

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

**DEPENDÊNCIA TÉRMICA DA OSMOESTABILIZAÇÃO
DE ERITRÓCITOS POR GLICEROL**

Estudante: **Ciciliane Junqueira Finotti**

UBERLÂNDIA, MG

2006

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

**DEPENDÊNCIA TÉRMICA DA OSMOESTABILIZAÇÃO
DE ERITRÓCITOS POR GLICEROL**

Estudante: Ciciliane Junqueira Finotti

Orientador: Dr. Nilson Penha-Silva

UBERLÂNDIA, MG

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU - Setor de Catalogação e Classificação

F515d Finotti, Ciciliane Junqueira, 1977-
Dependência térmica da osmoestabilização de eritrócitos por glicerol /
Ciciliane Junqueira Finotti - Uberlândia, 2006.
59 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. 3. Álcool - Teses.
4. Glicerina - Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III.
Título.

CDU: 576.314

Unitermos: Glicerol, eritrócitos, estabilidade de membranas, etanol, termodinâmica biológica

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

**DEPENDÊNCIA TÉRMICA DA OSMOESTABILIZAÇÃO
DE ERITRÓCITOS POR GLICEROL**

Estudante: **Ciciliane Junqueira Finotti**

Orientador: **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

2006

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

**DEPENDÊNCIA TÉRMICA DA OSMOESTABILIZAÇÃO
DE ERITRÓCITOS POR GLICEROL**

ESTUDANTE: **Ciciliane Junqueira Finotti**

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Examinador: Professor Dr. **Ana Graci Brito Madurro**

Examinador: Professor Dr. **Lutero Carmo de Lima**

DATA DE DEFESA: 21/02/2006

As sugestões da comissão examinadora e as normas da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica para o formato da dissertação foram contempladas.

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

DEDICATÓRIA

Ao meu orientador de mestrado,
Professor Dr. Nilson Penha Silva.

Aos meus tios,
Aziz Jorge Eloy
e Maria Magnólia Melo Junqueira Eloy.

Aos meus pais,
César Finotti Neto
e Denise Melo Junqueira.

Aos meus avós
Adilon Vilela Junqueira (*in memoriam*)
e Irene Augusta Melo Junqueira

Ao meu filho,
Pedro Junqueira Rodrigues.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Nilson Penha Silva, com carinho e admiração, eu agradeço pela carinhosa atenção, pela bondosa paciência, pela autêntica humildade, pela grandiosa inteligência e, sobretudo, pelos sábios ensinamentos, que me deram a oportunidade de ultrapassar mais uma das barreiras de minha formação acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, Cleine Chagas da Cunha, Leticia Ramos de Arvelos e Mário da Silva Garrote Filho, pelo apoio, boa vontade e companheirismo com que sempre me trataram e pela valiosa colaboração para a realização deste trabalho.

À minha mãe Denise Melo Junqueira, pelo amor e desvelo com que sempre cuidou do meu filho querido, Pedro Junqueira Rodrigues, durante todo tempo de minha formação. Mãe, sem você esta realização em minha vida não teria sido possível.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.....	vii
Estrutura e estabilidade de membranas biológicas.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Introdução.....	4
Importância biológica.....	4
Estrutura geral das membranas biológicas.....	4
Os eritrócitos como modelo de estudo de membranas.....	5
Estabilidade de eritrócitos.....	6
Estabilização osmótica de membranas.....	7
Estabilização osmótica de proteínas.....	7
Efeito da temperatura sobre a estabilidade de proteínas.....	9
Considerações finais.....	9
Referências.....	10
Efeito do glicerol sobre a lise <i>in vitro</i> de eritrócitos humanos por etanol entre 27 e 47 °C.....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	17
Introdução.....	19
Material e métodos.....	21
Resultados.....	24
Discussão.....	36
Conclusões.....	48
Referências.....	49

ABREVIATURAS

- dD Amplitude da transição de desnaturação
- D₅₀ Concentração do desnaturante que produz 50% de hemólise
- D Desnaturante
- T Estado compactado dos eritrócitos
- R Estado expandido dos eritrócitos
- a₁ Percentagem de hemólise antes da transição de desnaturação dos eritrócitos
- a₂ Percentagem de hemólise depois da transição de desnaturação dos eritrócitos
- T Temperatura absoluta, dada em Kelvin

REVISÃO DA LITERATURA

**ESTRUTURA E ESTABILIDADE
DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

RESUMO

ESTRUTURA E ESTABILIDADE DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Estudante: Ciciliane Junqueira Finotti

Orientador: Nilson Penha-Silva

Os complexos organizacionais biológicos, que compreendem proteínas, membranas, cromossomos, organelas, células e tecidos, têm que manter sua estabilidade contra a ação deletéria de fatores como variações na temperatura, pH e concentração de solutos. Dentre os mecanismos protetores está a estabilização pela ação de solutos que primariamente geralmente chamados de osmólitos. Nosso objetivo aqui é entender a origem dessa ação estabilizadora. Assim, nós procuramos dar ênfase aos aspectos estruturais das membranas que poderiam constituir um alvo da ação osmoestabilizadora de solutos cosmotrópicos. Como essa ação tem sido mais profundamente estudada em termos da estabilização de proteínas, nós também apresentamos a teoria mais largamente comentada sobre a estabilização de proteínas por osmólitos. Acreditamos que os mesmos paradigmas termodinâmicos utilizados no estudo da ação de osmólitos sobre proteínas também possam trazer respostas satisfatórias a respeito da natureza íntima da osmoestabilização de membranas biológicas.

DESCRITORES: eritrócitos, estabilidade de membranas, osmólitos.

ABSTRACT

STRUCTURE AND STABILITY OF BIOLOGICAL MEMBRANES

Student: Ciciliane Junqueira Finotti

Advisor: Nilson Penha-Silva

The biological organization complexes, which comprise proteins, membranes, chromosomes, organelles, cells and tissues, have to keep their stabilities against the deleterious action of factors as variations in temperature, pH and concentration of solutes. Among the protective mechanisms is the stabilization promoted by the action of solutes generally called as osmolytes. Our aim here is understand the origin of such stabilizing action. Thus, we tried to give emphasis in the structural aspects of the membranes that could constitute a target of the osmostabilizing action of the cosmotropic solutes. Since this action has been more profoundly studied in terms of the stabilization of proteins, we also presented the theory more largely commented about the protein stabilization by osmolytes. We believe that the same thermodynamic paradigms used in the study of the action of osmolytes on proteins would bring satisfactory answers about the intimate nature of the osmostabilization of membranes.

KEY WORDS: erythrocytes, stability of membranes, osmolytes.

INTRODUÇÃO

Esta revisão bibliográfica procura explorar o tema da regulação de membranas pelo efeito da pressão osmótica. Muitos organismos vivos produzem e armazenam solutos osmoestabilizadores, comumente chamados de osmólitos, com a função de manter a estabilidade de seus complexos organizacionais, como proteínas, cromossomos, membranas, organelas, células e tecidos. A racionalidade mecânica desse processo tem sido mais profundamente discutida para a estabilização de proteínas. Mas nosso intuito aqui é tentar entender o mecanismo da osmoestabilização de membranas. É dentro dessa perspectiva que começamos discutindo um pouco sobre a estrutura e função das membranas biológica para então partirmos para a discussão sobre a estabilidade de membranas.

IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

As membranas citoplasmáticas definem as fronteiras das células e constituem o local de contato, comunicação e intercâmbio entre elas, o que exige composições químicas especializadas para as diferentes funções que as células apresentam. Dentro das células, membranas biológicas definem os diferentes tipos de compartimentos intracelulares e obviamente o contato, comunicação e intercâmbio intracelular, o que exige igualmente uma composição química especializada no exercício das funções de cada compartimento intracelular.

Essas funções vão desde sistemas especializados na transmissão de sinais hormonais, no transporte de combustíveis, água, eletrólitos e diversos metabólitos, passando por sistemas de conversão da energia metabólica em ATP e chegando até ao processamento da informação genética (Laffan e Firshein, 1987; Kornacki e Firshein, 1996; Kusano et al., 1984).

ESTRUTURA GERAL DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Os maiores componentes das membranas são lipídios e proteínas (Danielli e Davson, 1935). Os carboidratos podem constituir cerca de 10% do conteúdo total das membranas, mas invariavelmente sob a forma de glicoconjugados, com lipídios ou proteínas. A composição percentual relativa em proteínas e lipídeos é muito variável. As proteínas representam cerca de 20% do peso seco da bainha

de mielina e cerca de 80% da membrana mitocondrial (White,1973; Devaux e Seigneurit,1985). Evidentemente, então, os lipídios representam cerca de 20% do peso seco da membrana mitocondrial e cerca de 80% do peso seco da bainha de mielina. Essa composição da membrana determina sua densidade, de tal forma que a membrana mitocondrial é evidentemente muito mais densa do que a bainha de mielina.

A natureza estrutural dos lipídios que compõem uma membrana é muito diversificada, mas são todos eles de natureza anfifílica. A maior parte desses lipídios são fosfolipídios, anfifílicos bicaudados com forma cilíndrica que formam a bicamada da matriz lipídica com que as proteínas se associam (Cribier, Morrot e Zachowsk, 1993). As caudas hidrofóbicas se orientam no interior anidro da bicamada, enquanto a cabeça polar constituída pelo grupo fosfato se orienta no sentido da superfície externa numa bicamada e no sentido da superfície interna na outra bicamada.

A composição lipídica das membranas biológicas é controlada, por mecanismos ainda desconhecidos, com uma exigência mínima de preservação do arranjo em dupla camada no estado fluido. Muitos organismos, como a *Escherichia coli*, são capazes de alterar a composição lipídica de sua membrana em respostas as alterações de temperatura e pressão em seu ambiente. Quando essa bactéria cresce em baixas temperaturas, o teor de ácidos graxos insaturados os fosfolipídios de sua membrana sofre uma diminuição para manter a fluidez necessária para garantir o exercício das funções específicas da membrana (Rock e Cronan,1985). Esse mecanismo tem sido designado na literatura de **adaptação homeoviscosa**.

OS ERITRÓCITOS COMO MODELO DE ESTUDO DE MEMBRANAS

Os eritrócitos constituem um modelo muito conveniente para estudo do comportamento das membranas biológicas, particularmente de sua estabilidade, porque eles são fáceis de obter, a um custo muito baixo, no momento de sua utilização, e sua lise permite uma monitoração espectrofotométrica simples na região do visível, em função da liberação do pigmento natural solúvel, hemoglobina, no solvente (Nelson e Cox, 2000; Moeckel et al., 2002).

A membrana plasmática do eritrócito possui 20 proteínas proeminentes e outras secundárias, muitas das quais são transportadoras de solutos (Storry, 2004). As principais proteínas são band 3, glicoforina, espectrina e gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. Os lipídeos mais abundantes são fosfatidilcolina (25%), fosfatidiletanolamina (22%), fosfatidilserina (10%), esfingomielina (18%) e colesterol (25%), como descrito na literatura (Devaux e Seigneurit, 1985).

ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS

Os eritrócitos podem sofrer lise *in vivo* em resposta a aumentos no estresse oxidativo, velocidade do fluxo sanguíneo, temperatura, acidez, atrito contra a parede dos vasos sanguíneos e concentração de solutos como o etanol. O etanol age diretamente sobre a membrana do eritrócito (Tyulina et al.; 2004). Apesar de baixas concentrações de etanol proteger os eritrócitos contra lise hipotônica (Chi e Wu, 1991), alguns de seus derivados metabólicos podem promover lise celular (Tyulina et al.; 2000).

Em ratos, o etanol aumenta a produção de metabólitos reativos do oxigênio (ROM), principais responsáveis pela degradação celular associada ao estresse e ganho de idade (Kretzschmar et al.; 1991), e acelera a peroxidação de lipídeos das membranas de eritrócitos e hepatócitos (Senthilkumar, Sengottuvelan e Naline, 2004), aumentando a permeabilidade da membrana, produzindo lise e até mesmo morte celular (Koska et al.; 2000). A peroxidação lipídica desencadeada pelo etanol afeta principalmente os ácidos graxos polinsaturados, mas também o colesterol, (Adachi et al., 2003), cujos produtos da peroxidação aumentam a apoptose em células musculares lisas (Lizard et al.; 1999).

Em eritrócitos de ratos, há diminuição na fluidez de membrana (Lindi, Montorfano e Marciani, 1998) e um aumento na fragilidade osmótica (Araki e Rifkind, 1981; Chan, Godin e Sutter, 1983), associada ao abuso crônico de etanol, além de uma diminuição nos níveis da superóxido dismutase, glutathione, glutathione-redutase e glutathione peroxidase, em resposta ao abuso agudo do etanol (Sozmen et al.; 1994; Senthilkumar, Sengottuvelan e Nalini, 2004).

ESTABILIZAÇÃO OSMÓTICA DE MEMBRANAS

A capacidade de incorporar diferentes tipos de ácidos graxos na membrana, no processo de adaptação homeofluídica, diante de alterações de pressão e temperatura, não é o único mecanismo de controle da estabilidade e atividade das membranas biológicas. Muitas células podem manter a estabilidade de suas membranas secretando no meio solutos orgânicos para promoção de tolerância à condição de estresse a que elas estão submetidas.

Muitos organismos desenvolveram mecanismos de adaptação a condições de elevada salinidade externa, pressão ou temperatura. As cianobactérias tiveram que desenvolver um mecanismo sofisticado de combate às condições de salinidade do meio ambiente. As cepas que vivem em meio salino com $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl, são consideradas cepas de baixa tolerância ao sal, e usam sacarose ou trealose como fatores de proteção. As cepas que vivem em meio salino com $1,8 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl, são consideradas cepas de média tolerância ao sal e usam o heterosídeo 2-O- α -D-glicopiranosil-glicerol como fator de proteção. Enquanto as cepas que vivem em meio com $2,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl, que são consideradas de alta tolerância ao sal, acumulam os peptídeos glicil-betaína ou glutamil-betaína como fatores de proteção ao sal (Hincha e Hagemann, 2004).

ESTABILIZAÇÃO OSMÓTICA DE PROTEÍNAS

A origem da ação estabilizadora das membranas biológicas por solutos osmoestabilizadores pode buscar pistas importantes no estudo da ação desses solutos sobre outro tipo de complexo organizacional biológico, as proteínas. A ação estabilizadora de osmólitos sobre proteínas tem sido explicada pela teoria da hidratação preferencial de Timasheff (Gekko e Timasheff, 1981a; Gekko e Timasheff, 1981b; Timasheff e Arakawa, 1989; Timasheff, 1993; Timasheff, 1998; Fonseca et al. 2006).

Sobre certas condições, o estado nativo (N) de uma proteína prevalece sobre o estado desnaturado (D), como acontece em água pura. A explicação para este aparente paradoxo decorre da interação dos estados N e D da proteína com as moléculas de água. A quantidade de energia livre envolvida na hidratação é proporcional ao tamanho da camada de hidratação formada. Como a forma desnaturada apresenta maior superfície de exposição ao solvente, sua camada

de hidratação é mais extensa e conseqüentemente maior é a energia livre necessária para sua hidratação. Como a forma nativa apresenta menor superfície de exposição ao solvente, ela tem uma camada de hidratação menos extensa e assim requer menos energia livre para sua hidratação. A energia livre requerida para a formação da camada de hidratação vem das interações hidrofóbicas entre os grupamentos apolares dos aminoácidos, e como no estado D estes grupamentos estão expostos ao solvente, a interação da proteína com a água não fornece a energia necessária para a formação da camada de hidratação. No estado N, a energia de hidratação é mais baixa e facilmente obtida pela força hidrofóbica, que compele os grupamentos apolares da proteína a ficarem juntos, de tal forma que a própria energia livre de enovelamento da proteína também atende a demanda energética da formação de sua camada de hidratação. Isto faz com que o equilíbrio entre os estados N e D da proteína esteja deslocado no sentido do estado N, o que significa que ele é mais estável em água pura. Os osmólitos elevam a energia livre tanto do estado N quanto do estado D de uma proteína, mas elevam muito mais a energia do estado D do que do estado N, de tal forma que a energia livre de desnaturação de proteínas é aumentada na presença de um osmólito. A explicação mais amplamente aceita para esse processo foi fundamentada na interação preferencial da água com a proteína, com base na teoria das funções de Wyman (Wyman, 1964; Wyman e Gill, 1990). A incorporação de um osmólito (X) em uma solução aquosa de proteína (P) vai conduzir ao equilíbrio:



onde se vê uma competição entre a água e o osmólito pela proteína. Esta competição é vencida pela água, ou seja, a proteína prefere ligar-se às moléculas de água do que ao osmólito, o que significa que ele é preferencialmente excluído da superfície da proteína, segundo um efeito que foi chamado solvofóbico (Gekko e Timasheff, 1981a; Gekko e Timasheff, 1981b; Timasheff e Arakawa, 1989) ou osmofóbico (Bolen e Baskakov, 2001). Este efeito pode ser explicado pela maior afinidade da proteína pela água pura do que pela mistura osmólito-água (Fonseca et al., 2006).

Essa explicação tem sido referida na literatura como teoria da hidratação preferencial da proteína ou teoria da exclusão preferencial do soluto (Gekko e Timasheff, 1981-a; Gekko e Timasheff, 1981-b; Timasheff e Arakawa, 1989).

É possível que essa teoria possa também explicar a ação estabilizadora dos osmólitos sobre as proteínas de membrana e, quem sabe, até da membrana como um todo.

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DE PROTEÍNAS

Essa questão foi recentemente alvo de um trabalho de revisão produzido por esse laboratório (Fonseca et al., 2006). A temperatura é um dos vários fatores que podem afetar o equilíbrio N-D. Embora o equilíbrio de estabilização de uma proteína seja muito bem representado pela variação de energia livre padrão (ΔG°), definida à temperatura padrão de 298,15 K, seu estudo também pode ser desenvolvido em função da temperatura, permitindo a avaliação das funções termodinâmicas entalpia (H) e entropia (S). A variação de energia livre depende da temperatura segundo uma curva de formato gaussiano, cujo ponto máximo caracteriza a temperatura de maior estabilidade da proteína (Lee, 2000). Essa temperatura deve ser tanto maior quanto mais intensas forem as forças que mantêm a proteína no estado N. O calor por si, só, é um agente caotrópico, pois aumenta a energia vibracional dos grupamentos da proteína, favorecendo a ruptura das ligações não covalentes que estabilizam o estado N, promovendo sua desnaturação. A quebra de ligações decorrente do aumento da vibração de grupos deve constituir um processo endotérmico. Como esse aumento na entropia vibracional está associado ao gasto de calor envolvido na quebra das ligações do estado nativo, pode-se dizer que o aumento na entalpia é compensado por um aumento de entropia verificada para os processos de desnaturação térmica das proteínas (Cooper, 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da dependência térmica da ação de solutos caotrópicos e cosmotrópicos tem contribuído significativamente para a compreensão da origem de seu efeito sobre proteínas em solução aquosa. Esses estudos têm desenvolvido suportes crescentes para a utilização biotecnológica desses solutos.

Da mesma forma, o estabelecimento de estudos da dependência térmica da ação de solutos caotrópicos e cosmotrópicos sobre membranas deve também contribuir muito significativamente para o conhecimento da origem do efeito estabilizador desses solutos sobre as membranas biológicas. A estabilização de membranas biológicas é com certeza uma questão de suma importância biotecnológica, já que a membrana representa a primeira barreira de proteção da célula contra o estresse ambiental.

REFERÊNCIAS

Adachi, J.; Asano, M.; Ueno, Y.; Niemelä, O.; Ohlendieck, K.; Peters, T.J.; Preedy, V.R. Alcoholic muscle disease and biomembrane perturbation. **J. Nutr. Biochem.**, v. 14, n. 11, p. 616-625, 2003.

Araki, K.; Rifkind, J. M. The rate of osmotic hemolysis. A relationship with membrane bilayer fluid. **Biochim. Biophys. Acta**, Oxford, v. 645, n. 1, p.81-90, Jun 1981.

Bolen, D.W.; Baskakov, I.V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **J. Mol. Biol.**, v. 310, n. 5, p. 955-963, 2001.

Chan, T. C.; Godin, D.V.; Sutter, M. C. Erythrocyte membrane properties of the chronic alcoholic rat. **Drug. Alcohol Depend.**; Tokyo, v. 12, n. 3, p. 249-257, Nov 1983.

Chi, L.; Wu, W. Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. **Biochim. Biophys. Acta**, Oxford; v. 1062, n. 1, p. 46-50, Feb 1991.

Cooper, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 3, n. 5, p. 557-563, 1999.

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

Danielli J.F.; Davson H. A contribution to the theory of permeability of thin films. **J. Cell. Comp. Physiol.**, v. 5, p. 495-508, 1935.

Fonseca, L.C.; Corrêa, N.C.R.; Garrote-Filho, MS; Cunha, C.C.; Penha-Silva, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006.

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

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

Hincha, D.K.; Hagemann. M. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms, **Biochem. J.**, v. 383, p. 277-283, 2004.

Kornacki, J.A.; Firshein, W. Replication of Plasmid RK2 in vitro by a DNA-Membrane complex: evidence for initiation of replication and its coupling to transcription and translation. **J. Bacteriology**, v. 167, p. 319-326, 1986.

Koska, J.; Blazicek, P.; Marko, M.; Grna, J.D.; Kvetnansky; R., Vigas, M. Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans. **Physiol Res.**, v. 49, suppl 1, p. S95-100, 2000.

Kretzschmar, M.; Müller, D.; Hübscher, J.; Marin, E.; Klinger, W.; Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. **Int. J. Sports Med.**, v. 12, n. 2, p. 218-222, 1991.

Kusano, T.; Steinmetz, D.; Hendrickson, W.G.; Murchie, J.; King M.; Benson, A. e Schaechter, M. Direct evidence for specific Binding fo the replicative origin of the *Escherichia coli* chromosome of the membrane. **J. Bacteriology**, v. 158, p. 313-316, 1984.

Laffan, J.; Firshein, W. DNA Replication by a DNA-Membrane Complex Extracted from *Bacillus subtilis*: Site of initiation in vitro and initiation potential of subcomplexes. **J. Bacteriology**, v. 169, p. 2819-2827, 1987.

Lee, J.C. Biopharmaceutical formulation. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 11, n. 1, p. 81-84, 2000.

Lindi, C.; Montorfano, G.; Marciani, P. Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake. **Alcohol**, v. 16, n. 4, p. 311-316, 1998.

Lizard, G.; Monier, S.; Cordelet, C.; Gesquiere, L.; Deckert, V.; Gueldry, S.; Lagrost, L.; Gambert, P. Characterization and comparison of the mode of the cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 5, p. 1190-1200, 1999.

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

Nelson, D.L.; Cox, M.M.; **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3rd ed. New York: Worth, 2000. 1200 p.

Rock, C.O.; Cronan, J.E. Lipid metabolism in prokaryotes. *Biochemistry of lipids and membranes*. Vance, D.E; Vance, J.E. (Eds.). p. 73-115, Benjamin-Cummings, Menlo Park, California, 1985.

Senthilkumar, R.; Sengottuvelan, M.; Nalini, N. Protective effect of glycine supplementation on the level of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the erythrocytes of rats with alcohol-induced liver injury. **Cell Biochem. Funct.**, v. 22, n. 2; p. 123-128, 2004.

Sozmen, E.Y.; Tanyalcin, T.; Onat, T.; Kutay, F.; Erlacin, S. Ethanol induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 32, n. 10, p. 741-744, 1994.

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

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.

Tyulina O.V.; Bokhan, N.A.; Nevidimova, T.I.; Prokop'eva V.D.; Naidenova N.N. Effect of carnosine on immunocompetent cells from the alcoholic patients. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 198, n. 3, p. 255-258, 2004.

Tyulina, O.V.; Huentelman, M.J.; Prokopieva, V.D.; Boldyrev, A.A.; Johnson, P. Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1535, n. 1, p. 69-77, 2000.

White, D.A. The phospholipids composition of mammalian tissues. In: Ansell, G.B.; Hawthorne J.N. and Dawson, R.M.C. (Eds). Form and function of phospholipids. 2nd ed., p. 441-482, Elsevier, N.Y., 1973.

TRABALHO EXPERIMENTAL**EFEITO DO GLICEROL SOBRE A LISE *IN VITRO*
DE ERITRÓCITOS HUMANOS POR ETANOL
ENTRE 27 E 47 °C**

RESUMO

EFEITO DO GLICEROL SOBRE A LISE *IN VITRO* DE ERITRÓCITOS HUMANOS POR ETANOL ENTRE 27 E 47 °C

Estudante: **Ciciliane Junqueira Finotti**

Orientador: **Nilson Penha-Silva**

O eritrócito é um modelo adequado para estudo da estabilidade de membranas, pois sua lise libera hemoglobina, o que permite a monitoração do processo por espectrofotometria visível. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos contra a desnaturação por etanol na presença de NaCl 0,9%, convenientemente monitorada pela medida da absorvância do sobrenadante em 540 nm ($A_{540 \text{ nm}}$). A dependência de $A_{540 \text{ nm}}$ com a concentração de etanol, em solução de NaCl a 0,9%, na ausência e presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹, foi acompanhada a 27, 32, 37, 42 e 47 °C. Os valores de $A_{540 \text{ nm}}$ foram convertidos em percentagem de hemólise multiplicando por 100 a razão entre os valores individuais de absorvância e a absorvância máxima de cada experimento. As dependências da percentagem de hemólise com a concentração de etanol seguiram linhas sigmoidais de transição e foram ajustadas à equação de Boltzman, para determinar a concentração de etanol que causa 50% de hemólise (D_{50}). O aumento da temperatura, dentro da faixa considerada, promoveu declínios estatisticamente significantes ($P < 0,01$) em D_{50} , tanto na ausência quanto na presença de glicerol. O glicerol produziu declínios estatisticamente significantes ($P < 0,01$) nos valores de D_{50} , a 27, 32, 37 e 42 °C, mas não a 47 °C, onde o glicerol promoveu um aumento significativo de D_{50} ($P < 0,01$). Na presença de glicerol, a dependência térmica de D_{50} se ajustou bem a uma reta, mas na sua ausência os dados se ajustaram mais adequadamente a um modelo não-linear. A curva de dependência térmica da estabilidade dos eritrócitos contra etanol apresentou dois pontos de equivalência com a reta de dependência na ausência do osmólito. Esses dois pontos ocorreram a 24,7 e 45,9 °C. Esses resultados significam que o glicerol potencializa a ação caotrópica do etanol no intervalo de

24,7 a 45,9 °C, mas abaixo e acima desse intervalo a ação do glicerol sobre os eritrócitos é predominantemente estabilizadora. Esse trabalho procura fornecer uma explicação física para esse efeito.

DESCRITORES: eritrócito, glicerol, etanol, estabilidade de membranas, temperatura.

ABSTRACT

EFFECT OF GLICEROL ON THE STABILITY OF HUMAN ERYTHROCYTES AGAINST ETHANOL BETWEEN 32 AND 47 °C

Student: **Ciciliane Junqueira Finotti**

Advisor: **Nilson Penha-Silva**

The erythrocyte is an adequate model to study the stability of biological membranes, since its lyses release hemoglobin, which permits the monitoration of the process by visible spectrophotometry. The purpose of this work was evaluate the effect of the presence of 1 mol.L⁻¹ glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes against the denaturation by ethanol in the presence of 0,9% NaCl, conveniently monitored by measurement of the supernatant absorbance at 540 nm ($A_{540\text{ nm}}$). The dependence of $A_{540\text{ nm}}$ with the ethanol concentration, in solution with 0.9% NaCl, in the absence and presence of 1 mol.L⁻¹ glycerol, was followed at 27, 32, 37, 42 and 47 °C. The $A_{540\text{ nm}}$ values were converted in percentage of hemolysis multiplying by 100 the reason between the individual values of absorbance and maximal absorbance in each experiment. The dependencies of the percentage of hemolysis with the concentration of ethanol followed sigmoidal transition lines and were adjusted to the Boltzman equation, in order to determine the concentration of ethanol that cause 50% of hemolysis (D_{50}). The increase in the temperature, within the considered range, promoted statistically significant decreases ($P < 0.01$) in D_{50} , so in the absence as in the presence of glycerol. The glycerol produced statistically significant decreases ($P < 0.01$) in the D_{50} values, at 27, 32, 37 and 42 °C, but not at 47 °C, where glycerol promoted a significant increase in D_{50} ($P < 0.01$). In the presence of glycerol, the thermal dependence of D_{50} was very well fitted to a line, but in its absence data were fitted more properly by a non-linear model. The thermal dependence curve for the erythrocytes stability against ethanol presented two equivalence points with the dependence line for the stability in the absence of the solute. These points occurred at 24.7 and 45.9 °C. These results mean that glycerol potentiates the chaotropic action of ethanol in the temperature interval of

24.7 and 45.9 °C, but beyond and above this interval the action of glycerol on the erythrocytes is predominantly a stabilizing action. This work also tries to furnish a physical explanation for this effect.

KEY WORDS: erythrocyte, glycerol, ethanol, stability of membranes, temperature.

INTRODUÇÃO

A bicamada lipídica que constitui uma membrana biológica é estabilizada pela força hidrofóbica, que compele as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídeos a se aproximarem e, secundariamente, pelas forças atrativas de van der Waals, que as mantêm unidas entre si no interior anidro da membrana, e pelas ligações de hidrogênio que as cabeças polares dos fosfolipídeos formam com a água tanto no meio interno quanto no meio externo da célula (Tanford, 1973).

A membrana citoplasmática constitui o primeiro alvo da célula a sofrer os danos causados pelos agentes desnaturantes de origem externa. Esses agentes desnaturantes compreendem, dentre outros, o calor e agentes químicos como o etanol.

O calor aumenta a energia vibracional dos grupos químicos, o que favorece a ruptura das ligações não covalentes que estabilizam a estrutura do estado nativo do complexo organizacional contra a desnaturação.

O etanol diminui especificamente a intensidade da força hidrofóbica, atraindo para o solvente grupos apolares que estavam escondidos no interior anidro da estrutura nativa (Castronuovo et al., 1999).

Dentre os vários mecanismos que os organismos vivos utilizam para combater a ação dos agentes desnaturantes encontra-se o controle da pressão osmótica, pela produção e armazenamento de solutos osmoestabilizadores ou simplesmente osmólitos, como o glicerol (1,2,3-propanotriol) e o sorbitol (1,2,3,4,5,6-hexanoexol), dentre outros (Borowitzka e Brown, 1974; Yancey et al., 1982).

A origem da ação do glicerol sobre a estabilização de proteínas tem sido muito bem explorada, geralmente com a utilização de paradigmas termodinâmicos. Parece que existe até um consenso a respeito da origem desse efeito em proteínas. A maneira como o glicerol estabiliza uma proteína não envolve sua ligação a ela, mas sua exclusão das esferas de hidratação mais próximas da macromolécula (Timasheff e Arakawa, 1989), de tal forma que o equilíbrio entre os estados nativo (N) e desenovelado (D) da proteína fica deslocado no sentido do estado que é preferencialmente hidratado, o estado nativo. A hidratação envolve o gasto de energia livre e como o estado N tem uma

superfície externa menor do que o estado D, o estado N é então estabilizado em relação ao estado D (Timasheff e e Arakawa, 1989; Gekko e Timasheff, 1981a; Gekko e e Timasheff 1981b; Lee e Timasheff, 1981; Timasheff, 1993; Liu e Bolen, 1995; Fonseca et al., 2006).

Entretanto, a origem da ação do glicerol sobre as membranas biológicas não parece ser tão ecleticamente apresentada na literatura.

Por esta razão, nós decidimos estudar a ação do glicerol sobre a estabilidade de membranas contra a ação desnaturante do etanol, a partir de um paradigma termodinâmico. Como modelo de membrana biológica, nós utilizamos eritrócitos humanos, uma vez que sua lise libera um pigmento colorido, a hemoglobina, que pode ser facilmente monitorada por espectrofotometria na região visível do espectro (Nelson e Cox, 2000; Moeckel et al., 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

Ética em pesquisa

Todos os experimentos foram executados no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, sob a supervisão do professor Dr. Nilson Penha-Silva. O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética da instituição. As doações de sangue foram feitas voluntariamente por estudantes do próprio laboratório, após informações sobre a natureza do projeto e assinatura de um termo de consentimento esclarecido em sinal de sua concordância com a participação no projeto.

Reagentes

O etanol absoluto (PA) utilizado foi adquirido da Quimex com grau de pureza de 99,3% e utilizado sem purificação prévia. O glicerol, grau ACS, utilizado tinha um grau de pureza de 99,8% e foi adquirido da USB (Cleveland, Ohio, EUA).

Equipamento

As medidas de massa foram feitas em uma balança digital da marca AND modelo 870, com precisão de medida da ordem de décimos de miligramas. As medidas de volume foram feitas em buretas de vidro refratário ou com a utilização de uma pipeta automática regulável de 1000 μ L da Labsystems, modelo Finnpipette Digital. As incubações em temperaturas definidas foram feitas em banho termostaticado Marconi, modelo MA 184. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro Micronal modelo B-442.

Coleta das amostras de sangue

Amostras de sangue (4 mL) foram colhidas em vacutainer, contendo 50 μ L de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 1g/100mL como anticoagulante, da veia antecubital de voluntários humanos saudáveis, de qualquer um dos gêneros, após jejum de 8 a 14 horas.

Estabilidade de eritrócitos humanos contra glicerol

A uma bateria de tubos do tipo eppendorf contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,9% e uma concentração de glicerol entre 0 e 2,8 mol.L⁻¹, pré-incubada a 37 °C por 10 minutos, eram adicionadas alíquotas de 25 µL de sangue. Após homogeneização, os tubos eram incubados por 30 minutos a 37 °C e centrifugados por 10 minutos a 600xg e 37 °C. As absorvâncias dos sobrenadantes eram lidas em 540 nm contra um tubo controle contendo apenas NaCl a 0,9%.

Estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol na ausência de glicerol

A uma série de tubos do tipo eppendorff contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,9% e uma concentração de etanol entre 0 e 27,5%, pré-incubadas a 27, 32, 37, 42 e 47 °C por 10 minutos, eram adicionadas alíquotas de 25 µL de sangue. Após homogeneização, os tubos eram incubados por 30 minutos em cada temperatura e depois centrifugados por 10 minutos a 600xg na temperatura de cada experimento. Durante o curso dos experimentos os tubos permaneciam fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes eram lidas em 540 nm contra um tubo controle contendo apenas NaCl a 0,9%.

Estabilidade dos eritrócitos humanos contra etanol na presença de glicerol

A uma série de tubos do tipo eppendorff contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,9%, glicerol a 1 mol.L⁻¹ e uma concentração de etanol entre 0 e 27,5%, pré-incubadas a 27, 32, 37, 42 e 47 °C por 10 minutos, eram adicionadas alíquotas de 25 µL de sangue. Após homogeneização, os tubos eram incubados por 30 minutos em cada temperatura e depois centrifugados por 10 minutos a 600xg na temperatura de cada experimento. Durante as incubações os tubos permaneciam fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes eram lidas em 540 nm contra um tubo controle contendo apenas glicerol a 1 mol.L⁻¹ e NaCl a 0,9%.

Métodos analíticos

Os cálculos, edições dos dados e análises estatísticas foram feitos com o uso do programa Origin 6.0 Professional (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, EUA). A percentagem de hemólise em cada tubo era calculada

multiplicando por 100 o valor de sua absorvância dividido pela absorvância máxima de cada experimento.

Em cada experimento, a dependência da percentagem de hemólise com a concentração de etanol era ajustada à linha sigmoideal de regressão dada pela equação de Boltzman:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{a_1 - a_2}{1 + e^{(D-D_{50})/dD}} + a_2 \quad (1),$$

onde a_1 e a_2 representam os valores mínimo e máximo de hemólise, D é a concentração do desnaturante (etanol), D_{50} representa a concentração de desnaturante capaz de promover 50% de hemólise dos eritrócitos da solução e dD representa a amplitude da transição de desnaturação dos eritrócitos pelo etanol, conforme descrições anteriores de Aversi-Ferreira (2004).

Os valores de D_{50} em diferentes temperaturas e concentrações de glicerol foram comparados entre si por análise de variância (ANOVA). A dependência de D_{50} com a temperatura foi analisada por regressão linear e não-linear. As inclinações das retas de regressão para a dependência de D_{50} com a temperatura na ausência e presença de glicerol, foram comparadas por análise de variância (ANOVA) das razões de D_{50} sobre temperatura em cada uma das situações consideradas. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância (P) considerado foi de 0,01.

RESULTADOS

O aumento na concentração de glicerol, entre 0 e 2,8 mol.L⁻¹, nas soluções de eritrócitos humanos em NaCl a 0,9%, durante 30 minutos e a 37° C de temperatura, não promoveu hemólise significativa dos eritrócitos (**figura 1**).

A estabilidade dos eritrócitos humanos contra a ação desnaturante de etanol foi determinada a partir da dependência, com a concentração de etanol, da percentagem de hemólise observada em soluções de eritrócitos humanos em NaCl a 0,9%, na ausência e na presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹, em diferentes temperaturas (27, 32, 37, 42 e 47 °C). Em todas as situações a dependência seguiu um padrão sigmoidal e foi ajustada por regressão sigmoidal de Boltzman, como ilustrado na **figura 2**. A estabilidade dos eritrócitos foi quantificada pelo valor na abscissa do ponto de meia transição da sigmóide (**figura 2**). Esse ponto representa a concentração do desnaturante capaz de promover 50% de hemólise na solução (**D₅₀**).

As **figuras** seguintes, **3**, **4**, **5**, **6** e **7**, ilustram a dependência da percentagem de hemólise com a concentração de etanol a 27, 32, 37, 42 e 47 °C de temperatura, respectivamente, cada uma em ambas as situações, ou seja, na ausência e na presença de glicerol a 1mol.L⁻¹. No intervalo de 27 a 42 °, é visível que a presença de glicerol promoveu uma exacerbação da ação caotrópica do etanol, uma vez que os valores de **D₅₀** sofreram diminuição de seu valor. Essa diminuição dos valores de **D₅₀** foram de fato estatisticamente significantes (P<0,01), como está mostrado na **tabela 1**. Mas a 47 °C, a presença do glicerol promoveu um evidente aumento no valor de **D₅₀** (**figura 7**). Essa diferença, mostrada na **tabela 1**, também foi estatisticamente significativa (P<0,01).

A dependência térmica da estabilidade dos eritrócitos humanos na ausência e presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ está mostrada na **figura 8**. É visível que na ausência de glicerol a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol (**D₅₀**) apresenta uma fuga da linearidade. Esse comportamento não linear está mostrado na **figura 9**. A reta de regressão da dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol apresenta dois pontos de equivalência com a curva de dependência na presença de glicerol. A partir das equações de regressão em cada uma de ambas as

situações, nós determinamos esses pontos de equivalência. Esses pontos de equivalência foram de 24,67 e de 45,86 °C. Nesses pontos, a ação estabilizante do glicerol neutralizou a ação potencializadora que o glicerol apresentou sobre o efeito caotrópico do etanol.

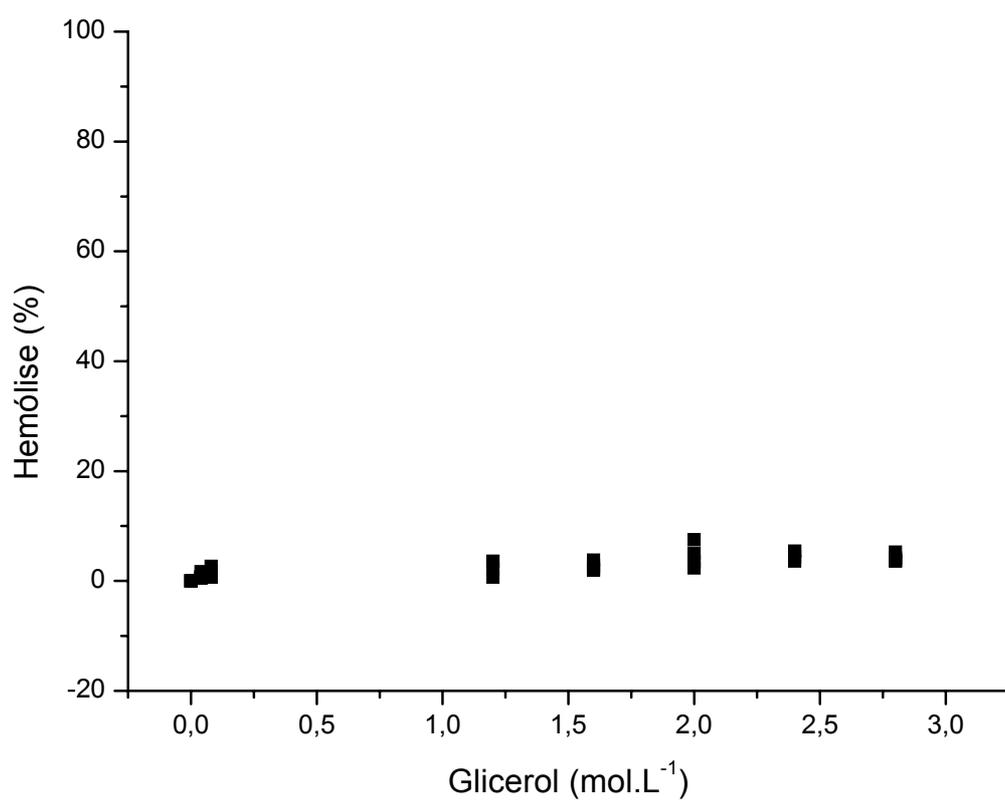


Figura 1 - Estabilidade de eritrócitos humanos em NaCl a 0,9% e 37 °C de temperatura na presença de concentrações crescentes de glicerol.

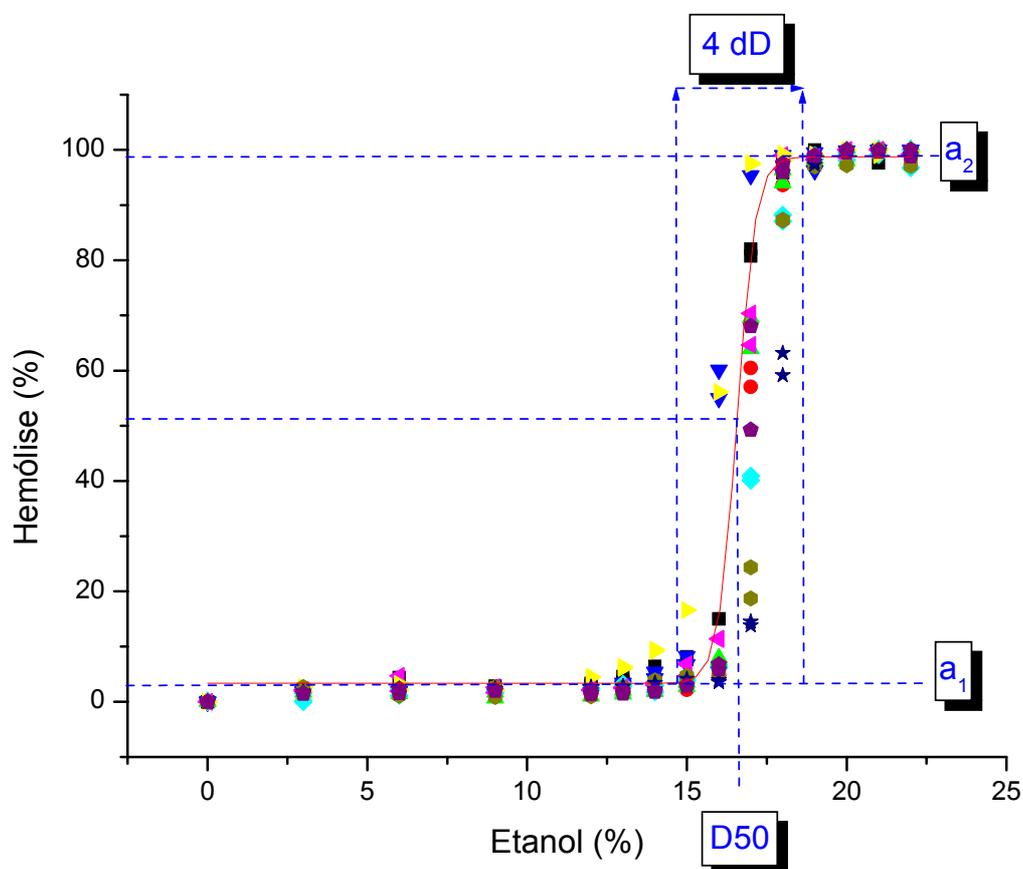


Figura 2 - Curva de dependência da porcentagem de hemólise com a concentração de etanol a 37 °C. Cada experimento foi identificado por um símbolo diferente. Os dados foram ajustados à uma linha de regressão sigmoide de acordo com a equação de Boltzman para determinação da concentração de etanol que promove 50% de hemólise ($D_{50\%}$). Os parâmetros a_1 , a_2 e $4dD$ representam a porcentagem de hemólise basal da amostra de sangue, a porcentagem de hemólise total e a amplitude da transição de hemólise, respectivamente.

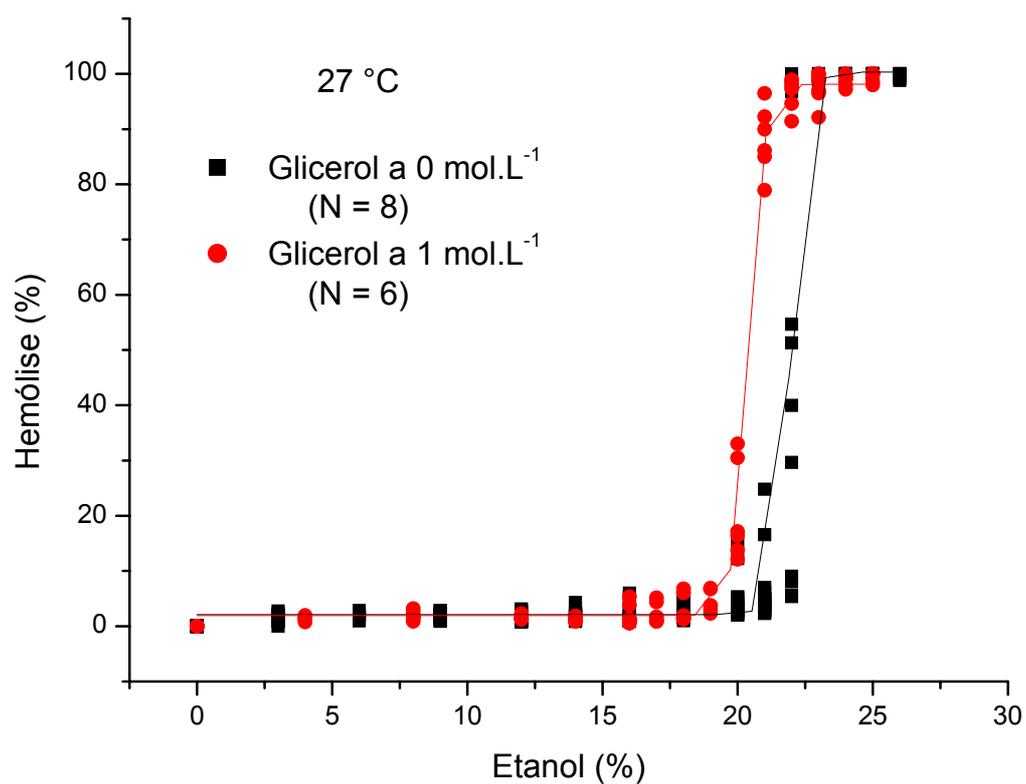


Figura 3 - Efeito da presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ sobre a estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol a 27 °C de temperatura.

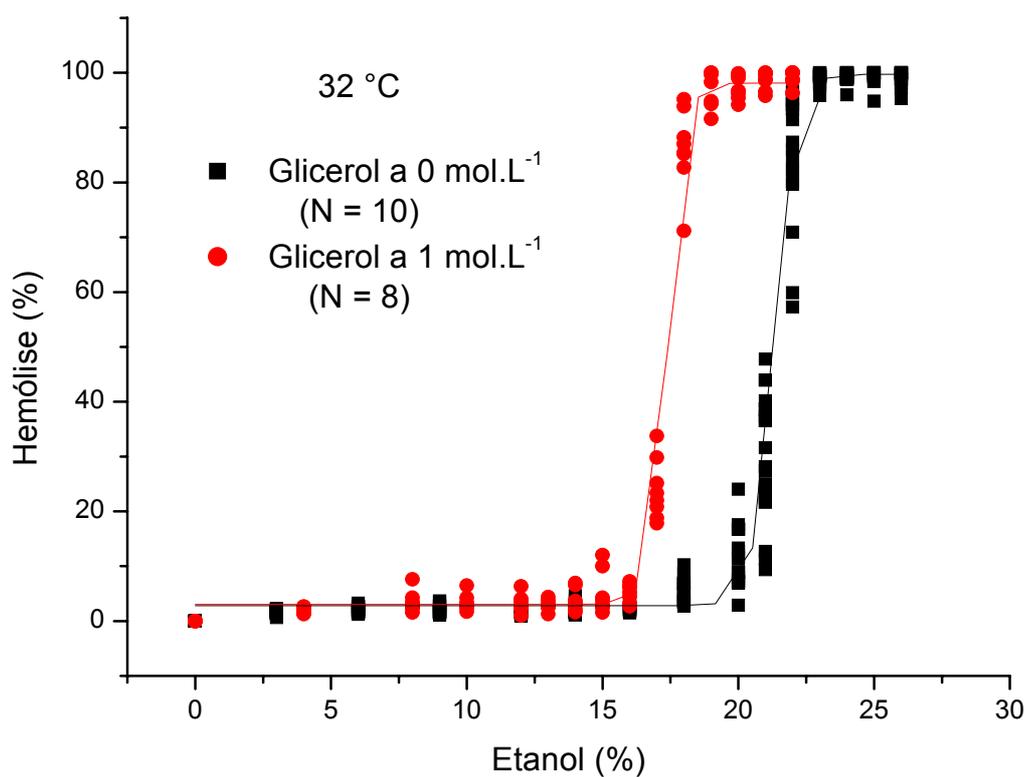


Figura 4 - Efeito da presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ sobre a estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol a 32 °C de temperatura.

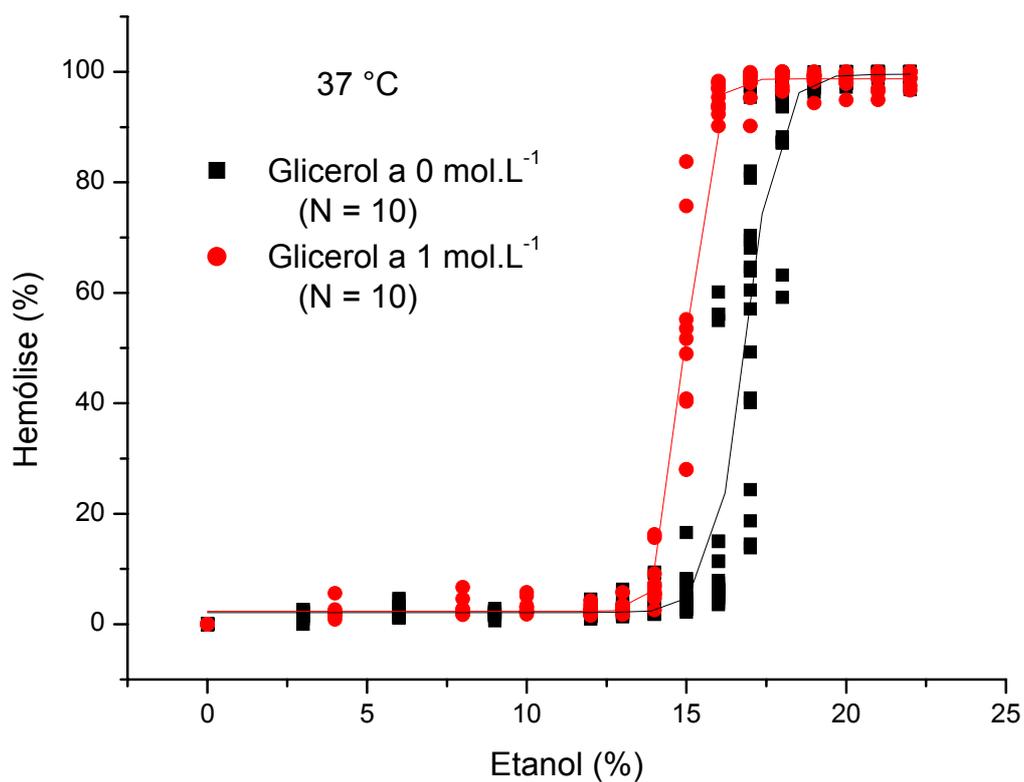


Figura 5 - Efeito da presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ sobre a estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol a 37 °C de temperatura.

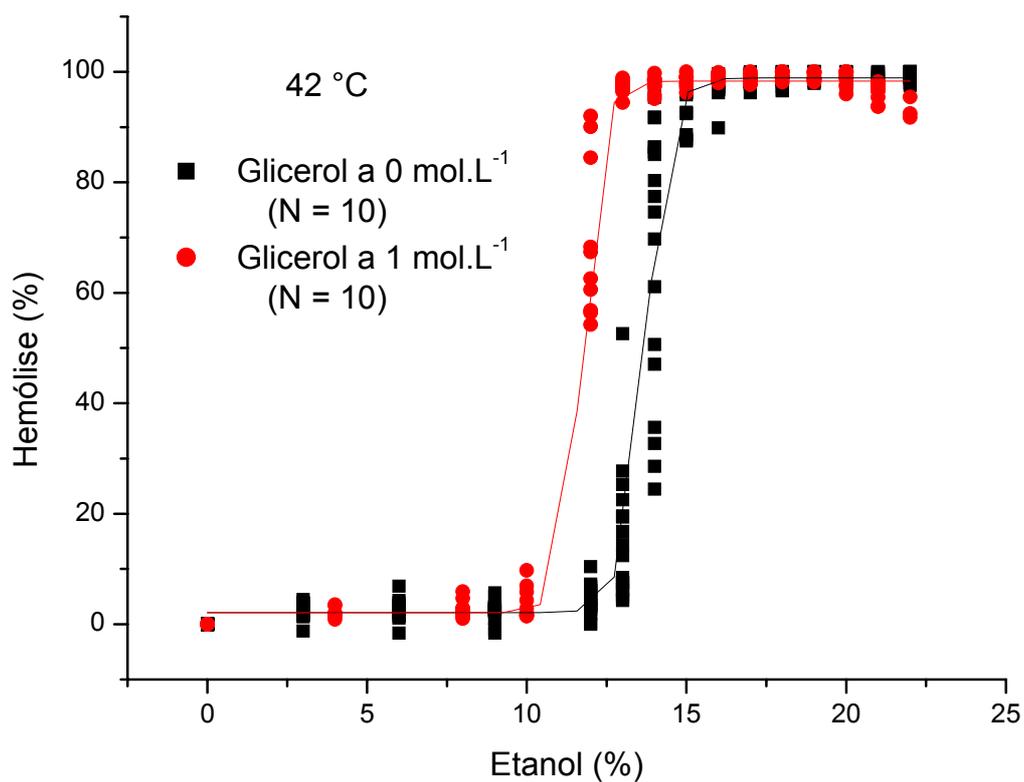


Figura 6 - Efeito da presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ sobre a estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol a 42 °C de temperatura.

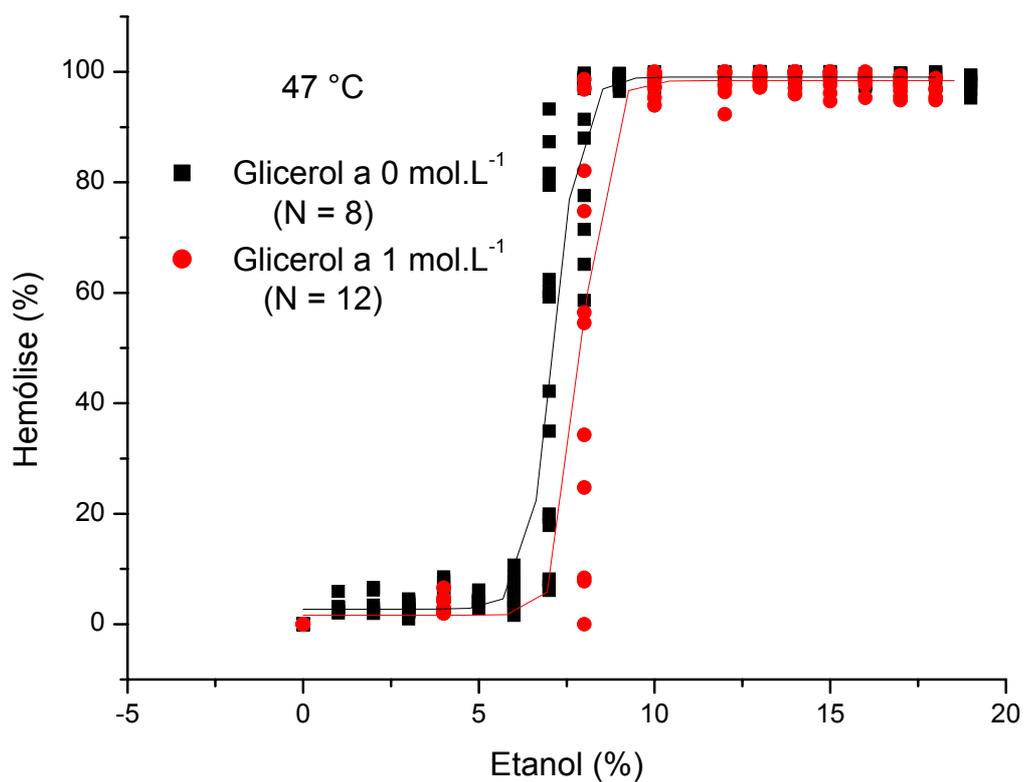


Figura 7 - Efeito da presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ sobre a estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol a 47 °C de temperatura.

Tabela 1 - Efeito da concentração de glicerol e da temperatura sobre a estabilidade de eritrócitos humanos contra a desnaturação por etanol em NaCl a 0,9%, dada pelos valores de $D_{50\%}$ (média \pm desvio-padrão)

Temperatura (°C)	Glicerol (mol.L ⁻¹)		P
	0	1	
27	21,91 \pm 0,40 (N = 8)	20,40 \pm 0,15 (N = 6)	*
32	21,36 \pm 0,23 (N = 10)	17,40 \pm 0,12 (N = 10)	*
37	16,81 \pm 0,60 (N = 10)	14,98 \pm 0,26 (N = 10)	*
42	13,74 \pm 0,39 (N = 10)	11,74 \pm 0,28 (N = 10)	*
47	7,15 \pm 0,46 (N = 8)	7,54 \pm 1,41 (N = 12)	*

*P<0,01, indicando diferenças estatisticamente significantes entre as temperaturas e as concentrações de glicerol (ANOVA).

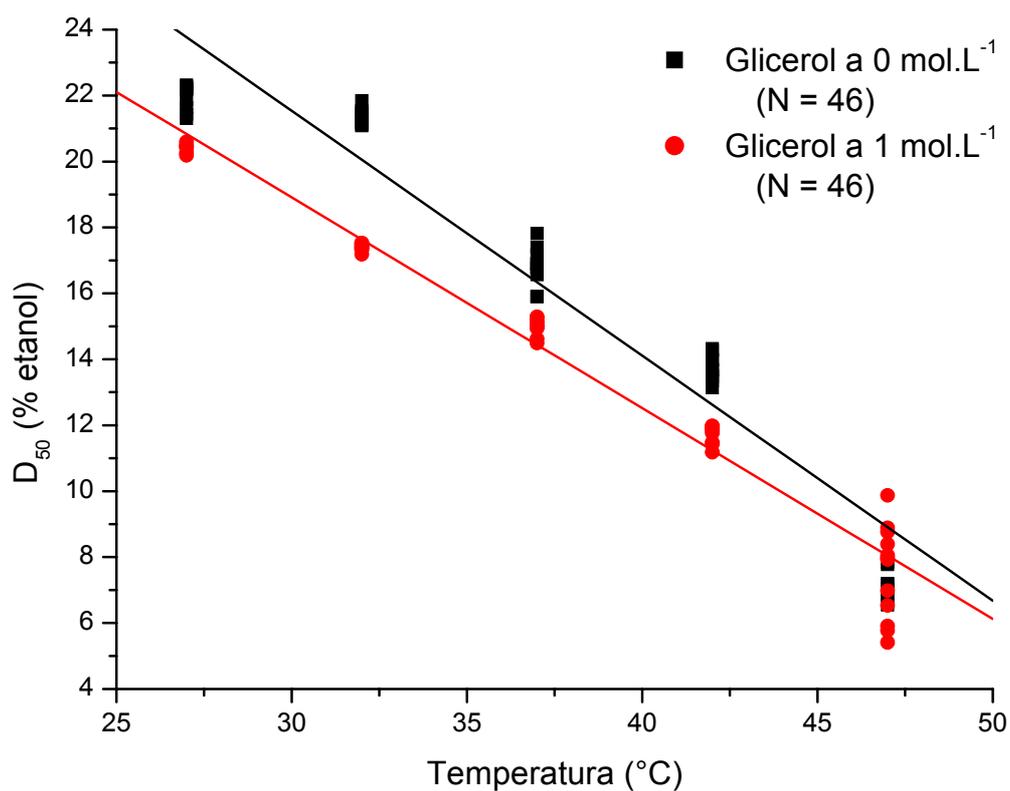


Figura 8 - Efeito do glicerol sobre a dependência térmica de eritrócitos humanos contra etanol, entre 27 e 47 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura. As retas de regressão foram $y = 35,77 (\pm 0,33) - 0,5689 (\pm 0,0091)x$ e $y = 38,98 (\pm 1,04) - 0,5934 (\pm 0,02940)x$, na ausência e presença de glicero a 1 mol.L^{-1} , respectivamente.

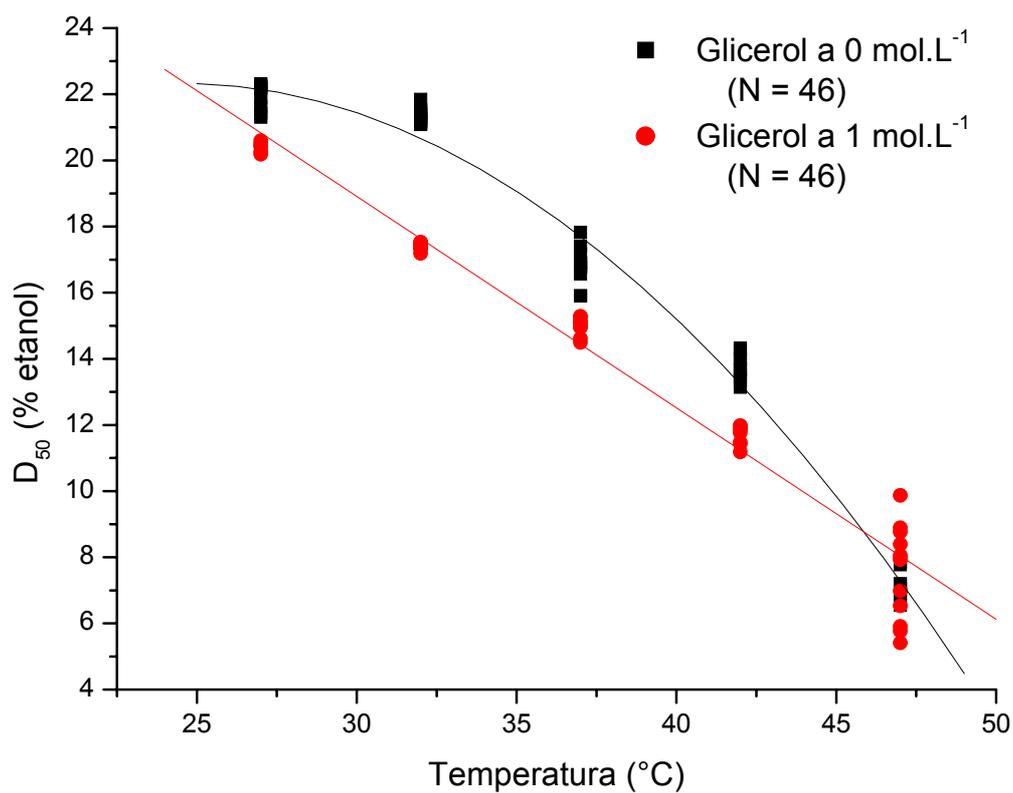


Figura 9 - Pontos de equivalência da dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos na presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ com a dependência na ausência de glicerol, quando a dependência na presença de glicerol é tratada por ajuste não-linear.

DISCUSSÃO

Efeito do glicerol sobre a lise de eritrócitos humanos em NaCl a 0,9%

Quando usado entre os limites de concentração de 0 e 2,8 mol.L⁻¹, sempre na presença de NaCl a 0,9%, o glicerol não provoca lise de eritrócitos, a 37 °C de temperatura (**figura 1**). Isto significa que as alterações que o glicerol introduz nas propriedades do solvente não contribuem para a lise de eritrócitos, nas condições experimentais consideradas nesse trabalho.

Esse comportamento é condizente com a ação estabilizadora de complexos organizacionais biológicos, descrita para o glicerol, bem como para outros osmólitos da classe dos solutos compatíveis ou cosmotrópicos, como o sorbitol.

É devida a essa ação estabilizadora que o glicerol é usado na criopreservação de eritrócitos (Bakaltcheva, Odeyale e Spargo, 1996; Bogner et al., 2002; De Loecker et al., 1993; Eroglu et al., 2000; Moeckel et al., 2002; Pellerin-Mendes et al., 1997; Wagner et al., 2002). A 40% (4,35 mol.L⁻¹), o glicerol permite a criopreservação de eritrócitos, a -80 °C, por até 10 anos (Krijnen, Kuivenhoven e Wit, 1968; Rowe, Eyster e Kellner, 1968; Walker, 1996), sem prejuízo de sua resistência contra choque hipotônico, dada pelo índice de fragilidade (**H₅₀**), que é a concentração salina capaz de promover 50% de hemólise, após descongelamento e sua remoção do solvente (Wagner et al., 2002).

Contudo, quando usamos o glicerol na presença de etanol, o glicerol potencializou a ação caotrópica do etanol a 27, 32, 37 e 42 °C (**figuras 3, 4, 5 e 6**), produzindo diminuições significantes nos valores de D₅₀ (**tabela 1**). Mas essa ação potencializadora do etanol declinou com o aumento da temperatura, chegando a dar lugar a uma ação neutralizadora da ação caotrópica do etanol a 47 °C (**figura 7**). Isso significa que o glicerol pode agir tanto em sinergismo quanto em antagonismo com o etanol em relação à promoção de lise de eritrócitos.

Para entender como isso é possível, é preciso que analisemos passo a passo nosso sistema.

Caracterização da estabilidade de eritrócitos contra a lise por etanol em NaCl a 0,9%

Nosso estudo da estabilidade de eritrócitos contra a ação do etanol utilizou um método desenvolvido no laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. A primeira descrição desse método foi feita por Aversi-Ferreira (2004). Na proposição inicial a ação do etanol sobre os eritrócitos era apresentada em gráficos de $A_{540\text{ nm}}$ contra a concentração do etanol. Mais recentemente, nós passamos a apresentar essa dependência em termos da percentagem de hemólise contra a concentração de etanol. A utilização da percentagem de hemólise no lugar da absorvância em 540 nm é muito mais válida, porque faz uma padronização necessária para eliminar diferenças na curva devidas a diferenças na taxa de hemoglobina ou valores de hematócrito dos doadores da amostra de sangue.

A elevação na concentração de etanol causa uma transição curta entre um patamar inicial de concentração de etanol, em que os eritrócitos estão completamente íntegros, com 0% de hemólise, e um patamar final de concentração de etanol, em que os eritrócitos sofreram 100% de hemólise (**figura 2**). A curva matemática que melhor descreve essa transição é a sigmóide. A sigmóide é uma curva típica de processos cooperativos, como a saturação da hemoglobina por oxigênio, o desenovelamento de proteínas por agentes desnaturantes e a cinética de saturação pelo substrato das enzimas alostéricas. Isso deve significar que a ação caotrópica do etanol sobre o eritrócito é de natureza cooperativa. O significado físico mais provável para justificar esse caráter cooperativo é a remoção das primeiras moléculas de fosfolípidios da membrana pelo caotrópico seguida exponencialmente pela liberação de hemoglobina até a exaustão dos eritrócitos íntegros da solução (**figura 2**).

Em termos operacionais, a natureza sigmoideal da transição admite o uso de regressão sigmoideal, com base na equação de Boltzman, que define vários parâmetros: o nível basal de hemólise do sistema (a_1), o nível máximo de hemólise (a_2), a amplitude (dD) e o ponto de meia transição (D_{50}). D_{50} é a concentração de etanol capaz causar 50% de hemólise nas condições utilizadas em cada experimento. O parâmetro D_{50} é equivalente a outros parâmetros, como a temperatura de fusão (T_M) de proteínas e ácidos nucléicos, a constante de meia

saturação das enzimas alostéricas ($K_{0,5}$) e a meia dose letal (DL_{50}) usada na caracterização de drogas em ensaios biológicos. Assim, D_{50} tem um significado físico definido e pode ser determinado de acordo com um método classicamente utilizado para determinação de outros parâmetros em padrões de dependência que também têm uma natureza sigmoïdal. Além disso, a validade do parâmetro é facilmente atestada pelo grau de significância estatística (P) apresentado pelo conjunto de pontos considerado em cada análise.

Equilíbrio de estabilização morfológica de eritrócitos

O efeito da presença de glicerol sobre a lise de eritrócitos promovida por etanol em meio de NaCl a 0,9% pode ser melhor entendida se nós considerarmos um modelo que foi criado coletivamente no laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia.

O fato inicial que estimulou a idealização desse modelo foi a existência de um poço ou buraco de estabilização na curva de dependência de A_{540} contra a concentração de etanol (Aversi-Ferreira, 2004). Esse buraco aparece após o padrão típico de transição sigmoïdal apresentado na **figura 2**. Uma concentração de etanol acima daquela que exaure a transição de hemólise dos eritrócitos da solução é capaz de produzir um declínio da absorvância em 540 nm, seguida de nova transição de desnaturação até atingir o mesmo patamar de exaustão da hemólise. Esse comportamento implica na capacidade do etanol em estabilizar os eritrócitos contra hemólise quando usado na faixa de concentração que caracteriza o buraco de estabilização.

O modelo que descrevemos neste trabalho também aparece na dissertaçães de Bernardino Neto (2006) e de Gouvêa-e-Silva (2006), também desenvolvidas no mesmo laboratório. Esse modelo está apresentado na **figura 10**.

Conforme a pressão osmótica e a temperatura do meio, os eritrócitos poderiam existir em dois estados morfológicos básicos, um estado expandido e um estado condensado (Bernardino Neto, 2006; Gouvêa-e-Silva, 2006). Por analogia, com o que acontece com a transição cooperativa entre os estado relaxado (**R**) e apertado (**T**) da hemoglobina, resolvemos nos referir aos estados

expandido e condensado do eritrócito como **R** e **T**, respectivamente. Isso porque acreditamos que há semelhanças importantes entre os dois sistemas.

O estado **R** do eritrócito existiria em meio de menor pressão osmótica e o estado **T** em meio de maior pressão osmótica. O aumento da pressão osmótica no exterior do eritrócito seria responsável pela exclusão de água de seu interior, com conseqüente transição do estado **R** para o estado **T**. Essa transição estabilizaria o eritrócito contra a ação de agentes caotrópicos. O estado **T** seria mais estável por causa do fortalecimento das ligações de van der Waals na malha lipídica da membrana, em decorrência da compactação do eritrócito.

Segundo nosso modelo (**figura 10**), os eritrócitos do estado **R** poderiam sofrer a ação caotrópica do etanol (**rota 1**) ou se converter no estado **T**, com o aumento da pressão osmótica (**rota 2**). A **rota 2** somente seria ativada por uma elevação intermediária na concentração de etanol. Uma elevação mais substancial na concentração de etanol ativaria a **rota 3**, com lise do estado **T**. Assim, ambos os estados seriam susceptíveis à lise pelo etanol. O estado **R** seria susceptível à lise pela ação caotrópica do etanol (**rota 1**) e o estado **T** seria susceptível a lise pela combinação de efeitos da ação caotrópica do etanol com a substancial ação da pressão osmótica sobre a estrutura compactada da membrana do eritrócito (**rota 3**).

Os elementos de sustentação desse modelo são apresentados e discutidos nas seções seguintes dessa dissertação.

Ação do etanol sobre eritrócitos humanos em NaCl a 0,9%

O etanol apresenta dois tipos de ação em meio aquoso: 1) ele diminui a constante dielétrica do meio e conseqüentemente a intensidade da força hidrofóbica, e 2) aumenta a pressão osmótica do sistema. A ação caotrópica do etanol deve ser decorrente de uma combinação destas duas ações.

Essas duas ações devem contribuir para a promoção da lise do estado expandido do eritrócito em função do aumento na concentração de etanol, que é representada pela **rota 1** (**figura 10**). A pressão osmótica deve dar uma contribuição praticamente insignificante neste caso, uma vez que concentrações mais baixas de etanol são capazes de promover 50% de lise dos eritrócitos humanos (**figuras 3, 4, 5, 6 e 7**), mas concentrações muito mais altas de glicerol

(até $2,8 \text{ mol.L}^{-1}$), que geram pressões osmóticas muito mais elevadas, não promovem lise rápida dos eritrócitos nas condições do ensaio (**figura 1**). Assim, a ação caotrópica do etanol sobre o estado **R** dos eritrócitos não seria decorrente do aumento da pressão osmótica determinado pela adição de etanol ao meio.

A ação caotrópica do etanol sobre as proteínas é reputada à atenuação da força hidrofóbica e a sua capacidade de estabelecer ligações de van der Waals com as cadeias laterais apolares dos aminoácidos (Castronuovo, 1999; Nozaki e Tanford, 1971; Wang, Robertson e Bolen, 1995). Igualmente, o etanol deve atenuar a força hidrofóbica que estabiliza a dupla camada lipídica da membrana, promovendo a fuga de fosfolipídios e sua dispersão no solvente.

À medida que aumenta a concentração de etanol no meio aumenta também a pressão osmótica do sistema, com a remoção de água do interior do eritrócito e sua compactação. De fato, além da concentração de etanol capaz de promover 100% de lise dos eritrócitos, a curva de dependência de $A_{540 \text{ nm}}$ com a concentração de etanol apresenta um buraco de estabilização, onde os eritrócitos foram encontrados numa forma compactada por microscopia de luz (Aversi-Ferreira, 2004; Gouvêa-e-Silva, 2006). A elevação da pressão osmótica pela própria incorporação de solutos cosmotrópicos em soluções de eritrócitos para sua conservação também leva à diminuição de seu raio (Bakaltcheva, Odeyale e Spargo, 1996; Pellerin-Mendes et al., 1997). Assim, o eritrócito passaria do estado **R** para o estado **T**, pela ativação da **rota 2** da **figura 10**. Essa compactação do eritrócito deve promover uma aproximação dos lipídios de membrana e a intensificação das forças atrativas de van der Waals no interior da membrana, levando à estabilização dos eritrócitos.

Isso não significa que a ação caotrópica do etanol tenha desaparecido, ela apenas foi neutralizada pela exacerbação do efeito protetor do etanol, determinado pelo aumento da pressão osmótica do meio. Mas, com a adição de mais etanol, a combinação da ação caotrópica do etanol com uma elevação da pressão osmótica vai determinar a lise do estado **T** de eritrócitos, conforme previsto na **rota 3** do modelo da **figura 10**. Como o eritrócito perdeu água e ficou mais contraído, a lise deve ocorrer pela ação combinada da pressão externa sobre a membrana com a ação caotrópica do etanol como solvente.

Ação do etanol sobre os eritrócitos humanos na presença de glicerol a 1 mol.L⁻¹ e de em NaCl a 0,9%

O aumento na pressão osmótica, proporcionado pela incorporação de glicerol a 1 mol.L⁻¹, potencializa as ações descritas para o etanol (**figura 10**), o que faz com que os valores de **D₅₀** do etanol sejam menores na presença do que na ausência do glicerol a 27, 32, 37 e 42 °C (**figuras 3, 4, 5 e 6**). De fato, essas diminuições em **D₅₀** foram todas estatisticamente significantes (**tabela 1**). Se o sorbitol a 1 mol.L⁻¹ é usado como soluto, em vez de glicerol, o efeito sobre **D₅₀** é ainda mais pronunciado (Bernardino Neto, 2006). A diferença na intensidade do comportamento do sorbitol em relação ao glicerol é que o glicerol pode entrar no eritrócito, diferentemente do sorbitol (Wagner et al., 2002), de tal forma que a presença do glicerol dentro do eritrócito vai com certeza atenuar o aumento da pressão osmótica externa com o aumento da concentração de etanol.

Por que o aumento da pressão osmótica pelo glicerol potencializaria a ação caotrópica do etanol? A resposta deve estar na remoção de água da superfície do eritrócito, processo que é intensificado na presença do glicerol, por causa do aumento da pressão osmótica decorrente de sua incorporação no solvente. Como a ação caotrópica do etanol dada pela sua capacidade de atrair e dissolver os lipídios de membrana continua presente, ela é fortalecida pelo sinergismo com a pressão osmótica. Daí os valores de **D₅₀** do etanol caírem na presença de glicerol.

Esse declínio de **D₅₀** do etanol pela ação do glicerol (**tabela 1**) representa apenas a exacerbação da **rota 1** do modelo da **figura 10**, **pela ação do glicerol**. Essa ação do glicerol não é tão intensa quanto a ação do sorbitol (Bernardino Neto, 2006), porque a entrada do glicerol no eritrócito protege-o contra a lise pelo etanol.

Um aumento maior na pressão osmótica pela presença combinada do glicerol e do etanol vai também ativar a **rota 2**, deslocando o equilíbrio **R→T** no sentido do estado **T**, conforme previsto no modelo. Essa ativação da **rota 2** pelo glicerol também não deve ser tão intensa quanto a ativação promovida pelo sorbitol. O efeito deve ser mais intenso para o sorbitol por causa da baixa permeabilidade da membrana dos eritrócitos ao sorbitol (de Loecker et al., 1993; Wagner et al., 2002), o que deve favorecer mais o aumento da pressão osmótica e a desidratação e contração dos eritrócitos.

De fato, a presença de glicerol promove um deslocamento para a esquerda do buraco de estabilização do etanol nos gráficos de D_{50} contra a concentração de etanol (Gouvêa-e-Silva, 2006).

Dependência térmica da ação do etanol sobre eritrócitos humanos em NaCl a 0,9%

Como a pressão osmótica apresenta uma dependência direta com a temperatura, um aumento na temperatura deve intensificar as ações promovidas pelo aumento da pressão osmótica, de forma a intensificar os três efeitos sugeridos para o etanol (**figura 10**). De fato, houve declínio em D_{50} com a temperatura (**tabela 1**), mas também antecipação do buraco de estabilização do etanol nas curvas de dependência de D_{50} com a concentração de etanol (Gouvêa-e-Silva, 2006).

Em grande parte, os efeitos observados devem ser decorrentes da clássica ação do calor como agente desnaturante. O calor intensifica a energia vibracional térmica dos grupos químicos e enfraquece as ligações não covalentes entre eles, quer elas sejam iônicas, de hidrogênio ou de van der Waals. Os declínios nos valores de D_{50} observados com o aumento da temperatura (**figuras 3, 4, 5 e 6**) é uma consequência lógica desse efeito, pois a estabilidade da membrana é tanto menor quanto menor é o valor de D_{50} . Assim, o aumento da temperatura está enfraquecendo as ligações estabilizantes não covalentes da membrana e favorecendo a hemólise pela ação do etanol, embora a própria capacidade do etanol de estabelecer ligações de van der Waals com os lipídios de membrana esteja também diminuindo com o aumento da temperatura.

Dependência térmica da ação do etanol sobre eritrócitos humanos na presença de glicerol a 1 mol.L^{-1} e de NaCl a 0,9%

Na presença de glicerol, o aumento da temperatura elevou a lise de eritrócitos a 27, 32, 37 e 42 °C (**figuras 3, 4, 5 e 6**), de um modo estatisticamente significativo (**tabela 1**). Isso pode ser justificado pelo aumento da pressão osmótica promovido pelo aumento de temperatura. Se a pressão osmótica também ativa as **rotas 2 e 3** (**figura 10**), que representam respectivamente a estabilização e a lise do estado estabilizado do eritrócito, o aumento da

temperatura também deveria ativar essas rotas, com a estabilização e a lise do estado estabilizado ocorrendo sob menores concentrações de etanol. Isso de fato foi observado, pois o aumento da temperatura faz o buraco de estabilização dos gráficos de D_{50} contra a concentração de etanol migrar para a esquerda na presença de glicerol (Gouvêa-e-Silva, 2006).

A 47 °C, entretanto, a presença de glicerol revelou-se associada a um declínio na ação caotrópica do etanol (**figura 7**), que também ocorreu de modo estatisticamente significativo (**tabela 1**). Isso significa que a ação do glicerol passou a ser predominantemente de proteção contra a ação caotrópica do etanol. Essa ação protetora já vinha se manifestando, só que forma menos intensa para conseguir se contrapor à ação caotrópica.

Qual seria a origem da ação protetora do glicerol sobre os eritrócitos e por que ela aumenta com o aumento da temperatura? As respostas para essas questões estão no equilíbrio representado pelo modelo da **figura 10**. A presença de glicerol desloca o equilíbrio do estado **R** para o estado **T** (**rota 2**), que é mais estável e, portanto, menos vulnerável ao efeito da temperatura, de tal maneira que os valores de D_{50} diminuíram menos com o aumento da temperatura na presença de glicerol (**tabela 1**). Como o aumento da temperatura aumenta a pressão osmótica, a elevação na temperatura favorece o deslocamento do equilíbrio do estado **R** para o estado **T** dos eritrócitos, promovendo sua estabilização.

Sob menores valores de pressão osmótica, o aumento da temperatura se manifesta mais intensamente no enfraquecimento das forças estabilizadoras da membrana, ativando a **rota 1** (**figura 10**) em detrimento da **rota 2**. Mas sob maiores valores de pressão osmótica, o que ocorre na presença de glicerol, um aumento progressivo da temperatura favorece progressivamente a **rota 2**, aumentando a população de eritrócitos no estado mais estável **T**. É claro que à medida em que a pressão osmótica se eleva sob a ação da temperatura, chega um ponto em que o próprio estado **T** vai sofrer lise (**rota 3**). É por isso que o buraco de estabilização dos eritrócitos nos gráficos de D_{50} contra a concentração de etanol encontra-se deslocado para a esquerda, na presença de sorbitol ou glicerol (Gouvêa-e-Silva, 2006).

Embora a dependência térmica de D_{50} tenha se ajustado bem a uma reta na presença de glicerol, na ausência desse soluto os valores de D_{50} apresentam uma dependência visivelmente não linear com a temperatura (**figura 8**). Realmente, o tratamento não-linear dos dados na ausência do osmólito produziu um resultado nitidamente melhor (**figura 9**) e com mais significância estatística. Nessa figura, podemos ver que a curva de dependência térmica de D_{50} na presença de glicerol se intercepta com a reta de dependência térmica na ausência do osmólito. Os dois pontos de intercessão representam temperaturas, 24,7 e 45,9 °C, onde a ação estabilizadora do glicerol neutraliza sua ação potencializadora da ação caotrópica do etanol. Somente dentro desse intervalo térmico predomina a ação potencializadora do glicerol sobre a ação caotrópica do etanol. Abaixo e acima desse intervalo térmico, predomina a ação estabilizadora do glicerol.

O predomínio da estabilização acima de 45,9 °C estaria fundamentado no deslocamento do equilíbrio de estabilização morfológica do eritrócito do estado **R** para o estado **T**.

Porque o glicerol estabiliza os eritrócitos abaixo de 24,7 °C? Acreditamos que essa questão seja mais complexa, mas vamos tentar analisá-la. Para responder a questão é interessante entender o que está ocorrendo com a pressão osmótica e com as forças químicas que estabilizam a membrana à medida que a temperatura abaixa. Evidentemente, o abaixamento da temperatura diminuiria a pressão osmótica e desfavoreceria a estabilização do eritrócito pela exacerbação da **rota 2 (figura 10)**, segundo a qual a compactação decorrente do aumento da pressão osmótica levaria à estabilização do eritrócito. Uma das formas em que compactação estaria se manifestando seria a acentuação das forças atrativas de van der Waals no interior da membrana (**figura 10**). Mas a diminuição da temperatura diminui a energia vibracional e reforça as ligações não covalentes que estabilizam a estrutura da membrana, particularmente as forças atrativas de van der Waals, o que também contribuiria para compactação do eritrócito. É claro que isso dificulta a ação do caotrópica do etanol. De fato, os valores de D_{50} aumentaram significativamente com a diminuição da temperatura (**tabela 1**).

Considerações finais

É possível que o efeito estabilizante do glicerol possa ser justificado simplesmente por mudanças na estrutura da água. Como o glicerol forma mais ligações de hidrogênio com a água do que o etanol, sem causar a diminuição da constante dielétrica promovida pelo etanol, a estrutura da água deve ficar fortalecida na presença de glicerol, de tal forma a minimizar o efeito da temperatura sobre esse solvente. Essa explicação, contudo, não justifica a estabilização de eritrócitos descrita pelo etanol (Aversi-Ferreira, 2004; Gouvêa-e-Silva, 2006).

Nós podemos encontrar um argumento válido para discussão de nosso modelo no equilíbrio de desenovelamento de proteínas. A maior estabilidade do estado **T** em relação ao estado **R** dos eritrócitos pode ter uma explicação fundamentada na teoria da exclusão diferencial do osmólito, originalmente usada para explicar a estabilização de proteínas pelo glicerol (Gekko e Timasheff, 1981a; Gekko e Timasheff, 1981b; Timasheff e Arakawa, 1989; Timasheff, 1998; Fonseca et al., 2006). A exclusão do glicerol da camada de hidratação mais próxima da superfície do eritrócito, assim como ocorre com as proteínas, exigiria o gasto de uma quantidade maior de energia livre para sua hidratação, de tal forma que a presença do glicerol na solução envolveria uma elevação na energia livre de hidratação do eritrócito, tanto no estado **R** quanto no estado **T**. Mas, como o estado **T** tem uma menor superfície externa do que o estado **R**, ele deve exigir uma menor quantidade de energia livre para sua hidratação do que o estado **R**. Assim, a presença de glicerol estabilizaria o estado **T** em relação ao estado **R** aumentando a barreira de energia livre necessária para a interconversão daqueles estados, tornando mais provável a transição **R**→**T** do que a transição **T**→**R**.

Essa explicação, originalmente utilizada para justificar a estabilização do estado **N** em detrimento do estado **D** de proteínas, também já foi usada para justificar o efeito estabilizador de osmólitos sobre cromossomos (Gilles et al., 1999). Se a natureza usa os mesmos osmólitos para estabilização de diferentes complexos organizacionais biológicos (proteínas, cromossomos e membranas), isso de fato sugere que uma única explicação possa ser válida para justificar o efeito observado em todas as situações, pois a força hidrofóbica é o elemento

fundamental na geração e estabilização de todos aqueles diferentes complexos organizacionais biológicos.

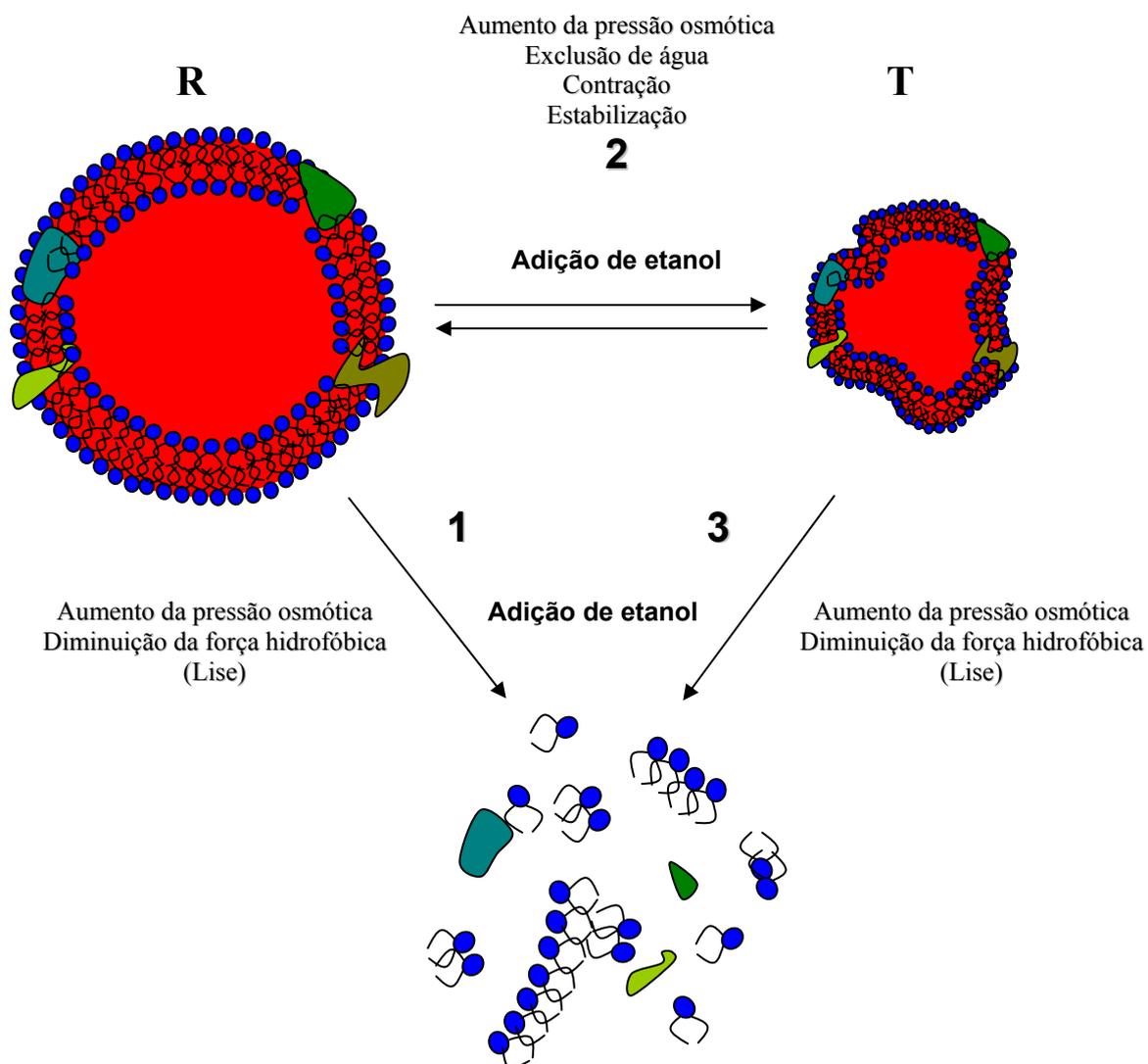


Figura 10 – Modelo ilustrativo das ações do etanol sobre os eritrócitos em NaCl a 0,9%. O eritrócito existiria num estado de equilíbrio entre dois estados morfológicos principais, um estado expandido (**R**) e um estado condensado (**T**). Concentrações mais baixas de etanol promoveriam a lise do estado **R** (**rota 1**). Concentrações intermediárias de etanol promoveriam o deslocamento do equilíbrio dos eritrócitos do estado **R** para o estado **T** (**rota 2**), por aumento da pressão osmótica. Concentrações mais substanciais de etanol levariam à lise do estado **T** (**rota 3**).

CONCLUSÕES

Na presença de NaCl a 0,9% o glicerol não apresenta ação caotrópica sobre eritrócitos, quando usado isoladamente no intervalo de concentração de 0 a 2,8 mol.L⁻¹. Mas na presença de NaCl a 0,9%, o glicerol a 1 mol.L⁻¹ apresenta um antagonismo dualístico de ação em relação à ação caotrópica do etanol. Entre 24,7 e 45,9 °C ele potencializa a hemólise promovida pelo etanol, mas fora desse intervalo de temperatura ele neutraliza a ação caotrópica do etanol sobre eritrócitos.

Em meio aquoso, os eritrócitos apresentam um processo de equilíbrio entre dois estados morfológicos, um estado expandido (**R**), de menor estabilidade, e um estado compactado (**T**), de maior estabilidade. Em meio de baixa osmolaridade predomina o estado **R**, bastante sensível a hemólise pela ação do etanol e da temperatura. Em meio de maior osmolaridade, predomina o estado **T**, mais estável, porém também sensível à ação caotrópica do etanol, da temperatura e da própria pressão osmótica.

REFERÊNCIAS

Aversi-Ferreira, T.A. Efeitos pós-natais do etanol sobre o desenvolvimento de neocórtex de ratos Wistar. Uberlândia, 2004, 70p. 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. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1280, n. 1, p. 73-80, 1996.

Bernardino, M.N. Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol. Uberlândia, 2006, 59p. Tese (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

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

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

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**, Amsterdam, The Netherlands, v. 339, p. 11-19, 1999.

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

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

Fonseca, L.C.; Corrêa, N.C.R.; Garrote-Filho, MS; Cunha, C.C.; Penha-Silva, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006.

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

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

Gilles, R.; Bourdouxhe-Housiaux, C.; Colson, P.; Houssier, C. Effect of compensatory organic osmolytes on resistance to freeze-drying of L929 cell and of their isolated chromatin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 122, p. 145-155, 1999.

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

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

Lee, J.C.; Timasheff, S.N. The stabilization of protein by sucrose. **J. Biol. Chem.** v. 256, n. 14, p. 7193-7201, 1981.

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

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

Nelson, D.L.; Cox, M.M.; **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3rd ed. New York: Worth, 2000. 1200 p.

Nozaki, Y.; Tanford C. The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale. **J. Biol. Chem.**, 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 protective effect of the trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 35, p. 173-186, 1997.

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

Tanford, C. The hydrophobic effect: formation of micelles in biological membranes. John Wiley, N.Y., 1973.

Timasheff, S.N. In disperse solution, "osmotic stress" in a restricted case of preferential interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 7363-7367, 1998.

Timasheff, S.N. The control of proteins stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 22, p. 67-97, 1993.

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

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

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

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

Wyman, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. **Adv. Protein Chem.**, n. 19, p. 223-286, 1964.

Wyman, J.; Gill, S.J. **Binding and Linkage**: functional chemistry of biological macromolecules. University Science Books, Mill Valley, 1990.

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.