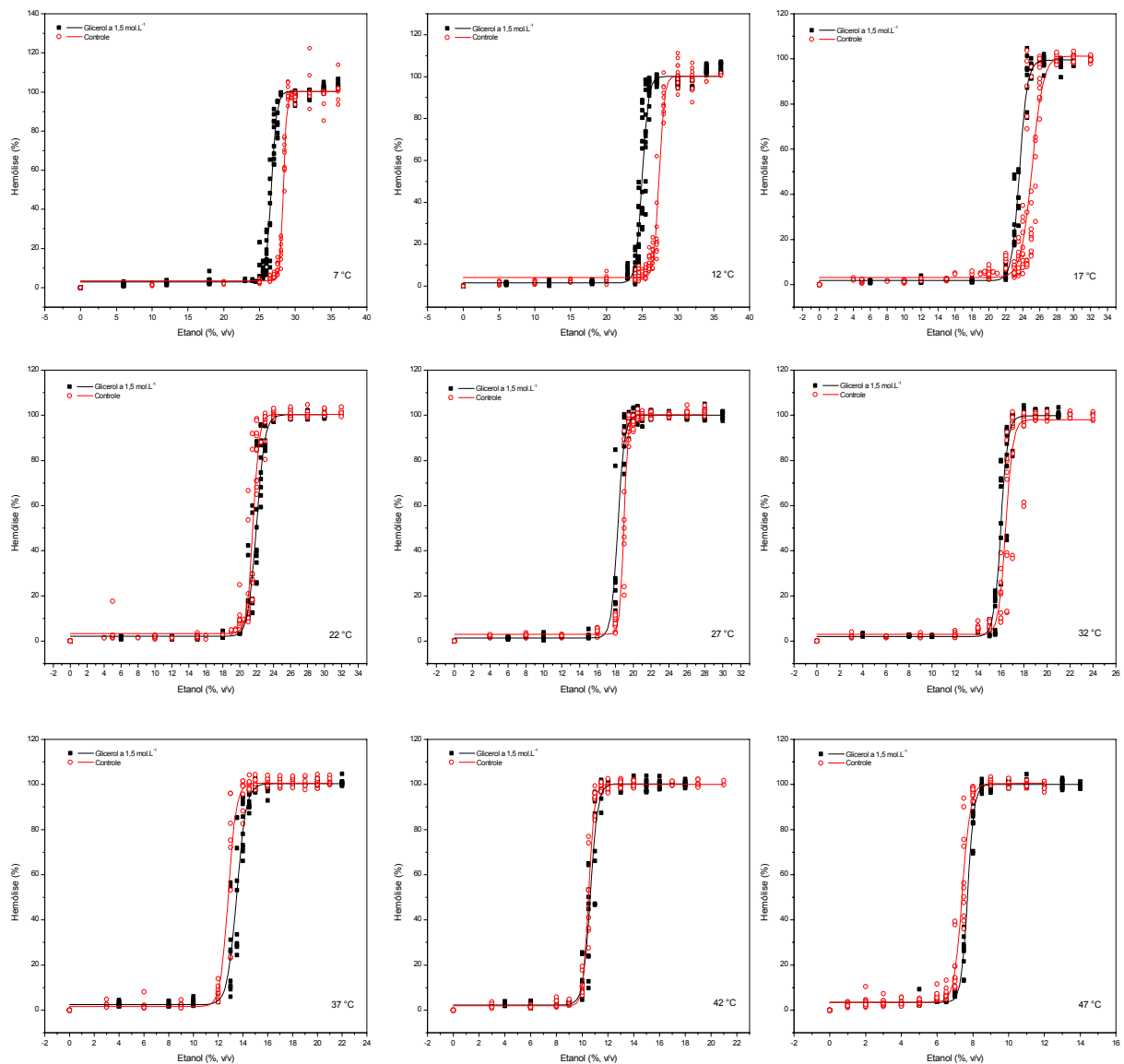


Figura 6. Efeito de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ sobre a curva de lise de eritrócitos humanos por etanol. Condições experimentais: em solução salina fisiológica, sob diferentes temperaturas (7, 12, 17, 22, 27, 32, 37, 42 e 47 °C) na ausência (○) e na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (■). Os dados de diferentes experimentos foram ajustados por uma única sigmóide em cada temperatura apenas a título de ilustração.

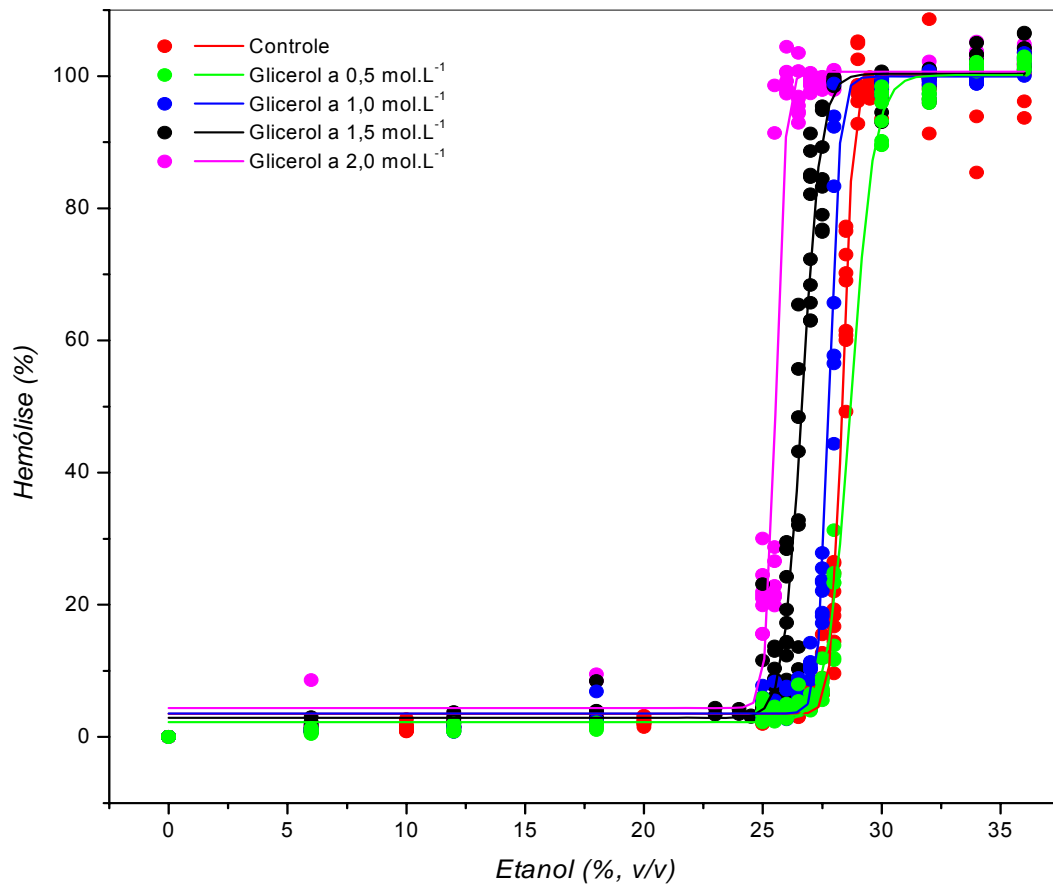


Figura 7. Efeito da concentração de glicerol sobre as curvas de lise de eritrócitos humanos por etanol. Condições experimentais: em solução salina fisiológica e a 7 °C. Os dados de diferentes experimentos foram ajustados por uma única sigmóide em cada concentração apenas a título de ilustração.

Tabela 2. Efeito da concentração de glicerol sobre os valores de D_{50R} para a lise de eritrócitos humanos por solução salina de etanol a 7 °C.

Glicerol (mol.L⁻¹)	D_{50R} (média ± desvio-padrão)	P
0	28,35 ± 0,09 (N = 9)	a
0,5	28,67 ± 0,30 (N = 8)	a
1,0	27,82 ± 0,16 (N = 8)	a
1,5	26,64 ± 0,19 (N = 9)	a
2,0	25,47 ± 0,21 (N = 8)	a

^aP<0,05 indicando diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações de glicerol (Teste de Tukey).

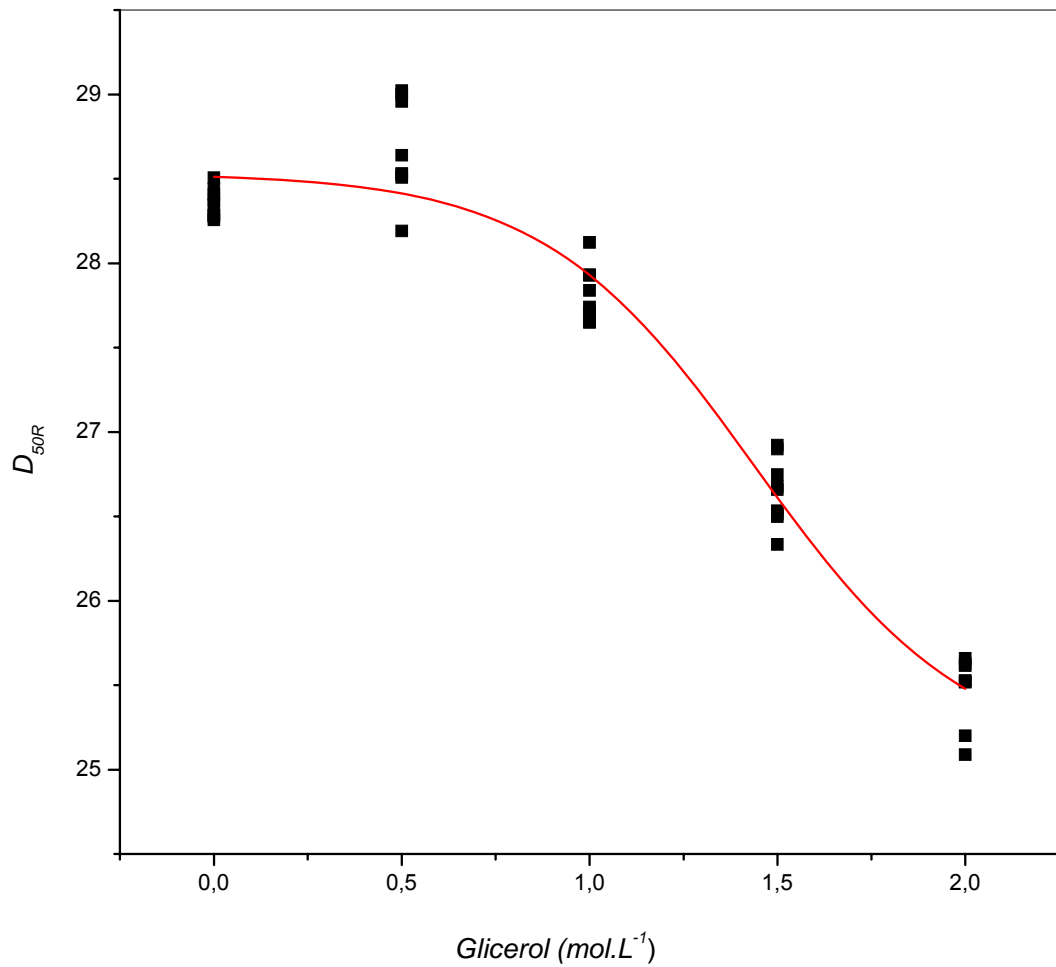


Figura 8. Dependência da meia-transição de lise (D_{50R}) de eritrócitos humanos por etanol com a concentração de glicerol ($P < 0,001$). Condições experimentais: em solução salina fisiológica e a 7 °C.

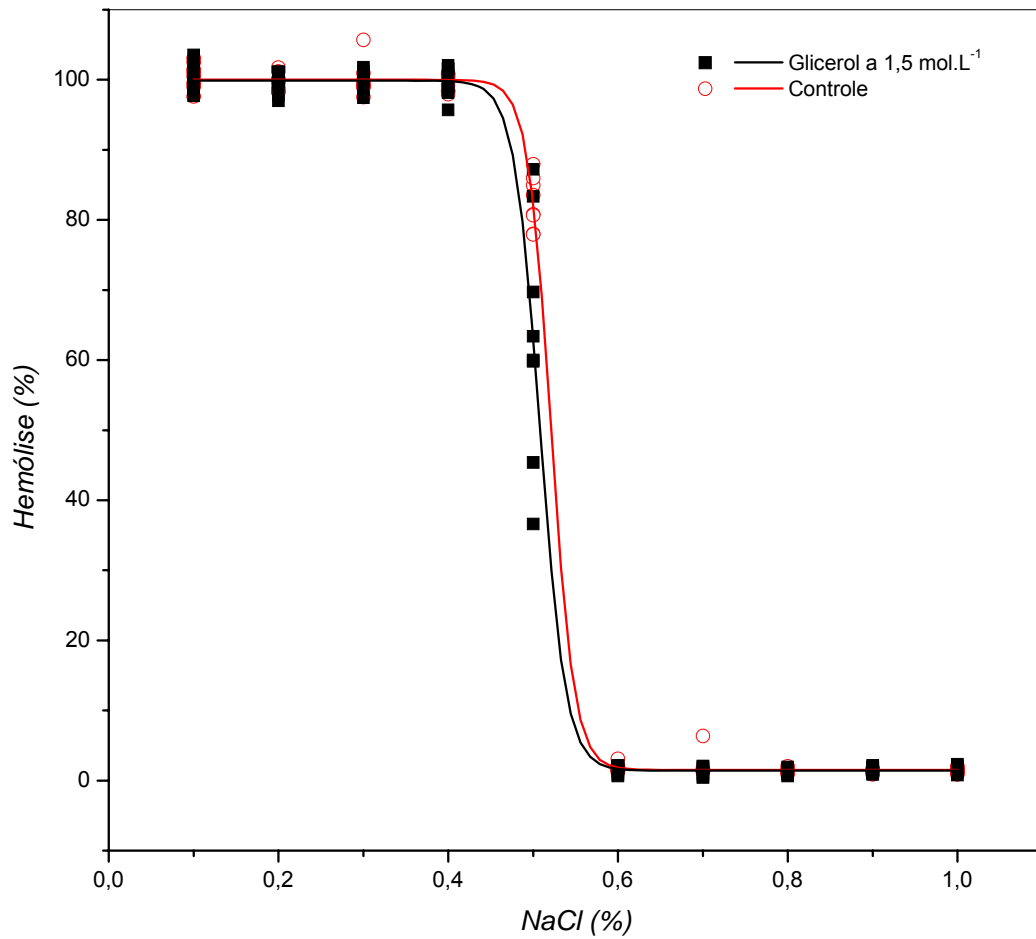


Figura 9. Efeito do glicerol sobre a lise de eritrócitos por estresse hipotônico a 7°C. Os dados foram ajustados por uma única sigmóide em cada situação apenas a título de ilustração.

Tabela 3. Efeito do glicerol sobre os valores de H_{50} (média \pm desvio padrão) para a lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico a 7 °C.

Controle	Glicerol a 1,5 mol.L ⁻¹	P
0,520 \pm 0,007 (N = 8)	0,506 \pm 0,013 (N = 8)	^a

^aP<0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre os solventes (ANOVA).

DISCUSSÃO

Os eritrócitos constituem um bom modelo de estudo da estabilidade de membranas, pois sua lise libera a proteína hidrossolúvel hemoglobina, que pode ser facilmente monitorada pela medida no sobrenadante da absorvância em 540 nm. Além disso, os eritrócitos são também relativamente de fácil acesso e obtidos com baixo custo.

Neste trabalho os valores de $A_{540\text{ nm}}$ foram convertidos em porcentagem de hemólise para melhor visualização e interpretação dos resultados.

Sob baixas concentrações de etanol e em solução salina, os eritrócitos permanecem íntegros no estado **R**, mas sofrem lise com o aumento na concentração de etanol (**Figura 2A**). A transição de lise do estado **R** ocorre numa estreita faixa de concentração de etanol, segundo uma curva de natureza sigmoidal (**Figura 2A**), característica de um processo cooperativo.

O etanol promove lise do estado **R** dos eritrócitos em todas as temperaturas (**Figura 4**). Como o etanol tem uma porção hidrofóbica não muito extensa (o grupo etil, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$), ligado a uma porção hidrofílica (o grupo hidroxila, -OH), ele é um agente anfifílico, capaz de se ligar a grupos apolares e à água ao mesmo tempo. Essa natureza estrutural faz com que a força hidrofóbica seja diminuída numa solução aquosa de etanol, o que tem um grande significado nos equilíbrios estruturais de complexos biológicos como proteínas, membranas e cromossomos. Essa atenuação da força hidrofóbica acarreta em diminuição da estabilidade dos complexos biológicos e é exatamente isso que permite a caracterização do etanol como um agente caotrópico [TANFORD, 1970; FONSECA *et al.*, 2006].

Por outro lado, o etanol também aumenta a osmolaridade do meio, o que está associado a um segundo tipo de efeito do etanol, a osmoestabilização de complexos biológicos, efeito que passa a ter importância nos equilíbrios morfológicos de eritrócitos (**Figura 2B**) somente em concentrações mais elevadas de etanol [GOUVÊA-e-SILVA, 2006; REIS, 2007]. Esta ação do etanol é que estaria promovendo a ativação da rota 2 (**Figura 1**).

O calor também é um agente caotrópico que aumenta a energia vibracional dos grupos químicos de um complexo biológico, de tal forma a diminuir a

intensidade das forças que estabilizam sua estrutura (TANFORD, 1970; FONSECA *et al.*, 2006; BETZ *et al.*, 2007).

À medida que a temperatura aumenta há um deslocamento progressivo da curva de lise dos eritrócitos para a esquerda, tanto em solução salina (controle) quanto em solução salina de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (**Figura 4**). Isso é concordante com a diminuição dos valores de D_{50R} observada com o aumento na temperatura em ambos os solventes (**Tabela 1**). Essa dependência negativa é não-linear e foi mais bem ajustada por uma sigmóide (**Figura 5**). A natureza sigmoideal dessa curva significa que o calor inicialmente acelera a ação caotrópica do etanol (região intermediária da sigmóide), mas depois a desacelera (segundo platô da sigmóide). Isso deve significar que o calor está induzindo alguma alteração, provavelmente na estrutura do eritrócito, que é responsável pela aceleração seguida de desaceleração na ação caotrópica do etanol.

O significado físico dessa ação do calor seria a existência de uma conversão de estados nos eritrócitos. A ação sinérgica entre o etanol e os valores intermediários de temperatura de nosso intervalo (região intermediária da sigmóide da **Figura 5**) contribui para exacerbação da lise do que seria o estado **R** dos eritrócitos (rota 1 da **Figura 1**). Mas nos valores superiores de temperatura do nosso intervalo (segundo platô da sigmóide da **Figura 5**), a ação sinérgica entre o etanol e o calor contribui para diminuição da lise do estado **R** devida à conversão dos eritrócitos do estado **R** no estado **T** (rota 2 da **Figura 1**).

Realmente, a ativação dessa rota 2 (**Figura 1**) é favorecida pelo aumento na pressão osmótica produzido por aumento na temperatura, uma vez que o aumento na temperatura foi associado a uma diminuição dos valores de S_{50T} [REIS, 2007].

Se isso é verdadeiro, a incorporação de um osmólito ao meio também ativaria a formação do estado **T** dos eritrócitos.

Também na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$, a dependência de D_{50R} com a temperatura foi negativa, não-linear e melhor ajustada por uma sigmóide (**Figura 5**). Sob os valores intermediários de temperatura de nosso intervalo, a temperatura também acelerou a lise do que seria o estado **R** dos eritrócitos (região intermediária da sigmóide). Mas sob os valores superiores de temperatura, o aumento na temperatura desacelerou a lise dos eritrócitos

(segundo platô da sigmóide), ativando a rota 2 (**Figura 1**).

Mas houve uma diferença entre a curva de dependência térmica dos eritrócitos em solução salina contendo glicerol em relação à curva em solução salina.

A adição de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ao sistema promoveu efeitos antagônicos sobre a estabilidade de eritrócitos dependendo da temperatura (**Figura 5**). Abaixo de $32 \text{ }^\circ\text{C}$, o glicerol potencializou o efeito caotrópico do etanol, mas acima de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ele agiu de forma antagônica, promovendo estabilização do eritrócito (**Figura 5**).

A explicação para esses efeitos antagônicos estaria na conjunção das ações do etanol, do glicerol e da temperatura.

Abaixo de $32 \text{ }^\circ\text{C}$, a conjunção de ações do sistema etanol, temperatura e glicerol promoveu exacerbação da ação caotrópica do etanol, embora essa ação caotrópica tenha declinado com o aumento na temperatura na presença de solução salina de glicerol em relação ao controle (**Figura 5**).

Acima de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a conjunção de ações do sistema etanol, temperatura e glicerol promove estabilização do eritrócito.

Em qualquer situação, o etanol é também um osmólito e o aumento da temperatura aumenta a pressão osmótica, que contribui para a osmoestabilização do eritrócito. É por isso que sob concentrações mais elevadas de etanol e maiores valores de temperatura (**Figura 2**) há estabilização dos eritrócitos [GOUVÊA-E-SILVA, 2006; REIS, 2007].

Com um aumento na temperatura, o sistema atinge um valor crítico de pressão osmótica que deslocaria o equilíbrio do estado **R** para o estado **T** (rota 2 da **Figura 1**). A incorporação de um outro osmólito como glicerol ou sorbitol irá fazer o sistema atingir esse valor crítico de pressão osmótica a um menor valor de concentração de etanol, o que levaria a uma diminuição significativa em S_{50T} tanto pelo glicerol quanto pelo sorbitol, como de fato ocorre [REIS, 2007].

Se esse tipo de efeito ilustrado na **Figura 5** é gerado pela conjunção das ações do etanol, da temperatura e do glicerol sobre a pressão osmótica, a dependência de D_{50R} com a concentração do osmólito deveria também exibir uma natureza cooperativa. De fato, a dependência de D_{50R} com a concentração de glicerol, a uma única temperatura e em solução salina fisiológica, apresentou uma

natureza não-linear e foi mais bem ajustada por uma curva de natureza sigmoideal. As concentrações intermediárias de glicerol da curva ativam a lise dos eritrócitos, enquanto as concentrações superiores a desativam (**Figura 8**).

Isso indica que a elevação na concentração de glicerol é também um fator promotor da desativação da rota 1 e ativação da rota 2 (**Figura 1**).

Esse efeito seria na realidade decorrente da conjunção das ações do etanol, temperatura e glicerol.

Entretanto, cada um desses agentes pode ter ações individuais específicas no sistema.

Esse é o caso do etanol, que em qualquer situação está agindo como um caotrópico e um osmoestabilizador.

É também o caso da temperatura, que em qualquer situação está agindo como caotrópico, mas também como um agente promotor de osmoestabilização por elevação na pressão osmótica.

Mas esse não seria o caso do glicerol, que em solução salina não promove lise de eritrócitos na ausência de etanol no intervalo de concentração utilizado [FINOTTI, 2006]. Entretanto, o glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ em solução salina potencializa a ação caotrópica do etanol nas temperaturas mais baixas do intervalo térmico estudado (**Figura 6**). Esse efeito também foi observado quando tanto o glicerol [FINOTTI, 2006] quanto o sorbitol [BERNARDINO NETO, 2006] foram utilizados a 1 mol.L^{-1} .

Qual seria a origem da ação sinérgica do osmólito na promoção de lise dos eritrócitos por etanol?

A resposta para esta questão deve estar na natureza sigmoideal da curva de dependência de D_{50R} com a concentração de glicerol (**Figura 8**). As concentrações mais baixas de glicerol estão estabilizando o estado **R**, enquanto as concentrações mais altas de glicerol estão estabilizando o estado **T** dos eritrócitos.

A estabilização do estado **R** nas concentrações mais baixas de glicerol vai favorecer a ação caotrópica do etanol sobre esse estado, uma vez que ele é um estado de menor estabilidade em relação ao estado **T**.

Essa estabilização do estado **R** dos eritrócitos pelo glicerol favorece a rota 1 (Figura 1), que representa a lise do estado **R** pela ação caotrópica do etanol.

Por outro lado, ela também justifica a estabilização dos eritrócitos observada em função da hipotonicidade do meio a 7 °C (**Figura 9**). Enquanto o etanol promove lise pela sua capacidade de interagir diretamente com grupamentos apolares da bicamada lipídica [CHI e WU, 1991; ZAVODNIK, PILETSKAIA e STEPURO, 1994; BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996], a hipotonicidade promove lise por favorecer a entrada de água associada a aumento de volume do eritrócito [JAIN, 1973; JAIN, 1986]. A pressão osmótica gerada pela presença somente do glicerol a 1,5 mol.L⁻¹, na ausência de etanol e a uma baixa temperatura (7 °C) deve prevenir a entrada de água e ruptura do eritrócito.

Considerações finais

A osmoestabilização celular tem sido utilizada desde que Polge, Smith e Parkes [1949] descobriram que a adição de glicerol a uma amostra de espermatozóides aumentava o número de espermatozóides viáveis após criopreservação.

Em nossos resultados, a estabilidade do estado **R** dos eritrócitos contra etanol diminui com a incorporação de glicerol à solução quanto mais baixa é a temperatura até 7 °C. A esta temperatura o glicerol protege os eritrócitos contra choque hipotônico. Nosso trabalho não atende às condições ideais para criopreservação de células, onde a proteção está relacionada com a capacidade do glicerol em reduzir a quantidade de água intracelular, minimizando os danos causados pelo congelamento, mas também pela sua capacidade de reduzir o ponto de congelamento do solvente. Uma discussão ampla das ações benéfica e tóxica do glicerol na criopreservação celular envolve questões de natureza cinética [MAZUR, LEIBO e MILLER, 1973; MAZUR e MILLER, 1975; MAZUR e ARMITAGE, 1984; DE LOECKER *et al.*, 1993; MORRIS *et al.*, 2006), que não avaliamos neste trabalho.

O mérito de nosso trabalho está na avaliação dos efeitos do glicerol em temperaturas mais elevadas, o que faz bastante sentido em contextos fisiológicos, como o tratamento de quadros de edema cerebral [BERGER *et al.*, 2005; SAKAMAKI *et al.*, 2003], a necessidade de preservação da vida diante do aquecimento global e a própria necessidade de aumento na longevidade diante

da diminuição do número de nascimentos [DEOCARIS *et al.*, 2006]. Nosso estudo também está inserido no contexto da biotecnologia.

CONCLUSÕES

Os valores de D_{50R} diminuíram com o aumento da temperatura na ausência e na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ segundo curvas de natureza sigmoideal. Isso sugere que o aumento na temperatura induz uma transição em dois estados no padrão de estabilidade dos eritrócitos, um estado de menor estabilidade (**R**) e um estado de maior estabilidade (**T**).

Os valores de D_{50R} também declinaram com o aumento na concentração de glicerol segundo uma curva de natureza sigmoideal. Isso sugere que a concentração de glicerol também induz uma transição de estados nos eritrócitos, de um estado de menor estabilidade (**R**), presente sob menores concentrações de glicerol, para um estado de maior estabilidade (**T**), presente sob maiores concentrações de glicerol.

A presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ diminui progressivamente a estabilidade dos eritrócitos com a diminuição da temperatura entre 32 e $7 \text{ }^\circ\text{C}$, mas aumenta a estabilidade dos eritrócitos acima de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Esse comportamento deve-se à existência de uma pressão osmótica crítica gerada pela ação conjunta do etanol, do glicerol e da temperatura. Abaixo dessa pressão osmótica crítica haveria predomínio do estado **R** e acima dela haveria predomínio do estado **T** dos eritrócitos.

Embora a presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ diminua a estabilidade dos eritrócitos contra a ação do etanol, ela aumenta a estabilidade contra a lise por hipotonicidade, a $7 \text{ }^\circ\text{C}$, uma vez que os valores de H_{50} foram significativamente menores na presença de glicerol a $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$ do que na ausência desse osmólito. Nessa temperatura, a conjunção das ações do etanol, da temperatura e do glicerol determinaria o predomínio do estado **R** dos eritrócitos, que tem uma menor estabilidade e sofre mais facilmente a ação caotrópica do etanol. Entretanto, na ausência do etanol, a presença do glicerol determinaria uma menor entrada de água nos eritrócitos, o que tornaria mais difícil sua lise por hipotonicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVERSI-FERREIRA, T.A. **Efeitos pós-natais do etanol sobre o desenvolvimento do neocórtex de ratos Wistar**. Uberlândia, 2004. 70f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

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, p. 73-80, 1996.

BERGER, C.; SAKOWITZ, O.W.; KIENING, K.L.; SCHWAB, S. Neurochemical monitoring of glycerol therapy in patients with ischemic brain edema. **Stroke**, v. 36, p. e4-e6, 2005.

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).

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.

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, p. 955-963, 2001.

BOROWITZA, 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.

BOUTRON, P.; ARNAUD, F. Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. **Cryobiology**, v. 21, p. 348-358, 1984.

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.

CASTRONUOVO, G.; ELIA, V.; POSTIGLIONE, C.; VELLECA, F. Interactions of aminoacids in concentrated aqueous solutions of urea or ethanol. Implications for the mechanism of protein denaturation. **Thermochimica Acta**, v. 339, p. 11-19, 1999.

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.

DE LOECKER, R.; GOSENS, W.; VAN DUPPEN, V.; VERWILGHEN, R.; DE LOECKER, W. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. **Cryobiology**, v. 30, p.279-285, 1993.

DEOCARIS, C.C.; SHRESTHA, B.G.; KRAFT, D.C.; YAMASAKI, K.; KAUL, S.C.; RATTAN, S.I.S.; WADHWA, R. Geroprotection by glicerol: Insights to its mechanisms and clinical potentials. **Annals New York Academy Sciences**, n. 1067, p. 488-492, 2006.

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).

FONSECA, L. C., CORRÊA, N.C.R, GARROTE-FILHO, M.S., CUNHA, C.C., PENHA-SILVA, N. Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous Solutions. **Química Nova**, v. 29, p. 543-548, 2006.

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

JAIN, N.C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian**, v. 63, p. 411-423, 1973.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinarian hematology**. 4^a ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221p.

LANG, F.; BUSCH, G.L.; RITTER, M.; VÖLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HÄUSSINGER, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 247-306, 1998.

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, p. 343-348, 1994.

MAZUR, P.; ARMITAGE, W.J. Toxic and osmotic effects of glycerol on human granulocytes. **The American Journal of Physiology**, v. 247, p. C382-C389, 1984.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; MILLER, R.H. Permeability of the bobine red cell to glycerol in hyperosmotic solutions at various temperatures. **The Journal of Membrane Biology**, v.15, p. 107-136, 1973.

MAZUR, P.; MILLER, R.H. Permeability of the human erythrocyte to glycerol in 1 and 2 M solutions at 0 or 20 °C. **Cryobiology**, v. 13, n. 5, p. 507-522, 1976.

MORRIS, G.J.; GOODRICH, M.; ACTON, E.; FONSECA, F. The high viscosity encountered during freezing in glicerol solutions: effects on cryopreservation. **Cryobiology**, v. 52, n. 3, p. 323-334, 2006.

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

NOZAKI, Y.; TANFORD C. The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 7, p. 2211-2217, 1971.

PELLERIN-MENDES, C.; MILLION, L.; MARCHAND-ARVIER, M.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. In vitro study of the effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 35, p. 173-186, 1997.

PERK, K.; FREI, Y.F.; HERTZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v. 25, p. 1241-1248, 1964.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

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

REIS, F.G.F. **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) - Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2007. Nilson Penha-Silva (Orientador).

SAKAMAKI, M.; IGARASHI, H.; NISHIYAMA, Y.; HAGIWARA, H.; ANDO, J.; CHISHIKI, T.; CURRAN, B.C.; KATAYAMA, Y. Effect of glycerol on ischemic cerebral edema assessed by magnetic resonance imaging. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 209, p. 69-74, 2003.

SANTORO, M.M.; LIU, Y.; KHAN, S.M.A.; HOU, L.X.; BOLEN, D.W. Increase thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**, v. 31, p. 5278-5283, 1992.

SCOTT, K.L.; LECAK, J.; ACKER, J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 19, p. 127-142, 2005.

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

TIMASHEFF, S.N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. **Advances in Protein Chemistry**, v. 51, p. 355-433, 1998.

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.

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.

WANG, A.; ROBERTSON, A.D.; BOLEN, D.W. Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A. **Biochemistry**, v. 34, n. 46, p. 15096-15104, 1995.

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

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.

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