



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

**INFLUÊNCIA DE COMBINAÇÕES DE DIFERENTES CAOTRÓPICOS NO
ESPECTRO VISÍVEL DA HEMOGLOBINA E NA ESTABILIDADE DE
MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Cleine Chagas da Cunha Arvelos**

UBERLÂNDIA, MG

2011

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

**INFLUÊNCIA DE COMBINAÇÕES DE DIFERENTES CAOTRÓPICOS NO
ESPECTRO VISÍVEL DA HEMOGLOBINA E NA ESTABILIDADE DE
MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

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

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

UBERLÂNDIA, MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A795i Arvelos, Cleine Chagas da Cunha, 1978-
Influência de combinações de diferentes caotrópicos no espectro visível
da hemoglobina e na estabilidade de membrana de eritrócitos humanos
[manuscrito] / Cleine Chagas da Cunha Arvelos. – 2011.

94 f. : il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.

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

Inclui bibliografia.

1. Membranas (Biologia) – Teses. 2. Hemoglobina - Teses. 3. Eritrócitos - Teses. 4. Álcool – Teses. 5. Uréia – Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 576.314

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

**INFLUÊNCIA DE COMBINAÇÕES DE DIFERENTES CAOTRÓPICOS NO
ESPECTRO VISÍVEL DA HEMOGLOBINA E NA ESTABILIDADE DE
MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Cleine Chagas da Cunha Arvelos**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:	Professor Dr. Nilson Penha-Silva (Orientador)	[UFU]
Examinador:	Professora Dra. Eneida de Paula	[UNICAMP]
Examinador:	Professora Dra. Neide Maria da Silva	[UFU]
Examinador:	Professor Dr. Fábio de Oliveira	[UFU]
Examinador:	Professora Dra. Júnia de Oliveira Costa	[UFU]

Data da defesa: **19/01/2011**

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

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

DEDICATÓRIA

*Ao meu filho Davi,
por me fazer conhecer um amor tão intenso e tão incondicional
e por me inspirar a construir um futuro melhor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ajudou a transpor todos os obstáculos, possibilitando a concretização de mais um sonho em minha vida;

Ao meu filho Davi, presente de Deus, fruto do meu amor, que me acompanhou em tempo integral nos estudos e pensamentos e trabalhou nesta missão durante nove meses em meu ventre, me cedendo aos momentos científicos nos seus primeiros meses de vida;

Ao meu esposo Kelson Arvelos, pelo amor, carinho e incentivo ao meu crescimento profissional. Obrigada por fazer parte da minha vida, acompanhar meus passos e vibrar com minhas conquistas. Também pela inestimável ajuda na estruturação final do trabalho;

Aos meus pais, verdadeiros mestres da minha vida, pelos incansáveis ensinamentos, presença constante, amor, incentivo, força e dedicação. Vocês são o alicerce da minha vida;

Aos meus irmãos e cunhados pela amizade, confiança e incentivo. Aos meus sobrinhos, pela alegria;

Ao meu orientador, Dr. Nilson Penha Silva, por acreditar em mim e me conduzir no mundo da pesquisa; pelo estímulo, força, companheirismo e ensinamentos indispensáveis não só na construção desse trabalho, mas também da minha vida profissional e pessoal;

Aos amigos do laboratório, pela colaboração e pelo carinho. Em especial, à Letícia Ramos de Arvelos, por dividir comigo a correria, o cansaço, os contratemplos, a ansiedade e as alegrias na realização dos ensaios biológicos e pelas indispensáveis sugestões, e ao Mário da Silva Garrote Filho, pelas reflexões e contribuições na compreensão e discussão dos resultados;

Aos voluntários, que se dispuseram a doar o sangue pela ciência. Sem a boa vontade e esforço de vocês o trabalho não se concretizaria;

Ao Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), pelas oportunidades a mim atribuídas, pela confiança, pelo estímulo à pesquisa e abertura de novos horizontes;

Aos docentes do Instituto de Genética e Bioquímica, pelos ensinamentos e construção dos saberes. Aos demais funcionários, pelo auxílio, disponibilidade, compreensão, palavras de incentivo e carinho.

APOIO

***COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL
SUPERIOR***



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU)



ÍNDICE

Abreviaturas	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	x
Apresentação	01
Capítulo 1 – Fundamentação Teórica.....	02
Estabilidade de proteínas	03
Estabilidade de membranas.....	07
Considerações finais	14
Referências.....	19
Capítulo 2 – Influência de combinações de diferentes caotrópicos no espectro visível da hemoglobina	31
Resumo.....	32
Abstract	33
Introdução	34
Material e Métodos	35
Resultados	37
Discussão	39
Conclusões	44
Referências.....	56
Capítulo 3 – Influência de combinações de diferentes caotrópicos na estabilidade de membrana de eritrócitos humanos	60
Resumo.....	61
Abstract	62
Introdução	63
Material e Métodos	64
Resultados	66
Discussão	67
Conclusão.....	70
Referências.....	80

ABREVIATURAS

A_1	Absorvância com valor mínimo de hemólise
A_2	Absorvância com valor máximo de hemólise
A_{540}	Absorvância a 540 nm
A_{630}	Absorvância a 630 nm
<i>BSA</i>	Albumina bovina sérica
<i>X</i>	Agente desnaturante
X_{50}	Concentração de agente desnaturante que causa 50% de hemólise
D_{50R}	Concentração de agente desnaturante que causa 50% de hemólise do estado R de eritrócitos
D_{50T}	Concentração de agente desnaturante que causa 50% de hemólise do estado T de eritrócitos
D_{50u}	Concentração de uréia que causa 50% de hemólise
D_{50e}	Concentração de etanol que causa 50% de hemólise
dX	Variação na concentração de agente desnaturante necessária para promover hemólise
<i>Estado D</i>	Estado desnaturado
<i>Estado N</i>	Estado nativo
<i>Estado R</i>	Estado relaxado, expandido de eritrócitos
<i>Estado T</i>	Estado tenso, compacto de eritrócitos
H_{50}	Concentração de NaCl que produz 50% de hemólise
<i>PUFA</i>	Ácido graxo poliinsaturado
<i>ROS</i>	Espécies reativas do oxigênio
<i>Salina</i>	Solução de NaCl a 0,9 g/dL ou 9 g/L
<i>SDS</i>	Duodecil-sulfato de sódio
<i>SFA</i>	Ácido graxo saturado
S_{50T}	Concentração de agente desnaturante que causa 50% de estabilização
<i>UFA</i>	Ácido graxo insaturado
<i>VIS</i>	Faixa de comprimento visível do espectro de luz

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Ilustração de moléculas de água formando uma camada de hidratação ao redor de uma proteína tanto no estado nativo (a) como no estado desenovelado (b)	15
Figura 1.2. Relações entre a estabilidade e a funcionalidade de uma membrana biológica com sua fluidez	16
Figura 1.3. Ações do etanol sobre eritrócitos em solução salina fisiológica	17
Figura 1.4. Dependência da lise de eritrócitos com a concentração de etanol.	18
Figura 2.1. Efeitos da uréia sobre a estabilidade de eritrócitos (A), de oxiemoglobina (B) e de metemoglobina (C), de origem humana, em 0,9 g/dL NaCl e em água	46
Figura 2.2. Efeitos da uréia sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) de origem humana	47
Figura 2.3. Efeitos do etanol e do etanol associado a 1,5 M de uréia sobre a estabilidade de eritrócitos (A), da oxiemoglobina (B) e da metemoglobina (C) de origem humana	48
Figura 2.4. Efeitos do etanol sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) de origem humana	49
Figura 2.5. Efeitos do etanol associado a 1,5 M de uréia sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) de origem humana	50
Figura 2.6. Efeitos do etanol sobre a estabilidade da oxiemoglobina (A e B) e da metemoglobina (C e D) de origem humana	51
Figura 2.7. Efeito do etanol sobre o espectro visível da oxiemoglobina de origem humana	52
Figura 2.8. Efeitos de diferentes concentrações de NaCl na ausência e na presença 1 M de uréia sobre a estabilidade de eritrócitos (A), da oxiemoglobina (B) e da metemoglobina (C) de origem humana	53
Figura 2.9. Efeitos de diferentes concentrações de NaCl sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) de origem humana	54
Figura 2.10. Efeitos de diferentes concentrações de NaCl associadas a 1,5 M de uréia sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) de origem humana	55

Figura 3.1.	Efeito da temperatura na curva de lise de eritrócitos humanos por uréia.	74
Figura 3.2.	Dependência dos valores de meia-transição de hemólise por uréia (D_{50u}) com a temperatura.	75
Figura 3.3.	Efeito da adição de uréia na curva de lise de eritrócitos humanos por etanol.	76
Figura 3.4.	Dependência dos valores de meia-transição de hemólise por etanol (D_{50e}) com a concentração de uréia.	77
Figura 3.5.	Efeito da adição de uréia na lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico.	78
Figura 3.6.	Dependência dos valores de meia-transição de hemólise por estresse hipotônico (H_{50}) com a concentração de uréia.	79

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 3.1 Efeito da temperatura no ponto de meia-transição (D_{50u}) da lise de eritrócitos humanos por uréia.	71
Tabela 3.2 Efeito da concentração de uréia no ponto de meia-transição (D_{50e}) da lise de eritrócitos humanos por etanol a 37 °C.	72
Tabela 3.3 Efeito da concentração de uréia no ponto de meia-transição (H_{50}) da lise de eritrócitos por estresse hipotônico a 37 °C	73

APRESENTAÇÃO

A estabilidade de membrana é a propriedade desse complexo biológico em manter sua estrutura diante de condições ou agentes que favoreçam sua desintegração.

Os agentes que promovem a desagregação da membrana induzem um estado de desorganização ou caos, pelo qual eles têm maior afinidade; eles são chamados de agentes caotrópicos. Dentre os agentes caotrópicos, podemos citar o estresse hipotônico, os extremos de pH, o calor e uma série de solutos como o etanol, a uréia e o hidrocloreto de guanidina.

Os agentes ou condições que aumentam a estabilidade de uma membrana biológica são chamados de estabilizadores. Eles compreendem a isotonicidade, o pH ótimo, a temperatura ótima e uma série de solutos estabilizantes como o glicerol e o sorbitol, genericamente referidos na literatura como osmólitos.

O Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia tem focado suas pesquisas na avaliação dos efeitos de agentes caotrópicos e osmólitos sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos.

A estabilidade da membrana tem sido monitorada pela taxa de hemólise, a qual é determinada pela liberação de hemoglobina, cuja concentração é medida por espectrofotometria visível a 540 nm, uma das regiões do espectro onde a hemoglobina apresenta um pico de absorvância.

Como as proteínas também são afetadas por agentes caotrópicos e estabilizantes, é preciso investigar a influência desses agentes sobre o comportamento espectral da hemoglobina. Mudanças espectrais em 540 nm associadas à curva de hemólise poderiam ser decorrentes de alterações na hemoglobina e não à lise de eritrócitos.

Entender a natureza das interações entre os componentes de dispersões de eritrócitos em soluções aquosas de agentes estabilizantes e caotrópicos pode permitir escolhas racionais de solventes para estabilização de células e proteínas, durante o armazenamento em solução líquida ou congelada e mesmo na formulação de produtos farmacêuticos.

É dentro desse contexto que essa tese faz uma revisão a respeito da estabilização e desnaturação de proteínas e membranas em soluções aquosas (**capítulo 1**) e apresenta os resultados obtidos a respeito da influência de combinações de diferentes caotrópicos sobre o espectro visível de hemoglobina humana (**capítulo 2**) e sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos (**capítulo 3**).

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Estabilidade de proteínas

As proteínas são moléculas orgânicas de alto peso molecular, formadas pela junção de aminoácidos por ligação peptídica. Elas representam cerca de 50 a 80% do peso seco da célula. Elas são fundamentais para os seres vivos e podem desempenhar diversas funções: sustentação estrutural, catálise, hormonal, defesa, nutrição, coagulação sanguínea e transporte, dentre outras.

As proteínas apresentam organização molecular em quatro níveis: primário, secundário, terciário e quaternário. A estrutura primária é caracterizada pela sequência de aminoácidos unidos entre si através das ligações peptídicas. A estrutura secundária refere-se à configuração espacial da cadeia polipeptídica em torno de uma única dimensão do espaço. A estrutura secundária mais comum em proteínas animais é a α -hélice. A estrutura terciária ocorre quando a proteína se enovela em torno das três dimensões do espaço. E a estrutura quaternária é constituída pela associação de duas ou mais subunidades protéicas, como ocorre na molécula da hemoglobina [NELSON e COX, 2005].

As proteínas podem sofrer alterações físico-químicas que levam a modificação ou perda de sua atividade.

A capacidade de uma proteína ou outro complexo biológico em manter sua estrutura é chamada de estabilidade.

O controle da estabilidade de uma proteína é muito importante para garantir sua atividade biológica. Vários fatores podem atuar ao mesmo tempo para favorecer a manutenção da estrutura tridimensional das proteínas: tipo de aminoácido que compõe a cadeia polipeptídica, interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e ligações dissulfeto [NOSOH e SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN e TOOZE, 1991].

A natureza do aminoácido pode alterar a flexibilidade da cadeia polipeptídica, alterando assim a estabilidade da proteína. A glicina aumenta a flexibilidade, enquanto a prolina [BRANDEN, TOOZE, 1991; FIELDS, 2001; FIELDS, SOMERO, 2001] e a alanina [NOSOH, SEKIGUCHI, 1990] são responsáveis por uma maior rigidez da cadeia.

A interação ou força hidrofóbica tem base na repulsão entre cadeias laterais de aminoácidos apolares e as moléculas de água [TANFORD, 1962]. Em meio aquoso, a cadeia polipeptídica se enovela protegendo essas cadeias laterais hidrofóbicas do

contato com a água [NOSOH, SEKIGUCHI, 1990]. Assim, a interação ou força hidrofóbica auxilia na manutenção da estabilidade da proteína.

As interações eletrostáticas também estão associadas à manutenção da estabilidade de uma proteína. Elas são resultantes das cargas elétricas das cadeias laterais polares ionizáveis de alguns aminoácidos. Cargas elétricas isoladas ou em pares de mesmo sinal geram repulsão e tendem a desestabilizar a proteína. Cargas elétricas de sinais contrários se atraem e, conseqüentemente, aumentam a estabilidade da proteína [NOSOH, SEKIGUCHI, 1990].

As pontes de hidrogênio entre constituintes da cadeia polipeptídica tornam as proteínas mais estáveis por substituírem aquelas formadas com as moléculas de água [NELSON; COX, 2005] e as pontes dissulfeto por diminuírem a mobilidade da cadeia polipeptídica [NOSOH, SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN, TOOZE, 1991].

A estrutura da proteína é um fator muito importante em sua atividade, pois se ela é alterada a proteína torna-se inativa. Esse processo de alteração da forma da proteína é denominado desnaturação. A desnaturação é um processo geralmente irreversível que consiste no comprometimento das estruturas quaternária, terciária, secundária e até mesmo primária de uma proteína.

Assim, uma proteína pode estar no estado nativo (N), em que apresenta a função para a qual foi produzida, ou no estado desnaturado (D), em que não apresenta uma função específica, embora ainda seja uma fonte de aminoácidos, que podem ser usados no catabolismo energético e em vários processos de biossíntese [NELSON e COX, 2005].

Em soluções essencialmente aquosas, o estado desenovelado deveria prevalecer sobre o estado nativo por ter entropia conformacional mais elevada [TANFORD, 1962; TANFORD, 1963; NOZAKI e TANFORD, 1963; TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989]. Porém, o estado N tende a prevalecer sobre o estado D. Tal fato se deve à interação da proteína com as moléculas de água [TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989]. Em meio aquoso as moléculas de água se organizam em camadas de hidratação ao redor das proteínas. Como mostra a **Figura 1.1**, no estado D há maior superfície de exposição ao solvente e a energia requerida para sua hidratação é maior. O estado N é favorecido por ter menor superfície exposta ao solvente e, portanto, por necessitar de menos energia para sua hidratação [FONSECA *et al.*, 2006].

A baixa entropia conformacional do estado N é compensada pela menor energia livre de hidratação. Assim, o estado N é favorecido e mais estável em meio essencialmente aquoso [TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989].

Vários fatores, como temperatura, pH e a presença e concentração de solutos podem afetar o equilíbrio N-D, promovendo estabilização (do estado N) ou desnaturação [FONSECA *et al.*, 2006].

O calor aumenta a entropia vibracional dos grupamentos da proteína, o que favorece a ruptura das ligações não covalentes que estabilizam o estado N, promovendo sua desnaturação. A quebra de ligações pela 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, o que poderia ser a base da compensação entalpia-entropia verificada para os processos de desnaturação térmica de proteínas [COOPER, 1999].

O pH é determinado pela concentração relativa dos íons H^+ de uma solução e sua mudança afeta o equilíbrio de ionização de grupos ácidos e básicos de uma proteína. Desse modo, mudanças no pH vão afetar a distribuição de cargas de uma proteína e, conseqüentemente, as interações eletrostáticas entre grupos da proteína, entre a proteína e o solvente e entre as próprias moléculas do solvente [DILL e SHORTLE, 1991; TANFORD, 1962; YANG e HONIG, 1992; CHI *et al.*, 2003].

A presença de solutos pode afetar o equilíbrio entre os estados N e D. Os solutos caotrópicos tais como uréia e hidrocloreto de guanidina favorecem o estado D e podem, assim, comprometer a atividade biológica da proteína. A ação caotrópica da uréia pode ser decorrente da redução do efeito hidrofóbico (efeito direto) [BRESLOW e GUO, 1990] e da redução do custo energético envolvido na formação da camada de hidratação em torno da proteína (efeito indireto) [NOZAKI e TANFORD, 1963; TSAI, GERSTEIN e LEVITT, 1996]. O mecanismo direto resulta da interação da uréia com componentes polares e não-polares da proteína [BENNION, DAGGETT, 2003; HUA *et al.*, 2008], favorecendo a desenovelamento da proteína. No mecanismo indireto a uréia deslocaria moléculas da camada de água e, possivelmente, formaria cavidades, denominadas clatratos, delimitadas por moléculas de água no próprio solvente. Proteínas e/ou peptídeos poderiam se encaixar nessas cavidades com menor custo energético [TSAI, GERSTEIN e LEVITT, 1996]. Assim, o deslocamento de moléculas da camada de hidratação e/ou a formação de clatratos diminuiriam o custo energético

para a formação da camada de hidratação, favorecendo o estado D [TAYLOR *et al.*, 1995].

Porém, o mecanismo de ação desses caotrópicos ainda permanece controverso [NOZAKI e TANFORD, 1963; TIMASHEFF, 1998; BENNION e DAGGETT, 2003; SCHELLMAN, 1978; CAMILLONI *et al.*, 2008; ALMARZA *et al.*, 2009; ROSSKY, 2008].

Outro potencial agente caotrópico é o etanol. Ao se misturar com a água, ele acomoda melhor no solvente os grupos apolares da proteína, reduzindo a força hidrofóbica e favorecendo o estado desnaturado [WANG, ROBERTSON e BOLEN, 1995].

Assim, os caotrópicos tendem a favorecer o estado desnaturado de uma proteína por reduzir a energia livre do estado D em relação ao estado N.

Os osmólitos são moléculas de baixo peso molecular que favorecem as proteínas no estado nativo. O mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Os modelos encontrados na literatura inferem que os osmólitos são excluídos da superfície da proteína porque interagem de forma desfavorável com o esqueleto peptídico dela [ATTRI, VENKATESU, LEE, 2010]. Como a exposição do esqueleto peptídico é maior no estado D, tal estado seria desfavorecido pelo aumento de energia livre [LIU, BOLEN, 1995]. Quando os osmólitos são excluídos, eles deixam para trás uma camada de moléculas de água ao redor da proteína [GEKKO, TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF, ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; TIMASHEFF, 2002]. A formação dessa camada de hidratação envolve gasto de energia. Quanto maior a proteína maior será a camada de hidratação e, conseqüentemente, maior o custo energético. Isso faz com que as proteínas do estado N sejam mais estáveis porque, em geral, são mais compactas do que aquelas no estado D [ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; BASKAKOV, BOLEN, 1998; TIMASHEFF, 2002].

A estabilização e a desnaturação de proteínas são temas de grande interesse fisiológico [STOREY, 1996], terapêutico [WELCH e BROWN, 1996; BROWN, HONG-BROWN e WELCH, 1997] e biotecnológico [PANEK, 1995 e LEE, 2000]. A natureza complexa da estabilização e desnaturação de proteínas tem sido revista em vários trabalhos [KAUZMANN, 1959; TANFORD, 1968; PRIVALOV e GILL, 1988; DILL e SHORTLE, 1991; TIMASHEFF, 1998; SHELLMAN, 2002; FONSECA *et al.*, 2006].

Estabilidade de membranas

As membranas são componentes importantes de todas as células. A membrana plasmática serve como barreira de permeabilidade, permitindo à célula manter uma composição diferente nos meios intra e extracelular. A membrana plasmática também contém enzimas, receptores e antígenos que interagem com a matriz extracelular, com outras células, com hormônios e outros agentes reguladores no líquido extracelular. As membranas também delimitam as organelas, dentro das quais ocorrem processos químicos específicos [BERNE et al, 2004].

Os constituintes mais abundantes nas biomembranas são proteínas e lipídios. Dentre os lipídios se destacam os fosfolipídios. O fosfolipídio possui um grupo terminal polar e duas cadeias não-polares e hidrofóbicas de ácidos graxos. No meio aquoso, os fosfolipídios tendem a manter suas cadeias polares expostas e orientar suas cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos para longe do contato com a água [BOON, SMITH, 2002]. Assim, quando dispersos em água, eles formam de modo espontâneo uma bicamada lipídica.

As proteínas são também abundantes nas membranas na forma de proteínas integrais ou periféricas [LAGUE et al., 2001]. As proteínas periféricas associam-se às membranas por intermédio de interações eletrostáticas com as proteínas integrais. Em situações em que a composição do meio é alterada, as proteínas periféricas são muitas vezes removidas da membrana. As proteínas integrais estão embebidas nas membranas por intermédio de interações hidrofóbicas com o interior da membrana. Tais interações podem ser quebradas por detergentes, os quais solubilizam as proteínas integrais, interagindo hidrofobicamente com as cadeias laterais não-polares dos aminoácidos [BERNE et al, 2004].

O “modelo de mosaico fluido” foi proposto para descrever a estrutura das membranas. Como o modelo sugere, as membranas celulares são estruturas fluidas e muitos de seus constituintes estão livres para sofrerem difusão lateral no plano da membrana [FRICK et al., 2007; SINGER, 1974], além de translação e rotação ao redor do próprio eixo [GOLDSTEIN, 1984]. Tal processo ocorre em decorrência da presença de ligações fracas entre as moléculas (ligações de van der Waals e pontes de hidrogênio) e ausência de ligações fortes (covalentes) [MURRAY, GRANNER, 2002]. Já o movimento entre monocamadas acontece em frequências muito baixas e é limitado para componentes hidrofílicos pelo interior não-polar da dupla camada lipídica

As membranas biológicas são complexos organizacionais que devem manter suas estruturas para preservação de suas funções. É através da manutenção de características próprias das membranas, como fluidez e estabilidade, que a célula suporta estresses externos e garante sua integridade e funcionalidade.

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 fluidez é essencial para várias funções celulares [GARCÍA *et al.*, 2005]. Ela aumenta à medida que se vai do estado sólido para o estado líquido.

A organização de uma membrana biológica exige um nível intermediário de fluidez, entre o estado sólido e o estado líquido, que pode ser designada de fluidez crítica (**Figura 1.2**).

A membrana deve congrega a estabilidade necessária para sua preservação com um nível de elasticidade necessário para que as células sofram as alterações conformacionais exigidas pelo exercício de funções complexas, como a transdução de sinais hormonais para moléculas no interior da célula, onde elas vão regular funções celulares relacionadas com o metabolismo, a diferenciação e a proliferação [SINENSKY, 1974].

Assim, tanto aquém quanto além da fluidez crítica, a membrana perde estabilidade e funcionalidade. Os prejuízos à funcionalidade não são somente determinados pelas situações externas extremas. Uma diminuição ou aumento exagerado no teor de colesterol pode levar a disfunções nas células [CALISKAN *et al.*, 2000].

O controle da fluidez crítica depende de mecanismos homeostáticos como o balanço na razão do teor de colesterol e ácidos graxos saturados (SFA) de fosfolípidos em relação ao teor de ácidos graxos insaturados (UFA) de fosfolípidos [CRIBIER *et al.*, 1993]. A magnitude da atração entre os ácidos graxos saturados é maior do que entre os insaturados. Uma elevação nos teores de ácidos graxos insaturados (nos fosfolípidos) aumenta a fluidez das membranas enquanto uma elevação no teor de ácidos graxos saturados e de colesterol reduz a fluidez das membranas. Um aumento excessivo no teor de UFA e/ou uma diminuição exagerada no teor de colesterol pode promover fusão da membrana, tornando-a sujeita à lise por fusibilidade. Por outro lado, um aumento excessivo no teor de SFA e/ou de colesterol vai promover rigidificação de membrana, tornando-a sujeita à lise por friabilidade (**Figura 1.2**).

Fatores ambientais também interferem na estabilidade e funcionalidade das membranas. Entre os fatores ambientais importantes estão as espécies reativas do oxigênio (ROS). O superóxido, produzido na mitocôndria, pode ser convertido pela catalase em peróxido de hidrogênio, o qual pode formar em diferentes locais do organismo o radical hidroxila, que vai ativar cascatas de lipoperoxidação [HENSLEY *et al.*, 2000; GONSETTE, 2008]. Quando as ROS são formados em quantidade que excede as defesas antioxidantes, eles geram um estado chamado de estresse oxidativo e promovem danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídios [GILGUN-SHERKI *et al.*, 2004].

Dessa forma, as ROS constituem uma ameaça às membranas biológicas. Os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) de membranas constituem as estruturas mais vulneráveis a esses danos, sendo alvo do processo de lipoperoxidação [BEGUM; TERAQ, 2002]. Tal processo determinará redução na fluidez e comprometimento das funções celulares.

O calor é outro agente que também aumenta a fusibilidade de membrana (**Figura 1.2**). Em organismos endotérmicos o calor não produz impacto importante sobre a estabilidade de membrana, diferentemente de organismos ectotérmicos. Para controle da fluidez crítica de suas membranas, microorganismos que têm seu ‘habitat’ em regiões de altas temperaturas têm maior teor em ácidos graxos saturados em seus fosfolipídios de membrana do que organismos que vivem sob temperaturas mais amenas [YATVIN, 1977].

Outro fator ambiental importante é a presença de solutos estabilizantes e desestabilizantes. Tais solutos mudam o comportamento físico-químico das membranas. O efeito de solutos na estabilidade de membrana tem sido estudado em eritrócitos humanos. Tal comportamento tem sido analisado através de experimentos que incluem o choque hipotônico [JAIN, 1986; CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2010, MASCARENHAS-NETTO, 2009] e a ação de solutos estabilizantes e caotrópicos como o etanol (associado ou não a outros solutos) [GOUVÊA-E-SILVA, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008; ARVELOS, 2010].

A produção e concentração de solutos orgânicos de baixa massa molecular, denominados osmólitos é uma estratégia biológica de manutenção da estabilidade celular amplamente preservada em diferentes tipos de organismos [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; BOLEN, 2004].

A osmoestabilização é uma estratégia 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 1.3**) [AVERSI-FERREIRA, 2004; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008]. O que motivou a idealização do modelo foi o padrão de dependência da percentagem de lise de eritrócitos humanos em função da concentração de etanol (**Figura 1.4**).

Com um aumento moderado na concentração de etanol, os eritrócitos do estado **R** poderiam sofrer lise (rota 1 da **Figura 1.3**), segundo uma curva sigmoideal crescente caracterizada pelo seu ponto de meia-transição, D_{50R} (**Figura 1.4A**). Com um aumento mais expressivo na concentração de etanol, os eritrócitos sofreriam estabilização (rota 2 da **Figura 1.3**), com geração do estado **T**, segundo uma curva sigmoideal decrescente caracterizada pelo seu ponto de meia-transição, S_{50T} (**Figura 1.4B**). Um aumento ainda mais expressivo na concentração de etanol levaria à lise do estado **T** dos eritrócitos (rota

3 da **Figura 1.3**), segundo uma curva crescente de transição sigmoideal caracterizada pelos valores de D_{50T} (**Figura 1.4B**) [AVERSI-FERREIRA, 2004; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

O tipo de rota a ser ativado 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 1.3**). Possivelmente, a lise do estado **R** do eritrócito, promovida pela ação do etanol, se deve à desnaturação da membrana. 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]. A ação sobre a 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].

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 1.3**). 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 1.4B**). 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 1.3**), a lise do estado **T** dos

eritrócitos, promovida pela alta pressão osmótica e a ação caotrópica do etanol (**Figura 1.4B**).

A temperatura pode interferir sobre os três estados dos eritrócitos, pela clássica ação 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. Como 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 [CUNHA *et al.*, 2007].

O hidrocloreto de guanidina e a uréia são também agentes caotrópicos. É provável que eles reproduzam o mesmo comportamento do etanol mostrado na **Figura 1.3**. Arvelos [2010] evidenciou o comportamento do agente caotrópico hidrocloreto de guanidina sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos, na ausência e na presença de outras condições caotrópicas, como etanol, temperatura e hipotonicidade. De fato, como era esperado, as combinações de hidrocloreto de guanidina com calor e etanol produziram sempre efeitos caotrópicos sinérgicos sobre a lise de eritrócitos.

O duodecil-sulfato de sódio (SDS) é um caotrópico com ação detergente. Ele promove desnaturação de proteínas [TANFORD, 1968; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2005; LIU *et al.*, 2007] e de membranas biológicas [HELENIUS e SIMONS, 1975]. A hemólise promovida por surfactantes pode ocorrer por lise osmótica e por solubilização da membrana [BIELAWISKI, 1990; ISOMAA, 1979; MAHER e SINGER, 1984; SHALEL *et al.*, 2002]. Embora a lise de eritrócitos por detergentes seja trivialmente estudada na ausência de reconstituição da concentração de albumina do sangue, a presença de concentrações de albumina da ordem daquela presente no plasma humano mostrou uma forte ação protetora devida a sua capacidade em ligar as moléculas do detergente [FONSECA, 2010; FONSECA *et al.*, 2010].

A composição, estrutura e comportamento das membranas também podem ser modificados em função de processos fisiológicos e patológicos. O estudo das membranas dos eritrócitos reflete as mudanças que estão ocorrendo também em outras membranas do organismo.

Fatores como volume, tamanho e 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].

A estabilidade de membrana também depende da intensidade e velocidade de degeneração de seus constituintes estruturais pelas agressões advindas do ambiente e do próprio metabolismo celular. O envelhecimento leva a alteração na composição de fosfolipídios e no padrão de assimetria da membrana de eritrócitos [RIFKIND *et al.*, 1983], o que pode afetar as propriedades elétricas da membrana e o equilíbrio entre célula e o meio [MUTUS *et al.*, 2000]. O teor de ácidos graxos insaturados diminui [PRISCO *et al.*, 1991; BECKMAN, AMES, 1998] e o de ácidos graxos saturados aumenta com a idade [PRISCO *et al.*, 1991]. De fato, uma maior estabilidade dos eritrócitos foi encontrada contra estresse hipotônico e desnaturação por etanol com o aumento da idade [PENHA-SILVA *et al.*, 2007].

A vinculação da inflamação com a patogênese da esclerose múltipla suscitou na literatura a iniciativa de investigar o uso de estatinas no tratamento da doença, dadas as propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras descritas para aquelas drogas em adição aos seus reconhecidos efeitos no abaixamento da colesterolemia. As estatinas parecem interferir na composição e comportamento de membranas. Em seu estudo, De Freitas *et al.* [2010] mostrou que portadoras de esclerose múltipla que não faziam uso de sinvastatina apresentaram eritrócitos menos estáveis contra hipotonicidade e contra a ação do etanol que as voluntárias sem a doença. O uso da estatina elevou a estabilidade de eritrócitos contra etanol em portadoras de esclerose múltipla, tornando-a semelhante àquela das voluntárias sem a doença.

Alterações nos lipídios de membrana dos eritrócitos (maiores quantidades de lipídios totais e colesterol) foram relatadas há muitos anos em pacientes esquizofrênicos e depressivos [STEVENS, 1972]. Mais recentemente, o aumento na estabilidade de eritrócitos foi relacionado com fatores que desencadeariam os processos depressivos, tais como a hiper-homocisteinemia [MASCARENHAS NETTO, 2009]. A associação entre o aumento na estabilidade de membrana observada neste trabalho e a elevação na homocisteinemia seria a ocorrência de mudanças na composição lipídica da membrana, com aumento na proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados. Embora nenhuma mudança comparável tenha sido observada em hemácias de indivíduos com distúrbio bipolar [SENGUPTA *et al.*, 1981], parece haver associação entre distúrbios psiquiátricos e estrutura e composição da membrana de eritrócitos.

Uma relação entre a estabilidade de membrana de eritrócitos também foi encontrada com a entropia aproximada do tremor fisiológico [MANSUR *et al.*, 2010].

Na condição de obesidade e sobrepeso ocorre aumento da geração de espécies reativas do oxigênio o que também está associado com mudanças nas propriedades físico-químicas das membranas. Indivíduos obesos ou com sobrepeso, em comparação com indivíduos magros, apresentam menor hemólise das hemácias induzida por radicais livres e menor relação entre glutatona reduzida e oxidada, enquanto a taxa de danos causados pelos radicais livres foi aumentada; o conteúdo de fosfolipídios também diminuiu; a relação entre colesterol e fosfolipídios aumentou e houve redução da fluidez da membrana [CAZZOLA *et al.*, 2004].

Alterações na estrutura, composição e comportamento da membrana dos eritrócitos também acontecem em diversos tipos de hemoglobinopatias, exercícios físicos, dieta, ingestão de etanol e interação com praguicidas [BATISTA *et al.*, 2006; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; MARIGLIANO *et al.*, 1999; MAZZANTI *et al.*, 2002; PENHA-SILVA *et al.*, 2007; SRINIVASAN, KEMPAIAH, 2006; FONSECA, 2010; FONSECA *et al.*, 2010].

Considerações finais

A composição e estrutura da membrana de eritrócitos refletem, em alguma extensão, processos que também estariam ocorrendo em vários outros lugares no organismo. Por essa razão e por causa de sua disponibilidade é que as membranas de eritrócitos têm sido freqüentemente usadas como modelo de estudo de processos físico-químicos, fisiológicos e patológicos.

Além disso, as implicações da adição de solventes orgânicos na estrutura de proteínas e membranas podem ter aplicações práticas tanto no laboratório de pesquisa quanto na indústria. O exemplo mais amplamente conhecido dessa aplicabilidade é a osmoestabilização de eritrócitos e hemoderivados.

Entretanto, uma compreensão inequívoca da influência da composição do meio sobre a estabilidade de eritrócitos humanos exige necessariamente a compreensão da influência desse meio no comportamento das proteínas do plasma e dos eritrócitos.

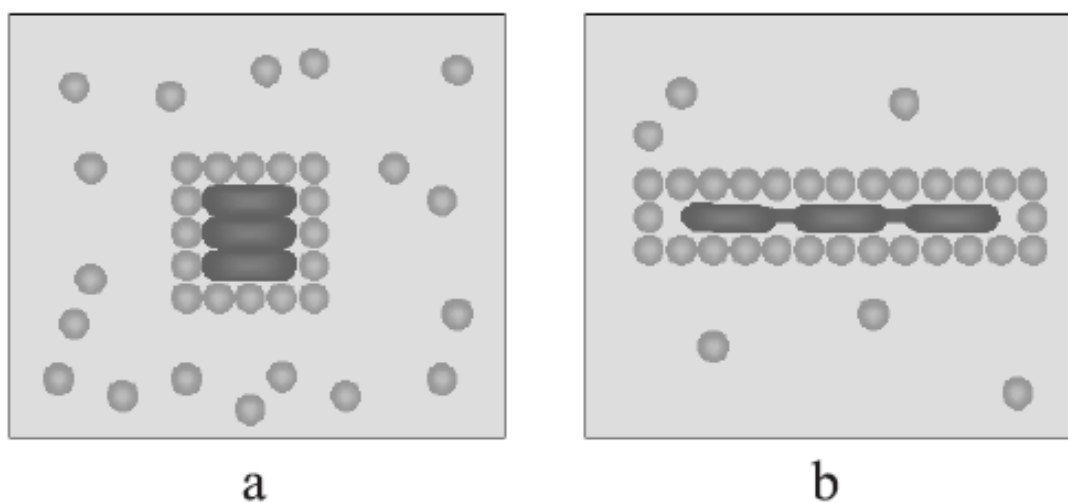


Figura 1.1. Ilustração de moléculas de água (esferas em cinza) formando uma camada de hidratação ao redor de uma proteína (estruturas retangulares escuras) tanto no estado nativo (**a**) como no estado desenovelado (**b**). Pode-se perceber que no estado nativo, por estar mais compactada, a superfície da proteína em contato com o solvente é menos extensa e, conseqüentemente, a camada de hidratação que se forma ao redor desse estado é menor que a formada ao redor do estado desenovelado [FONSECA *et al.*, 2006].

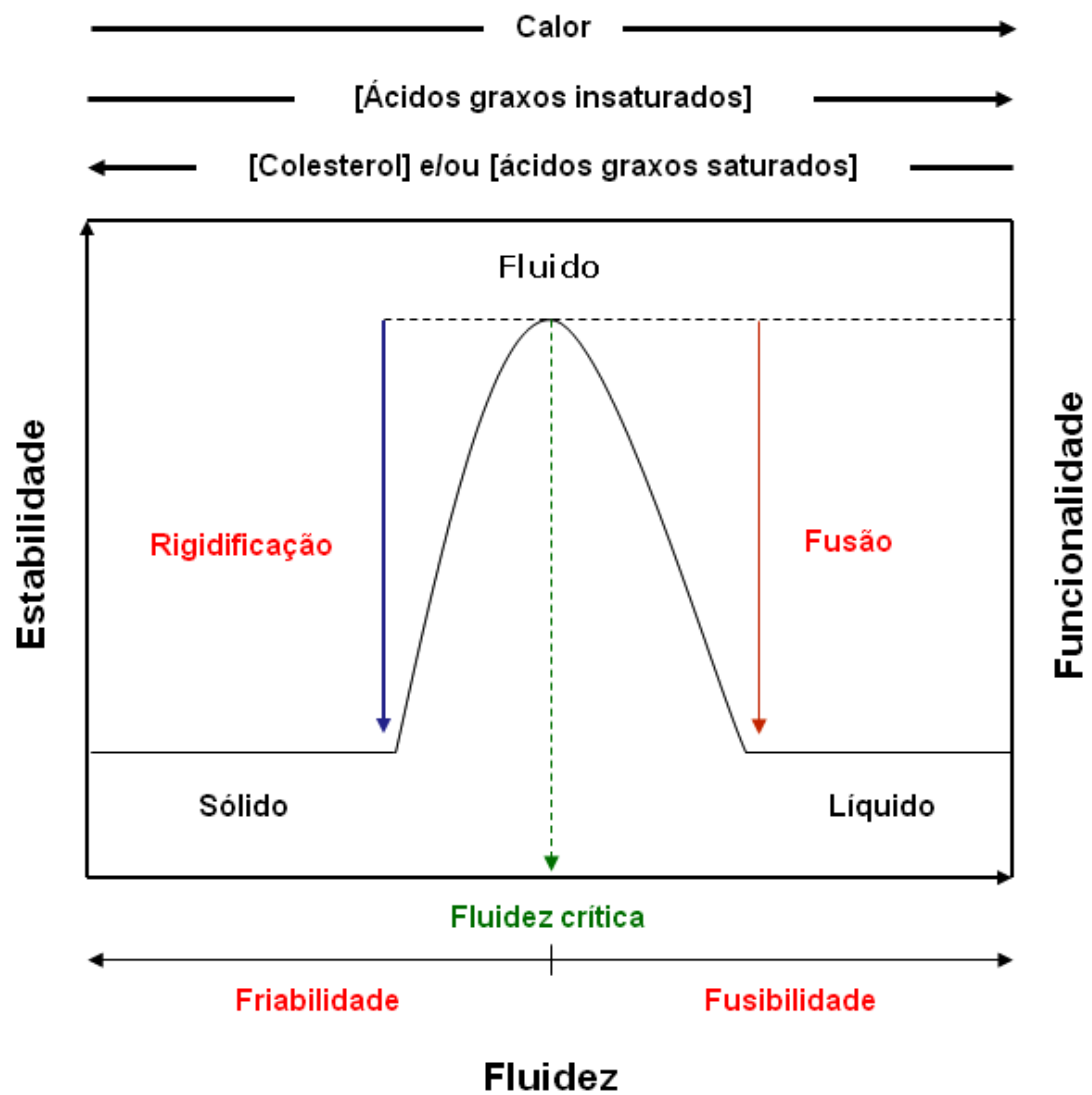


Figura 1.2. Relações entre a **estabilidade** e a **funcionalidade** de uma membrana biológica com sua **fluidez**.

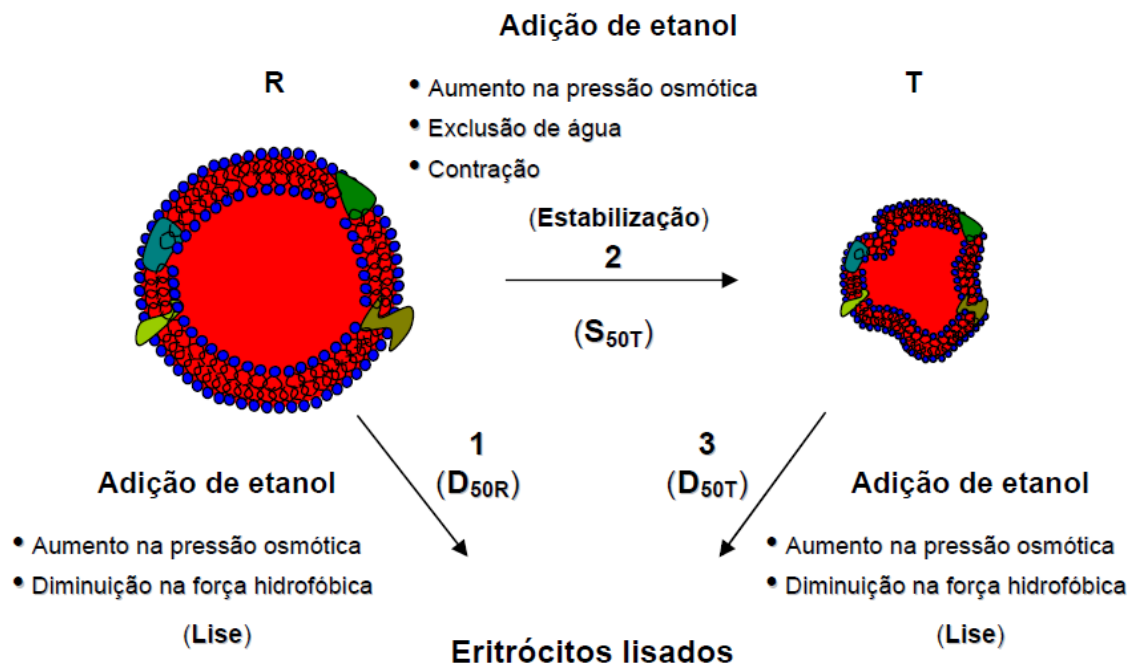


Figura 1.3. Ações do etanol sobre eritrócitos em solução salina fisiológica. Os eritrócitos existiriam em um estado morfológico expandido (**R**) e em um estado condensado (**T**). Cada estado morfológico seria constituído por um conjunto de diferentes formas. Baixas concentrações de etanol causariam 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) [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

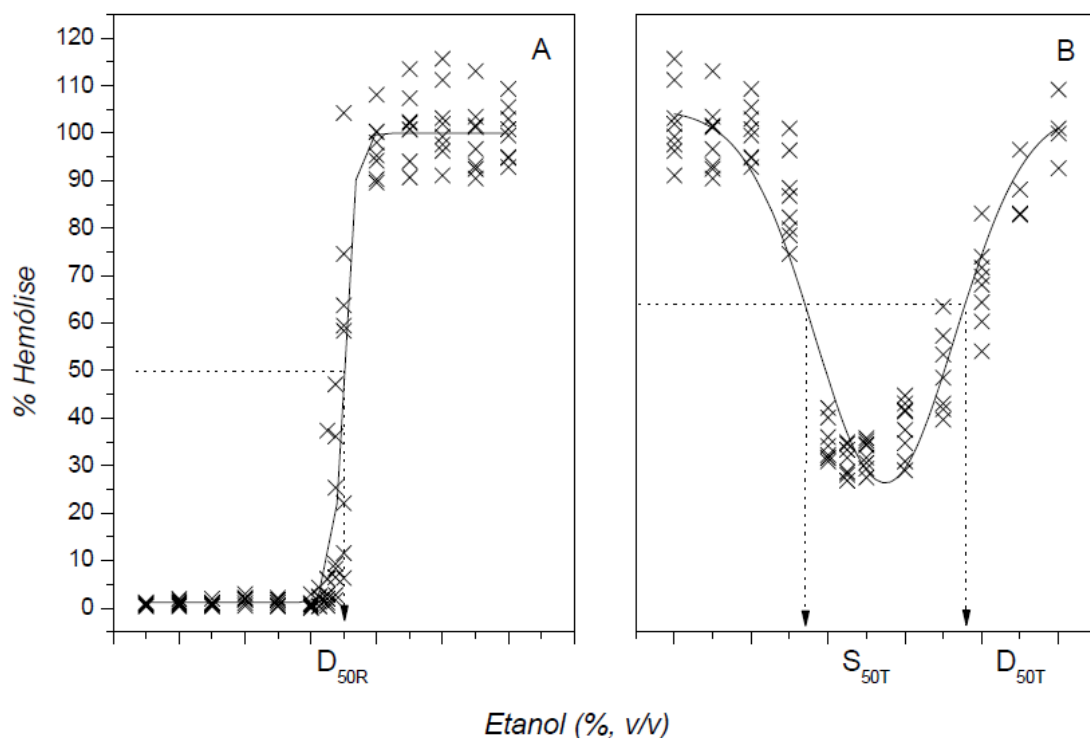


Figura 1.4. Dependência da lise de eritrócitos com a concentração de etanol. Condições experimentais: em solução salina fisiológica e a 37 °C. A lise por etanol do estado **R** dos eritrócitos, caracterizada pela concentração de etanol que promove 50% de lise (D_{50R}) do estado **R**, está mostrada 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; CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

REFERÊNCIAS

ALMARZA, J.; RINCON, L.; BAHASAS, A.; BRITO, F. Molecular Mechanism for the Denaturation of Proteins by Urea. **Biochemistry**, v. 48, n. 32, p. 7608–13, 2009.

ARVELOS, L.R. **Efeitos de combinações dos agentes caotrópicos calor, hipotonicidade, hidrocloreto de guanidina e etanol na estabilidade de membrana de eritrócitos humanos**. Uberlândia, 2010. 62f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

ATTRI, P.; VENKATESU, P.; LEE, M.J. Influence of Osmolytes and Denaturants on the Structure and Enzyme Activity of r-Chymotrypsin. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 114, p. 1471-1478, 2010.

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.

BASKAKOV, H.; BOLEN, D. W. Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 273, n. 9, p. 4831-4834, 1998.

BATISTA, M.T.A.; RODRIGUES, H.G.; FONSECA, L.C.; BONETTI, A.M.; PENHA-SILVA, N.; NERES, A.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3 (supl.), n. 2, p. 22-24, 2006.

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

BEGUN, A.N.; TERAOKA, J. Protective effect of α -tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, p. 398-403, 2002.

BENNION, B.J., DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 5142–47, 2003.

BERNARDINO NETO, M. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. Uberlândia, 2006. 66f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Nilson Penha-Silva (Orientador).

BERNE R.M., LEVY, M.N., KOEPPEN, B.M., STANTON, B.A. **Physiology**. 5th ed. St Louis: Mosby, 2004.

BIELAWSKY, J. Two types of haemolytic activity of detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1035, p. 214-217, 1990.

BOLEN, D.W. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. **Methods**, v. 34, p. 312-322, 2004.

BOLEN, D.W.; BASKAKOV, I.V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, p. 955-963, 2001.

BOON, J.M.; SMITH, B.D. Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 3, p. 251-281, 2002.

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, 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, p. 137-151, 1979.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Prediction, engineering, and design of protein structures. In: _____. **Introduction to Protein Structure**. Nova York e Londres: Garland Publisching, 1991. p. 247-266.

BRESLOW, R.; GUO, T. Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 167-169, 1990.

BROWN, C.R.; HONG-BROWN, L.Q.; WELCH, W.J. Correcting temperature-sensitive protein folding defects. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 1432-1444, 1997.

CALISKAN, S.; CALISKAN, M.; KURALAY, B.; ÖNVURAL, B. Effect of simvastatin therapy on blood and tissue ATP levels and erythrocyte membrane lipid composition. **Research in Experimental Medicine**, v. 199, p. 189-194, 2000.

CAMILLONI, C.; GUERINI ROCCO, A.; EBERINI, I.; GIANAZZA, E.; BROGLIA, R.A.; TIANA, G. Urea and Guanidinium Chloride Denature Protein L in Different Ways in Molecular Dynamics Simulations. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 12, p. 4654-61, 2008.

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.

CAZZOLA, R.; RONDANELLI, M.; RUSSO-VOLPE, S. FERRARI, E.; CESTARO, B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 1846-51, 2004.

CHI, E.Y.; KRISHNAN, S.; RANDOLPH, T.W.; CARPENTER, J.F. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 9, p. 1325-36, 2003.

COOPER, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 5, p. 557-63, 1999.

CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 48, p. 24-32, 1993.

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

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

DE LOECKER, R.; GOSSENS, 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.

DILL, K.A., SHORTLE, D. Denatured states of proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 795-825, 1991.

FIELDS, P. A.; SOMERO, G. N. Hot spot in cold adaptation: Localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A₄ orthologs of Antarctic notothenioids fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 11476-11481, 1998.

FIELDS, P. A.; WAHLSTRAND, B. D.; SOMERO, G. N. Intrinsic versus extrinsic stabilization of enzymes. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 4497-4505, 2001.

FINOTTI, C.J. **Dependência térmica da osmoestabilização de eritrócitos por glicerol**. Uberlândia, 2006. 59f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

FONSECA, L. C. **Efeitos da atrazina e do duodecil sulfato de sódio sobre a estabilidade de eritrócitos humanos**. Uberlândia, 2010. 72f. Tese (Doutorado).

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

FONSECA, L. C., CORRÊA, N.C.R, GARROTE-FILHO, 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.

FONSECA, L.; ARVELOS, L.; NETTO, R.; LINS, A.; GARROTE-FILHO, M.; PENHA-SILVA, N. Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 2010 Sept 21 [Epub ahead of print] doi: 10.1007/s10863-010-9310-y.

FRICK, M.; SCHMIDT, K.; NICHOLS, B.J. Modulation of Lateral Diffusion in the Plasma Membrane by Protein Density. **Current Biology**, v. 17, n. 5, p. 462-467, 2007.

GARCÍA, J.J.; MARTÍNEZ-BALLARÍN, E.; MILLÁN-PLANO, S.; ALLUÉ, J.L.; ALBANDEA, C.; FUENTES, L.; ESCANERO, J.F. Effects of trace elements on membrane fluidity. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.19, n.1, p.19-22, 2005.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. **Biochemistry**. v. 20, p. 4667-4676, 1981.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, D.; OFFEN, D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. **The Journal of Neuroscience**, v. 251, p. 261-268, 2004.

GOLDSTEIN, D. B. The effects of drugs on membrane fluidity. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v. 24, p. 43-64, 1984.

GONSETTE, R.E. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 274, p. 48-53, 2008.

GOUVÊA-E-SILVA, L.F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**. Uberlândia, 2006, 62f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia,

Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 415, p. 29-79, 1975.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; GABBITA, S.P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1456-1462, 2000.

HUA, L.; ZHOU, R.; THIRUMALAI, D.; BERNE, B.J. Urea denaturation by stronger dispersion interactions with proteins than water implies a 2-stage unfolding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 16928-16933, 2008.

ISOMAA, B. Interactions of surface-active alkyltrimethylammonium salts with the erythrocyte membrane. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, p. 975- 980, 1979.

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

KAUZMANN, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 14, p. 1-63, 1959.

LAGUE, P.; ZUCKERMANN, M.J.; ROUX, B. Lipid-Mediated Interactions between Intrinsic Membrane Proteins: Dependence on Protein Size and Lipid Composition. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 1, p. 276-284, 2001.

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.

LEE, J. C. Biopharmaceutical formulation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 81-84, 2000.

LIU, W.; GUO, X.; GUO, R. The interaction between hemoglobin and two surfactants with different charges. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 548–557, 2007.

LIU, Y.; BOLEN, D. W. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**, v. 34, p. 12884-12891, 1995.

MAHER, P.; SINGER, S.J. Structural changes in membranes produced by the binding of small amphipathic molecules. **Journal of Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 232- 240, 1984.

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

MANSUR, P.H.; CURY, L.K.; LEITE, J.O.; PEREIRA, A.A.; PENHA-SILVA, N.; ANDRADE, A.O. The approximate entropy of the electromyographic signals of tremor correlates with the osmotic fragility of erythrocytes. **Biomedical Engineering Online**, v. 9, p. 29, 2010.

MARIGLIANO, V.; TARZIA, A.; MODESTI, D.; MASELLA, R.; CANTAFORA, A.; BAUCO, C.; SALVATI, A.M.; SCUTERI, A.; CAPRARI, P. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 34, n. 1, p. 47-57, 1999.

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

MAZZANTI, L.; FRANCESCHI, C.; NANETTI, L.; SALVOLINI, E.; STAFFOLANI, R.; MORETTI, N.; RABINI, R.A. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 657-663, 2002.

MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. Thermodynamics of protein denaturation by sodium dodecyl sulfate, **Journal of the Iranian Chemical Society**. v. 2, n. 3, p. 189-196, 2005.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K. Membranas: estrutura, montagem e função. In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. **Harper's Biochemistry**. 9ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2002.

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

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

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

NOSOH, Y.; SEKIGUCHI, T. Protein engineering thermostability. **Tibtech**. v. 8, p. 16-20, 1990.

NOZAKI, Y., TANFORD, C. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 238, n. 12, p. 4074-81, 1963.

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. 2211-17, 1971.

PANEK, A.D. Trehalose metabolism--new horizons in technological applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 2, p.169-181, 1995.

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.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOUVÊA-E-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNARDINO-NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G. Effects of glycerol and sorbitol

on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 23-29, 2008.

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

PERK, K.; FREI, Y.F.; HERZ, 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.

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

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

PRIVALOV, P.L.; GILL, S.J. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. **Advances in Protein Chemistry**, v. 39, p. 191-250, 1988.

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

ROSSKY, P.J. Protein denaturation by urea: Slash and bond. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 16825-6, 2008.

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. 5278-83, 1992.

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

SCHELLMAN, J.A. Solvent denaturation. **Biopolymers**, v. 17, p. 1305-1322, 1978.

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.

SENGUPTA, N.; DATTA, S.C.; SENGUPTA, D. Platelet and erythrocyte membrane lipid and phospholipid patterns in different types of mental patients. **Biochemical Medicine**, v. 25, p. 267–275, 1981.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 252, p. 66–76, 2002.

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation. A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 71, p. 522–525, 1974.

SINGER S.J. The molecular organization of membranes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 805-833, 1974.

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

STEVENS, J.D. The distribution of phospholipid fractions in red cell membranes of schizophrenics. **Schizophrenia Bulletin**, v. 6, p. 60–61, 1972.

STOREY, K.B.; MOSSER, D.D.; DOUGLAS, D.N.; GRUNDY, J.E.; STOREY, J.N. Biochemistry below 0 °C: nature's frozen vertebrates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 283-307, 1996.

TANFORD, C. Contribution of hydrofobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. **Journal of American Chemistry. Society**. v. 84, p. 4240-4247, 1962.

TANFORD, C. Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solutions. **Journal of American Chemistry. Society**. v. 86, p. 2050-2059, 1963.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 121-182, 1968.

TAYLOR, L. S.; YORK, P.; WILLIAMS, A. C.; EDWARDS, H. G. M.; MEHTA, V.; JACKSON, G. S.; BADCOE, I. G.; CLARKE, A. R. Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1253, p. 39-46, 1995.

TIMASHEFF, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. **PNAS**, v. 99, p. 9721-9726, 2002.

TIMASHEFF, S. N. Solvent effects on protein stability. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, p. 35-39, 1992.

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. 355-432, 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.

TSAI, J.; GERSTEIN, M.; LEVITT, M. Keeping the shape but changing the charges: A simulation study of urea and its iso-steric analogs. **Journal of Chemical Physiology**, v. 104, p. 9417-9430, 1996.

WAGNER, C.T.; MARTOWICZ, M.L.; LIVESEY, S.A.; CONNOR, J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 45, p. 153-166, 2002.

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.

WELCH, W.J.; BROWN, C.R. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. **Cell Stress Chaperones**, v. 1, n. 2, p. 109-15, 1996.

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.

YANG, A.S.; HONIG, B. Electrostatic effects on protein stability. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, p. 40-45, 1992.

YATVIN, M.B.. The influence of membrane lipid composition and procaine on hyperthermic deaths of cells. **International Journal of Radiation Biology**, v. 32, p. 513-521, 1977.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DE COMBINAÇÕES DE DIFERENTES CAOTRÓPICOS NO ESPECTRO VISÍVEL DA HEMOGLOBINA

RESUMO

Influência de combinações de diferentes caotrópicos no espectro visível da hemoglobina

O presente estudo teve por objetivo investigar a influência de combinações de uréia, etanol e hipotonicidade sobre a estabilidade e o espectro visível de hemoglobina humana. Protocolos com incubação em tempo fixo de 30 minutos a 37 °C foram utilizados para analisar o espectro visível de hemoglobina comercial e de hemoglobina obtida do sangue venoso de 20 voluntários saudáveis. O espectro visível da hemoglobina obtida em nosso laboratório foi compatível com o da oxiemoglobina e sua estabilidade foi monitorada a 540 nm, enquanto o espectro da hemoglobina comercial foi compatível com o da metemoglobina e sua estabilidade foi monitorada a 630 nm. Concentrações de 0-5 M de uréia, 0-20% (v/v) de etanol na ausência e na presença de 1,5 M de uréia e 0-1 g/dL de NaCl na ausência e na presença de 1 M de uréia produziram alterações discretas no espectro visível da oxiemoglobina. Entretanto, além de 5 M de uréia e 20% de etanol a oxiemoglobina sofreu alterações espectrais provavelmente associadas à formação de desoxiemoglobina e em seguida a sua desnaturação. A metemoglobina apresentou uma maior vulnerabilidade aos efeitos dos caotrópicos estudados. Como as transições de hemólise de eritrócitos a 37 °C ocorrem abaixo de 5 M de uréia e 20% (v/v) de etanol, elas devem sofrer apenas contribuições espectrais discretas desses caotrópicos sobre a oxiemoglobina.

Palavras-chave: hemoglobina, espectro visível, etanol, uréia, estresse hipotônico

ABSTRACT

Influence of combinations of different chaotropes in the visible spectrum of hemoglobin

This study aimed to investigate the influence of combinations of urea, ethanol and hypotonicity on the stability and spectrum of human hemoglobin. Protocols with fixed incubation time of 30 minutes at 37 °C were used to analyze the spectra of commercial hemoglobin and hemoglobin of venous blood obtained from 20 healthy volunteers. The visible spectrum of hemoglobin obtained in our laboratory was consistent with that of hemoglobin and its stability was monitored at 540 nm, while the spectrum of commercial hemoglobin was consistent with that of metahemoglobin and its stability was monitored at 630 nm. Concentrations of 0-5 M urea, 0-20% (V/V) ethanol in the absence and presence of 1.5 M urea and 0-1 g/dL NaCl in the absence and presence of 1 M urea produced discrete changes in the visible spectrum of hemoglobin. However, beyond 5 M urea and 20% ethanol, oxyhemoglobin underwent spectral changes probably associated with the formation of desoxyhemoglobin and then its denaturation. Metahemoglobin showed greater vulnerability to the effects of chaotropic studied. As the transitions of hemolysis of erythrocytes at 37 °C occur below 5 M urea and 20% (V/V) ethanol, they should suffer only discrete spectral contributions of the effects of these chaotropes on oxyhemoglobin.

Keywords: hemoglobin, visible spectrum, ethanol, urea, hypotonic stress

INTRODUÇÃO

Vários compostos, entre eles solventes orgânicos, são usados para desnaturar proteínas em soluções [KAUZMANN, 1959; TANFORD, 1968; HERSKOVITS e JAILLET, 1969]. Solventes orgânicos alteram a estrutura nativa das proteínas por perturbar as interações entre as cadeias laterais apolares de aminoácidos [HERSKOVITS e JAILLET, 1969].

A estabilização e a desnaturação de proteínas são temas de grande interesse fisiológico [STOREY, 1996], terapêutico [WELCH e BROWN, 1996; BROWN, HONG-BROWN e WELCH, 1997] e biotecnológico [PANEK, 1995; LEE, 2000; TREJO e HARTE, 2010]. A natureza complexa da estabilização e desnaturação de proteínas tem sido revista em vários trabalhos [KAUZMANN, 1959; TANFORD, 1968; PRIVALOV e GILL, 1988; DILL e SHORTLE, 1991; TIMASHEFF, 1998; SHELLMAN, 2002; FONSECA *et al.*, 2006; ROSSKY, 2008; CANCHI, PASCHEK e GARCÍA, 2010].

Existem pequenas diferenças na desnaturação por solventes orgânicos em diferentes proteínas. Assim, solventes orgânicos podem ser usados para proteger ou desnaturar uma proteína específica em solução contendo várias proteínas [ASAKURA, ADACHI e SCHWARTZ, 1978].

A hemoglobina é uma das mais estudadas proteínas humanas. A hemoglobina humana majoritária em adultos é a A2 formada pela associação de quatro subunidades, duas designadas como α e as outras duas como β . Cada subunidade é constituída pela ligação da cadeia globular de globina a um grupo heme. O grupo heme é constituído por uma porfirina ligada a um átomo de ferro na forma reduzida (Fe^{2+}) ou na forma oxidada (Fe^{3+}). A forma reduzida (Fe^{2+}) é a única capaz de ligar-se a O_2 . Quando está unida ao oxigênio denomina-se oxiemoglobina e, quando não contem oxigênio, denomina-se desoxiemoglobina. A hemoglobina que tem o ferro do grupo heme na forma oxidada (Fe^{3+}) é designada como metemoglobina ou ferrihemoglobina, a qual é incapaz de unir-se ao O_2 [NELSON, COX, 2005].

As diferentes formas de hemoglobina se distinguem por seus espectros de absorção, embora a maior parte delas tenha seus picos de absorção entre 480 e 660 nm. Ao alterar o estado redox da hemoglobina, mudam-se também algumas de suas características físico-químicas, incluindo as propriedades ópticas de maior absorção. A oxiemoglobina tem seus picos de absorção máxima em 542 e 577 nm e a

metemoglobina em 500 e 630 nm. Já a desoxiemoglobina tem seu pico de absorção a 560 nm.

Os solventes orgânicos podem estabilizar, desestabilizar e mesmo não apresentar efeito algum sobre a hemoglobina [ASAKURA, ADACHI e SCHWARTZ, 1978].

A desnaturação da hemoglobina por uréia tem comportamento semelhante ao de outras proteínas globulares de cadeia única [ELBAUM, PANDOLFELLI e HERSKOVITS, 1974]. Na presença de concentrações baixas até moderadas de uréia, a hemoglobina se dissocia sem alterações significativas na conformação de seus monômeros [WU, HUANG, 1930 e WU, YANG, 1932 *apud* SINKO, KAUZMANN, 1962; STEINHARDT, 1938]. Porém, concentrações maiores levam à desnaturação das subunidades da hemoglobina [FLORY, 1957; PELLER, 1959].

Para que a hemoglobina possa ser usada como monitor em estudos sobre efeitos de solutos sobre a estabilidade de eritrócitos [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008], é preciso identificar as alterações espectrais decorrentes dos efeitos desses solutos sobre a hemoglobina e diferenciá-las daquelas alterações de fato associadas à hemólise.

É neste sentido que o presente trabalho analisa a influência da combinação de diferentes caotrópicos na curva espectral e na estabilidade de oxiemoglobina e de metemoglobina humanas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Ele teve a participação de 20 voluntários saudáveis de ambos os sexos e idades entre 20 e 35 anos. Foram excluídos da pesquisa indivíduos portadores de doenças degenerativas, fumantes, etilistas e usuários de drogas lícitas ou ilícitas.

Reagentes e equipamentos

Os reagentes (NaCl, uréia e etanol) foram da marca Synth, com 99,9% de pureza, sendo a mesma corrigida no preparo das soluções. A metemoglobina utilizada foi adquirida da Sigma (Saint Louis, MO, EUA). As medidas de volume foram realizadas em pipetas graduadas de vidro refratário e pipetas automáticas (Labsystems, modelo Finnpipette Digital, Helsinki, Finlândia). As medidas de massa foram feitas em uma balança digital (AND, modelo 870, Japão). As incubações foram feitas em banho

termostatizado (Marconi, modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil). A centrifugação foi realizada em centrífuga Hitachi Koki (modelo CF15RXII, Hitachinaka, Japão). As análises espectrofotométricas foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV1650TC, Japão).

Coleta das amostras de sangue

Amostras de quatro mL de sangue foram coletadas por punção intravenosa, após jejum de 8 a 12 horas, em tubos evacuados contendo 50 µL de K₄EDTA a 1 g/dL como anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil).

Preparo das soluções de hemoglobina

Amostras de sangue foram lavadas três vezes em solução salina fisiológica. Inicialmente e após cada lavagem foram centrifugadas a 1600 x *g* por 10 minutos, sendo o sobrenadante desprezado. Em seguida, as células foram lisadas por diluição 1:5 em água desionizada e novamente centrifugadas por 10 minutos a 1600 x *g*. O sobrenadante foi utilizado como solução de oxiemoglobina humana.

As soluções de metemoglobina foram preparadas a 1% (m/v) em NaCl a 0,02 M.

Preparo das soluções de caotrópicos

Foram preparadas soluções de (1) uréia (0-8 M) em NaCl 0.9 g/dL, (2) de etanol (0-38%) em NaCl 0.9 g/dL, (3) de etanol (0-20%) + uréia a 1,5 M em NaCl 0.9 g/dL, (4) de NaCl (0-1,0 g/dL) e (5) de NaCl (0-1,0 g/dL) + uréia a 1 M.

A influência dessas soluções sobre a lise de eritrócitos de amostras de sangue total e sobre o espectro VIS de oxiemoglobina e de metemoglobina humanas foi estudada a 37 °C de acordo com as seguintes descrições.

Influência das soluções de caotrópicos sobre o sangue total e a oxiemoglobina

Tubos de polietileno (Eppendorff®), em triplicata, foram preenchidos com alíquotas de 1,5 mL de soluções com diferentes composições e concentrações e pré-incubados a 37 °C por 10 minutos. Após adição de 10 µL de sangue ou de 25 µL de solução contendo oxiemoglobina, os tubos foram tampados, homogeneizados, incubados por 30 minutos e, em seguida, centrifugados a 1600 x *g* por 10 minutos. Alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes foram usadas para leitura da absorbância a 540 nm ou para varredura espectral no intervalo de 450 a 700 nm.

Influência das soluções de caotrópicos sobre a metemoglobina

Tubos de polietileno (Eppendorff®), em triplicata, foram preenchidos com alíquotas de 1,0 mL das soluções de caotrópicos acima descritas e pré-incubados a 37 °C por 10 minutos. Após adição de 200 µL da solução contendo metemoglobina, os tubos foram tampados, homogeneizados, incubados a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, centrifugados a 1600 x *g* por 10 minutos. Alíquotas de 0,8 mL dos sobrenadantes foram usadas para leitura da absorbância a 630 nm ou para varredura espectral no intervalo de 450 a 700 nm.

RESULTADOS

O espectro das soluções de hemoglobina obtidas a partir do sangue venoso de nossos voluntários foi compatível com o da oxiemoglobina humana, com picos de absorção máxima em torno de 542 e 577 nm. O espectro da solução de hemoglobina comercial Sigma foi compatível com o da metemoglobina humana, com picos de absorção máxima em torno de 500 e 630 nm. Por isso, os resultados com a hemoglobina de nossos voluntários e com a hemoglobina comercial Sigma foram sempre associados à oxiemoglobina e à metemoglobina humanas, respectivamente.

Entre 0 e 8 M de uréia, a absorvância em 540 nm da solução de eritrócitos do sangue total aumentou de acordo com uma linha de regressão sigmodal (**Figura 2.1A**), possivelmente por hemólise.

Na mesma faixa de concentração de uréia, a absorvância da oxiemoglobina a 540 nm apresentou dois comportamentos distintos (**Figura 2.1B**). Entre 2 e 5 M de uréia houve uma elevação ajustável a uma linha de regressão sigmodal da absorvância, praticamente na mesma posição daquela obtida para a solução de eritrócitos do sangue total. Mas acima de 5 M daquele caotrópico ocorreu um declínio na absorvância, possivelmente por desnaturação da hemoglobina.

Ainda nesta faixa de concentração de uréia, a absorvância da metemoglobina apresentou um declínio discreto, porém sigmodalmente definido em função do aumento na concentração de uréia (**Figura 2.1C**).

O espectro visível da oxiemoglobina sofreu pequenas alterações em função do aumento da concentração de uréia de 0 a 8 M em NaCl 0,9 g/dL (**Figura 2.2A**). Houve tendência de elevação da absorvância em 540 nm, indo de 0,71 em 0 M uréia a 0,79 em

5 M uréia, seguida de uma também discreta tendência de diminuição da absorvância em 540 nm, que caiu para 0,60 em 8 M uréia.

Nesta mesma faixa de concentração de uréia, também na presença de NaCl a 0,9 g/dL, o espectro da metemoglobina sofreu alterações mais expressivas (**Figura 2.2B**). Em concentrações superiores a 6 M, o espectro assumiu características descritas para o espectro visível da hemoglobina desnaturada, com desaparecimento dos picos em 500 e em 630 nm [ASAKURA *et al.*, 1977].

Na presença de concentrações crescentes de etanol de até 20%, em NaCl a 0,9 g/dL, também houve elevações ajustáveis a linhas de regressão sigmoidal da absorvância a 540 nm tanto do sangue total (**Figura 2.3A**) quanto da oxiemoglobina (**Figura 2.3B**), com pontos de meia-transição em concentrações de etanol de aproximadamente 14,0%. Com a incorporação de 1,5 M de uréia ao gradiente de etanol, aquelas curvas de regressão sigmoidal foram preservadas, porém com deslocamentos à esquerda das curvas e, conseqüentemente, dos pontos de meia-transição, que caíram para próximo de 10,0% de etanol (**Figuras 2.3A e 2.3B**). Um efeito sinérgico com a combinação de etanol e uréia também foi observado para a metemoglobina (**Figura 2.3C**). O aumento na concentração de etanol até 20% causou uma pequena redução na absorvância em 630 nm. Com a incorporação de uréia no gradiente de etanol, a queda em 630 nm foi mais expressiva.

Houve pequenas alterações nos espectros VIS da oxiemoglobina (**Figura 2.4A**) e da metemoglobina (**Figura 2.4B**) com o aumento da concentração de etanol de 0 até 20% em NaCl a 0,9 g/dL.

Quando uréia a 1,5 M foi incorporada no gradiente de etanol, o espectro VIS da oxiemoglobina sofreu apenas discretas alterações com o aumento na concentração do álcool até 18%, tendo sofrido hipocromicidade, visível nos picos em torno de 540 e 575 nm, com o aumento na concentração de etanol para 20% (**Figura 2.5A**). Nestas mesmas condições, o espectro VIS da metemoglobina perdeu o pico em 500 nm e sofreu um decréscimo apreciável no pico em 630 nm (**Figura 2.5B**).

Em concentrações de etanol superiores a 20% e inferiores a 30%, na presença de 0,9 g/dL de NaCl, houve reduções apreciáveis da absorvância da oxiemoglobina a 540 nm (**Figura 2.6A**) e da metemoglobina a 630 nm (**Figura 2.6C**). Em concentrações de etanol entre 30% e 38% tanto a absorvância da oxiemoglobina (em 540 nm) quanto da metemoglobina (em 630 nm) voltaram a subir. Entretanto, quando os ensaios foram feitos na presença de água, em todo esse intervalo de concentração de etanol, os valores

de absorvância da oxiemoglobina em 540 nm permaneceram invariáveis até em torno de 22% etanol, quando então começaram a cair (**Figura 2.6B**). Nessas mesmas condições, os valores de absorvância em 630 nm da metemoglobina apresentaram apenas a tendência de declínio (**Figura 2.6D**).

Varreduras espectrais da oxiemoglobina em concentrações de etanol entre 21 e 36%, em NaCl 0,9 g/dL, foram apresentadas na **Figura 2.7**. Quando a concentração de etanol aumentou de 21 para 28% houve declínio dos picos típicos de absorvância da oxiemoglobina (**Figura 2.7A**) e aparecimento gradativo de um pico a 630 nm. Em concentrações superiores a 29% de etanol, houve elevação progressiva dos valores de absorvância em toda faixa considerada, com desaparecimento de todos os picos típicos da hemoglobina (**Figura 2.7B**).

Diminuições na concentração de NaCl entre 1 e 0 g/dL foram associadas a uma elevação sigmoideal na absorvância em 540 nm das soluções de sangue total (**Figura 2.8A**). Este efeito certamente representa a lise de eritrócitos. Comportamentos semelhantes, porém bastante discretos, foram observados para a oxiemoglobina (**Figura 2.8B**) e para a metemoglobina (**Figura 2.8C**). Realmente, os espectros da oxiemoglobina (**Figura 2.9A**) e da metemoglobina (**Figura 2.9B**) sofreram apenas pequenos efeitos com a diminuição na concentração de NaCl.

A incorporação de uréia a 1 M no gradiente salino produziu um pequeno deslocamento para a esquerda na curva de lise do sangue total (**Figura 2.8A**), mas alterações menores na absorvância da oxiemoglobina em 540 nm (**Figura 2.8B**) e da metemoglobina em 630 nm (**Figura 2.8C**). De fato, apenas pequenas alterações espectrais foram observadas com o gradiente de hip tonicidade para a oxiemoglobina (**Figura 2.10A**) e a metemoglobina (**Figura 2.10B**) na presença de uréia a 1 M.

DISCUSSÃO

De uma maneira em geral, incubação por 30 minutos seguida de centrifugação de soluções com concentrações crescentes de uréia, de etanol e de uréia + etanol, bem como em soluções com gradiente hipotônico e gradiente hipotônico + uréia, produziu grandes alterações espectrais nas suspensões de sangue total, mas alterações bem mais discretas sobre as características espectrais da oxiemoglobina e da metemoglobina.

Os resultados sugerem que essas condições consideradas caotrópicas para as membranas biológicas estão largamente associadas à lise de eritrócitos, mas também estariam associadas em menor intensidade a alterações das propriedades espectrais da oxiemoglobina e da metemoglobina.

As elevações observadas nas concentrações de uréia até 5 M (**Figura 2.1B**), de etanol até 20% e de etanol até 20% + uréia 1,5 M (**Figura 2.3B**), bem como a diminuição na concentração de NaCl (**Figura 2.8B**), estiveram sempre associadas a elevações na absorvância da oxiemoglobina em 540 nm.

É importante destacar que esses aumentos em A_{540} ocorreram nas mesmas concentrações em que a uréia (**Figura 2.1A**), o etanol e etanol + uréia (**Figura 2.3A**) promoveram lise de eritrócitos.

Esta coincidência sugere que a preparação utilizada de oxiemoglobina poderia conter pequenos esferócitos, corpúsculos residuais ou mesmo complexos micelares de hemoglobina, os quais não teriam sofrido lise completa nas condições utilizadas para preparo da solução de oxiemoglobina.

Essa hipótese faz algum sentido à luz do comportamento exibido pela preparação de oxiemoglobina frente ao gradiente de hipotonicidade. Se houvesse ali algum complexo organizacional contendo hemoglobina, ele certamente seria mais estável e deveria sofrer lise numa concentração de NaCl abaixo daquela determinante da lise dos eritrócitos presentes no sangue total. Realmente, a sigmóide definida pela diminuição da concentração salina nas soluções de oxiemoglobina teve um ponto de meia-transição em torno de 0,25 g/dL de NaCl (**Figura 2.8B**), enquanto a lise de eritrócitos ocorreu em torno de 0,48 g/dL NaCl (**Figura 2.8A**). A razão para a não ocorrência de lise desses complexos de hemoglobina na diluição de 1:5 dos eritrócitos em água desionizada seria de origem cinética. Certamente, o tempo em que aqueles complexos teriam permanecido em condição hipotônica teria sido muito pequeno para determinar sua lise, de forma que ela somente ocorreria após o tempo de incubação de 30 minutos utilizado nos experimentos, reforçada pelo comportamento da oxiemoglobina na presença desses solutos em água (**Figuras 2.1B e 2.6B**).

Outra evidência em favor desta hipótese é decorrente do comportamento da preparação comercial de metemoglobina. A metemoglobina não apresentou tal efeito de elevação de absorvância em 630 nm quando incubada por 30 minutos em concentrações crescentes de uréia (**Figura 2.1C**), de etanol e de etanol + uréia (**Figura 2.3C**), embora

uma diminuta elevação espectral tenha ocorrido com a diminuição na concentração de NaCl (**Figura 2.8C**).

É também possível que as elevações na absorvância em 540 nm produzidas pelos aumentos nas concentrações de uréia até 5 M (**Figura 2.1B**), de etanol até 20% e de etanol até 20% + 1,5 M de uréia (**Figura 2.3B**), sejam decorrentes de alterações conformacionais na oxiemoglobina presente nas soluções de sangue lisado. Uma possibilidade é que tais compostos, nas concentrações descritas, tenham um efeito estabilizador sobre a proteína. De fato, o etanol inibiu desnaturação mecânica da hemoglobina nessa faixa de concentração estudada [ASAKURA, ADACHI, SCHWARTZ, 1978]. Também é possível que tais solutos em baixas concentrações venham a inibir a precipitação da hemoglobina. De fato, inibição da precipitação de hemoglobina S por alquil-uréia foi reportada por Roth *et al.* [1975].

Entretanto, uma hipercromicidade de cerca de 15% a 540 nm foi também associada à diminuição na concentração de NaCl nas soluções de oxiemoglobina (**Figura 2.8 B e Figura 2.9A**), o que seria razoável se houvesse algum tipo residual de célula na solução. Mudanças mais discretas poderiam ser justificadas por alterações na solubilidade da proteína [TIMASHEFF, 1993] ou alterações no ambiente eletrostático em que se encontra o grupamento heme. De fato uma hipercromicidade de menos de 6% foi associada à diminuição da concentração de NaCl nas soluções de metemoglobina (**Figura 2.8C e Figura 2.9B**), que certamente não estaria sujeita a nenhuma transição de lise, mas sim unicamente às mudanças nas propriedades do solvente.

Além da concentração de 5 M de uréia e de 20% de etanol houve declínio na absorvância da oxiemoglobina em 540 nm (**Figura 2.1B e Figura 2.6A**) e da metemoglobina em 630 nm (**Figura 2.1C e Figura 2.6C**). Esta coincidência sugere que além destas faixas de concentração dos caotrópicos estejam ocorrendo eventos comuns.

Em soluções com altas concentrações de uréia os picos de absorção da metemoglobina em 500 e 630 nm desapareceram e foram substituídos por uma banda larga entre 500 e 600 nm (**Figura 2.2B**). O declínio na absorção em 630 nm com o aumento na concentração de uréia foi discreto, mas com um nítido ponto de meia-transição em torno de 4 M desse caotrópico (**Figura 2.1C**). De fato, as maiores alterações espectrais ocorreram em torno de 4 M de uréia (**Figura 2.2B**). Esse decaimento espectral deve estar relacionado inicialmente com dissociação da estrutura tetramérica, o que ocorre abaixo de 4 M de uréia [WU, HUANG, 1930 e WU, YANG, 1932 *apud* SINKO, KAUZMANN, 1962; STEINHARDT, 1938] e posteriormente com

a desnaturação das subunidades da hemoglobina, o que ocorreria nas mais elevadas concentrações de uréia do intervalo considerado.

O fato do decaimento espectral da oxiemoglobina em 540 nm ter ocorrido somente além de 5 M de uréia (**Figura 2.1B** e **Figura 2.2A**), pode sugerir que a oxiemoglobina seja mais resistente à desnaturação pela uréia do que a metemoglobina.

Entretanto, se a elevação espectral ocorrida antes de 5 M de uréia for decorrente da lise de complexos organizacionais remanescentes ou derivados dos eritrócitos, o início do decaimento da absorvância somente após 5 M de uréia deve representar o somatório desse processo de lise associado à desnaturação da oxiemoglobina pela uréia.

De qualquer forma, como os espectros de absorção da oxiemoglobina entre 5 e 8 M de uréia (**Figura 2.2A**) não se igualam ao espectro da metemoglobina (**Figura 2.2B**), a oxiemoglobina de fato deve ter maior estabilidade contra uréia do que a metemoglobina. Esta maior estabilidade deve ser decorrente à conversão do estado **R** no estado **T** da hemoglobina, associada à ligação do oxigênio à hemoglobina. Como o estado **T** é uma prerrogativa da oxiemoglobina, que tem seus átomos de ferro no estado de oxidação +2, a metemoglobina, que tem seus átomos de ferro no estado de oxidação +3 e em consequência disso não pode ligar oxigênio, não poderia assumir a conformação de alta estabilidade típica do estado **R**.

A possibilidade da maior estabilidade da oxiemoglobina ser decorrente de algum resquício de solutos osmoestabilizantes sanguíneos, como glicose ou glicerol, é muito pouco plausível. Apesar da hemoglobina oxigenada utilizada nos experimentos não estar totalmente pura, sua obtenção envolveu a remoção do plasma e sua lavagem por três vezes com solução salina. Além disso, as moléculas que atuam como osmólitos requerem concentrações consideravelmente elevadas para que promovam estabilização de proteínas, razão pela qual também são conhecidas como co-solutos.

A desnaturação de oxiemoglobina por uréia é dependente da concentração de uréia, da concentração da proteína, do tempo de exposição ao solvente e do pH [SIMKO, KAUFMANN, 1962]. Em nosso estudo, o tempo pode ter sido decisivo na pequena ação da uréia sobre a oxiemoglobina uma vez que foi fixado em 30 minutos.

O etanol é um agente caotrópico capaz de promover desnaturação de proteínas e membranas. Ele favorece a desnaturação da proteína por acomodar melhor os grupos apolares dos aminoácidos no solvente, reduzindo a força hidrofóbica [NOZAKI e TANFORD, 1971; CASTRONUOVO *et al.*, 1999; WANG, ROBERTSON e BOLEN, 1995]. Entretanto, como o etanol também aumenta a osmolaridade do meio, ele também

apresenta um efeito estabilizador. Assim, a natureza das ações do etanol sobre proteínas é dependente de sua concentração.

Aumento nas concentrações de etanol até 20% produziram uma elevação na absorção da hemoglobina em 540 nm de cerca de 30% (**Figura 2.3B** e **Figura 2.6A**), segundo uma curva sigmoidal cuja posição na abscissa coincidiu com a elevação sigmoidal na absorção do sangue total (**Figura 2.3A**), quando os ensaios eram conduzidos em NaCl a 0,9 g/dL. Esta tendência também foi confirmada na varredura espectral da oxiemoglobina (**Figura 2.4A**), também na presença de NaCl a 0,9 g/dL. A elevação espectral da oxiemoglobina com o aumento na concentração de etanol até 20% não ocorreu quando os ensaios foram conduzidos em água desionizada (**Figura 2.6B**).

Esses comportamentos seriam esperados se a preparação de oxiemoglobina contivesse pequenos esferócitos ou complexos micelares contendo hemoglobina. O aumento na absorção em 540 nm significaria lise desses complexos organizacionais com liberação de hemoglobina na solução salina (**Figura 2.3B** e **Figura 2.6A**). Por outro lado, tais complexos já estariam uniformemente lisados após a incubação em tempo fixo de 30 minutos com o aumento na concentração de etanol em água desionizada (**Figura 2.6B**).

Quando a concentração de etanol do meio aumentou além de 20%, houve declínio da absorvância em 540 nm da preparação utilizada de oxiemoglobina de cerca de 60% em solução salina (**Figura 2.6A**) e de 75% em água desionizada (**Figura 2.6B**). Esses decaimentos coincidiram de certa forma com os decaimentos observados para os mesmos aumentos na concentração de etanol sobre as absorvâncias em 630 nm da metemoglobina em salina (**Figura 2.6C**) e em água (**Figura 2.6D**).

De fato, a existência de esferócitos íntegros em altas concentrações de etanol foi reportada na literatura [[BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996](#)] e considerada em um modelo de estabilização de eritrócitos em soluções de elevada osmolaridade, dada inclusive pela própria presença de altas concentrações de etanol [[CUNHA *et al.*, 2007](#); [PENHA-SILVA *et al.*, 2008](#)].

Realmente, entre 21 e 28% de etanol, as varreduras espectrais da oxiemoglobina (**Figura 2.7A**) sofreram alterações que as foram tornando progressivamente cada vez mais semelhantes com o espectro da metemoglobina em etanol (**Figura 2.4B**). Isso pode significar que além de 20% de etanol a oxiemoglobina perdeu a estabilidade intrínseca ao estado **T**, passando a se comportar espectroscopicamente de forma semelhante à metemoglobina (**Figura 2.6C**). De fato, uma redução da afinidade da

hemoglobina pelo oxigênio foi reportada, com aumento de aproximadamente cinco vezes na desoxiemoglobina em meio com etanol a 30% [KRUK, 2000].

Entre 29 e 36% de etanol, as varreduras espectrais da preparação de oxiemoglobina perderam as bandas típicas da metemoglobina (em 500 e 630 nm) e passaram a sofrer ampla elevação espectral entre 450 e 700 nm em soluções de NaCl a 0,9%. Esse comportamento deve estar associado com a desnaturação da oxiemoglobina observada em altas concentrações de etanol [ASAKURA, ADACHI, SCHWARTZ, 1978].

A elevação espectral nesta faixa de concentração de etanol parece ter alguma relação com a concentração de NaCl no meio, pois a absorvância em 630 nm da metemoglobina também mostrou tendência de elevação em soluções de NaCl a 0,9 g/dL (**Figura 2.6C**) mas não em água desionizada (**Figura 2.6D**).

A incorporação de uréia no gradiente de 0 a 20% de etanol deslocou para a esquerda a curva de elevação espectral a 540 nm promovida pelo aumento na concentração do álcool tanto sobre o sangue total (**Figura 2.3A**) quanto sobre a oxiemoglobina (**Figura 2.3B**). Isto sugere que ambos os efeitos sejam decorrentes de um mesmo processo, a lise de células remanescentes ou alterações conformacionais com hipercromicidade da hemoglobina devida à combinação de solutos.

O espectro visível da metemoglobina sofreu declínios a 450, 500, 575 e 630 nm com o aumento entre 0 e 20% da concentração de etanol (**Figura 2.4B**). Entretanto, na presença de 1,5 M de uréia (**Figura 2.5B**), esses declínios foram menores a 450 e 575 nm, porém maior em 630 nm. Isso sugere que etanol e uréia estejam exercendo seus efeitos através de mecanismos diferentes entre si.

A incorporação de 1 M de uréia no gradiente salino causou uma discreta migração da curva de lise hipotônica para a esquerda (**Figura 2.8A**), mas não perturbou expressivamente a influência do NaCl sobre os espectros da oxiemoglobina e metemoglobina humanas (**Figura 2.10**) em relação aos espectros dessas proteínas na ausência dessa concentração do caotrópico (**Figura 2.10**).

CONCLUSÕES

As curvas de lise de eritrócitos humanos em gradiente de 0 a 20% de etanol, de 0 a 5 M de uréia e de 0 a 0,9 g/dL de NaCl sofreram influências discretas dos efeitos

desses solutos sobre a hemoglobina humana a 37 °C. Isso significa que as curvas de hemólise obtidas nestas condições são de fato decorrentes da lise de eritrócitos e não de alterações no espectro da hemoglobina produzidas por aqueles caotrópicos. Além de 20% de etanol e 5 M de uréia, a influência desses caotrópicos sobre as curvas de lise exercem influências mais expressivas. Isso significa que as curvas de hemólise obtidas nestas condições devem considerar os efeitos dos solutos sobre as propriedades espectrais da hemoglobina.

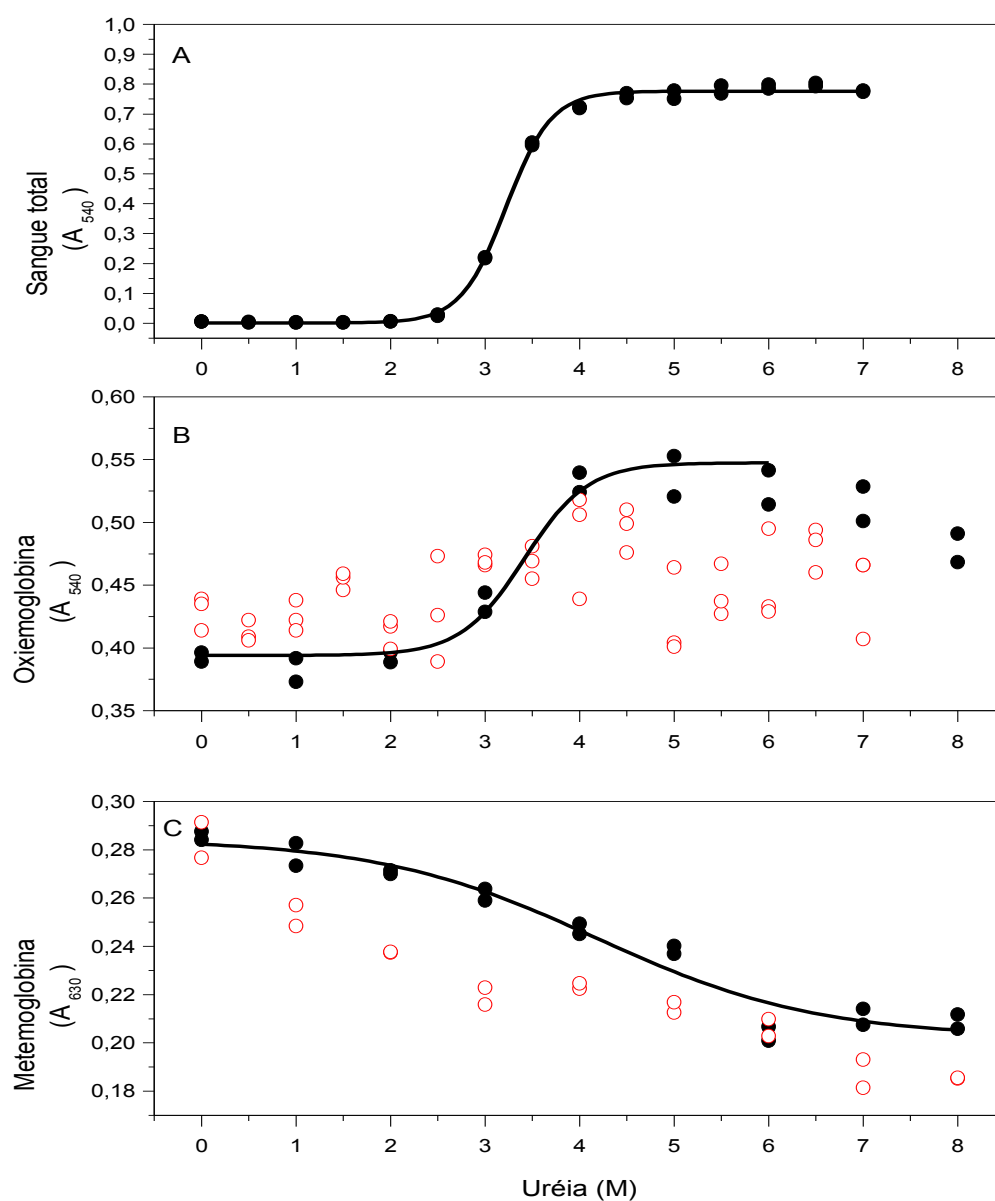


Figura 2.1. Efeitos da uréia sobre a estabilidade de eritrócitos (A), de oxiemoglobina (B) e de metemoglobina (C), de origem humana, em 0.9 g/dL NaCl (●) e em água (○). Condição experimental: 37 °C.

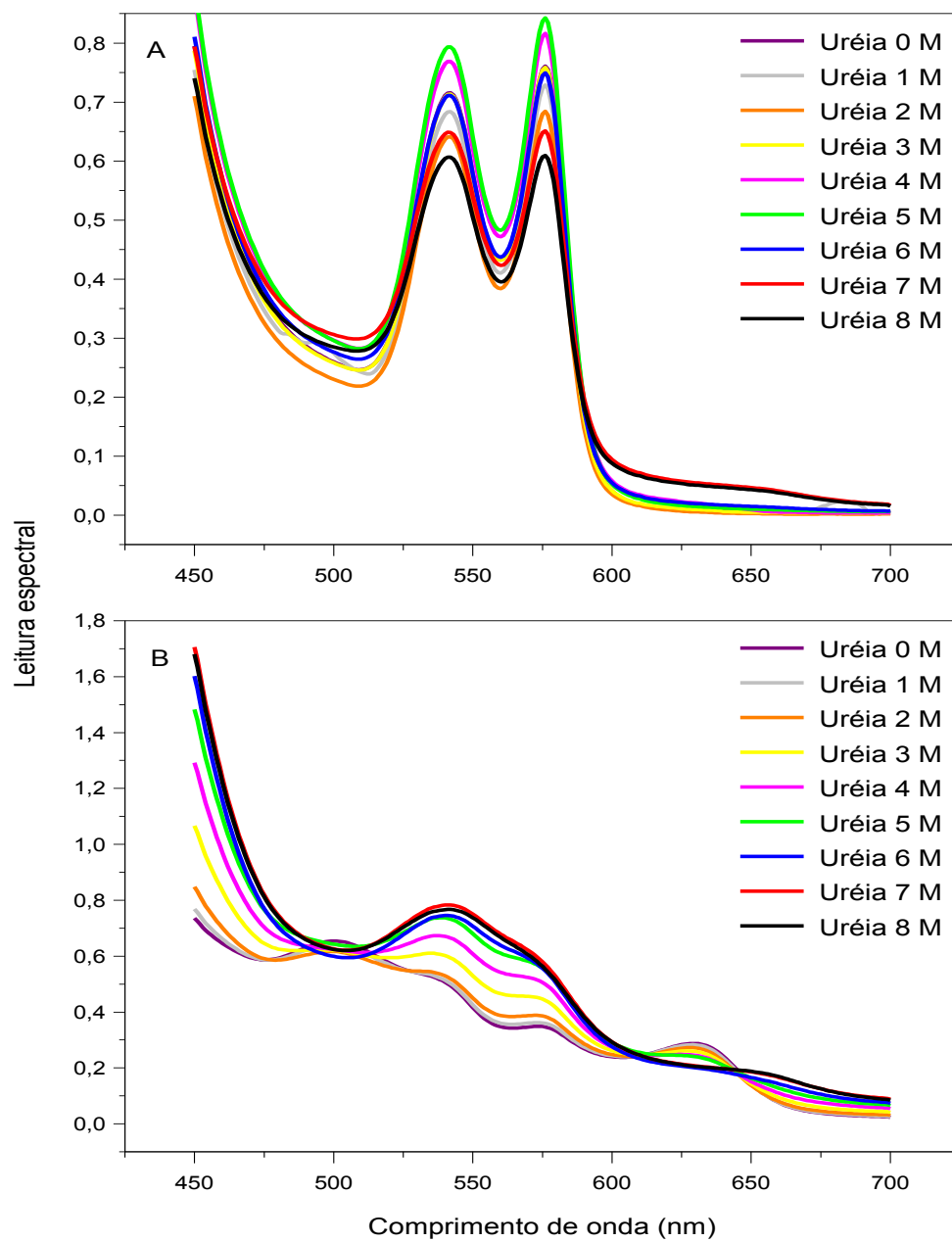


Figura 2.2. Efeitos da uréia sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) humanas. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl e 37 °C.

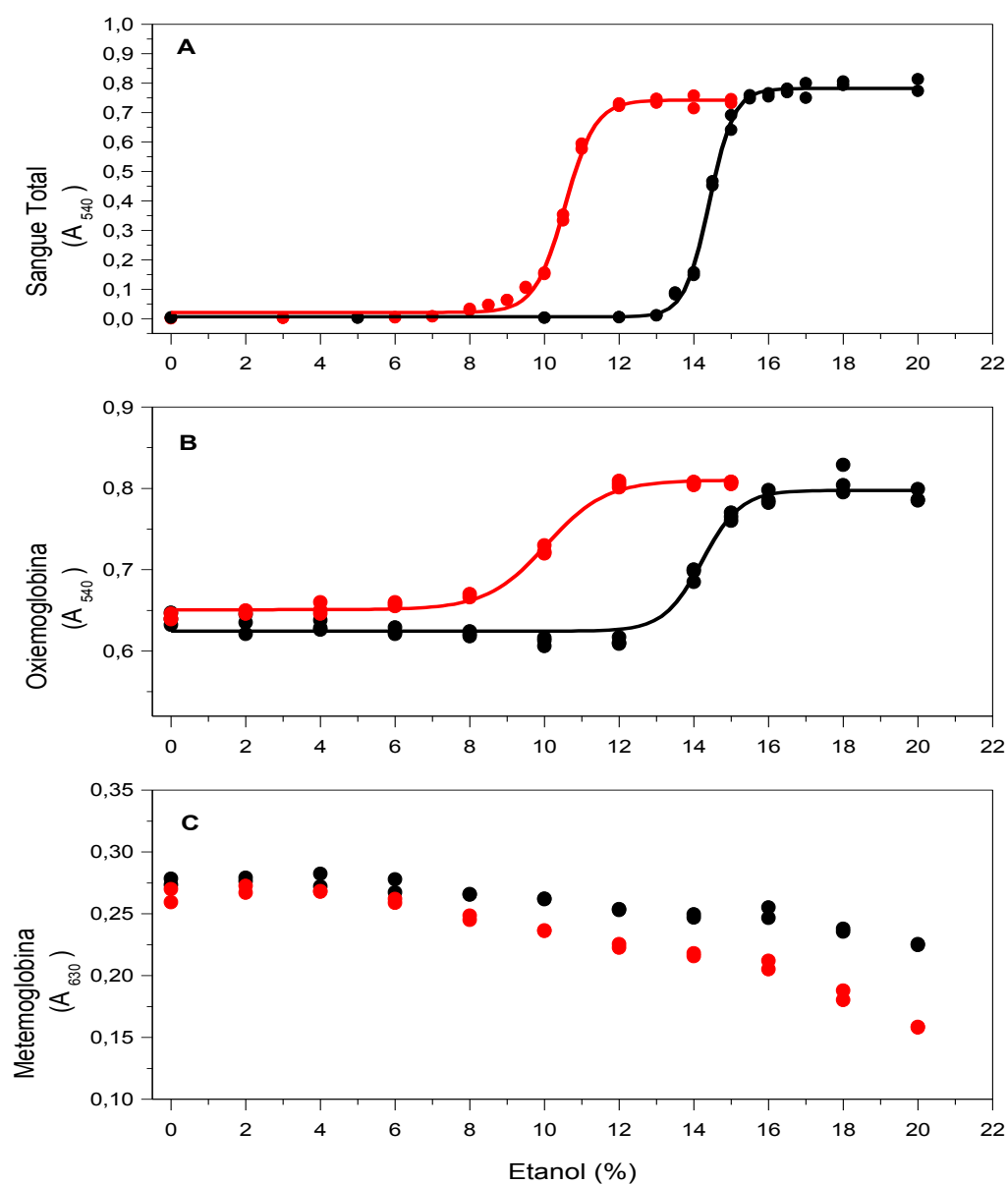


Figura 2.3. Efeitos do etanol (●) e do etanol associado a 1,5 M de uréia (●) sobre a estabilidade de eritrócitos (A), da oxiemoglobina (B) e da metemoglobina (C) de origem humana. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl e 37 °C.

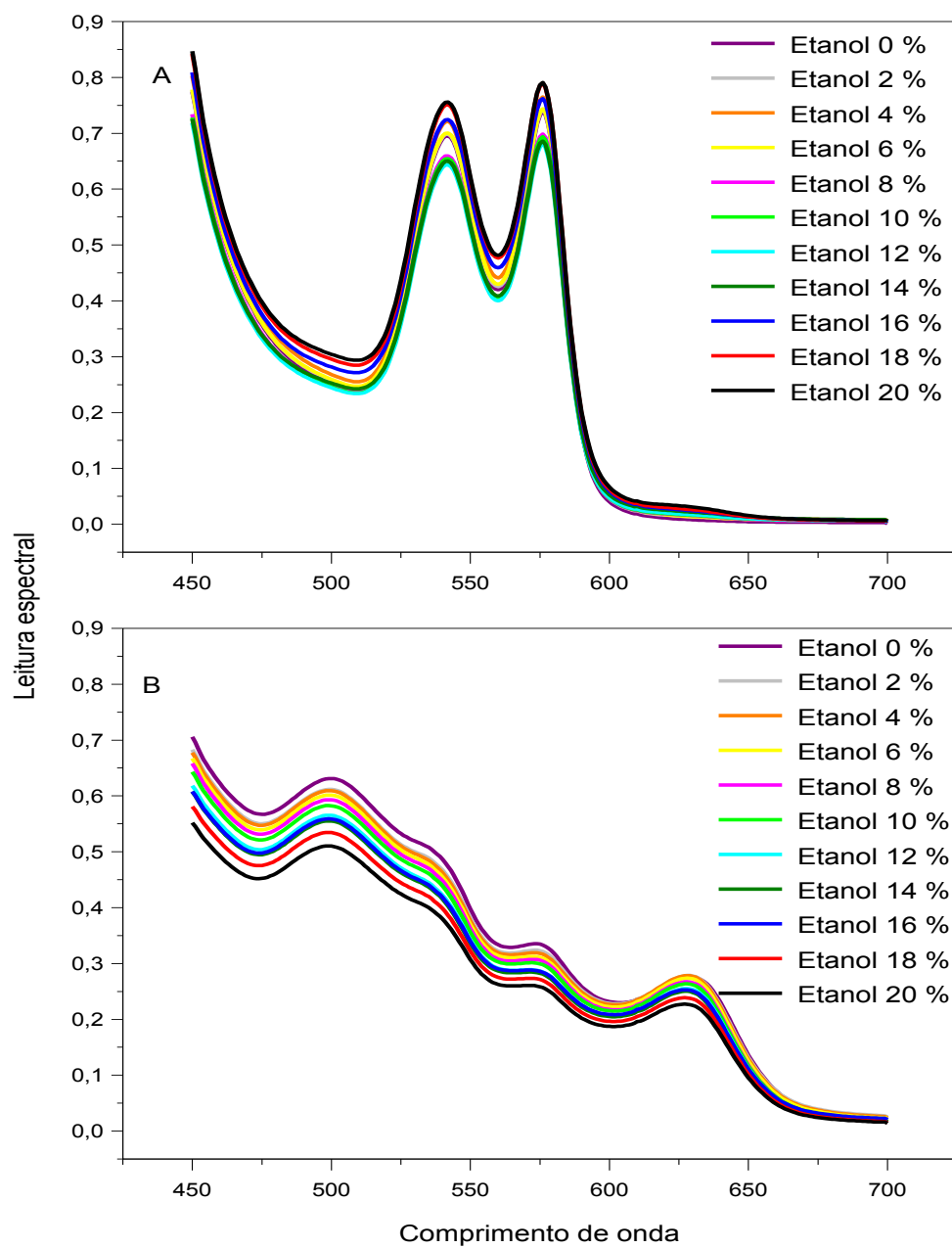


Figura 2.4. Efeitos do etanol sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) humanas. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl e 37 °C.

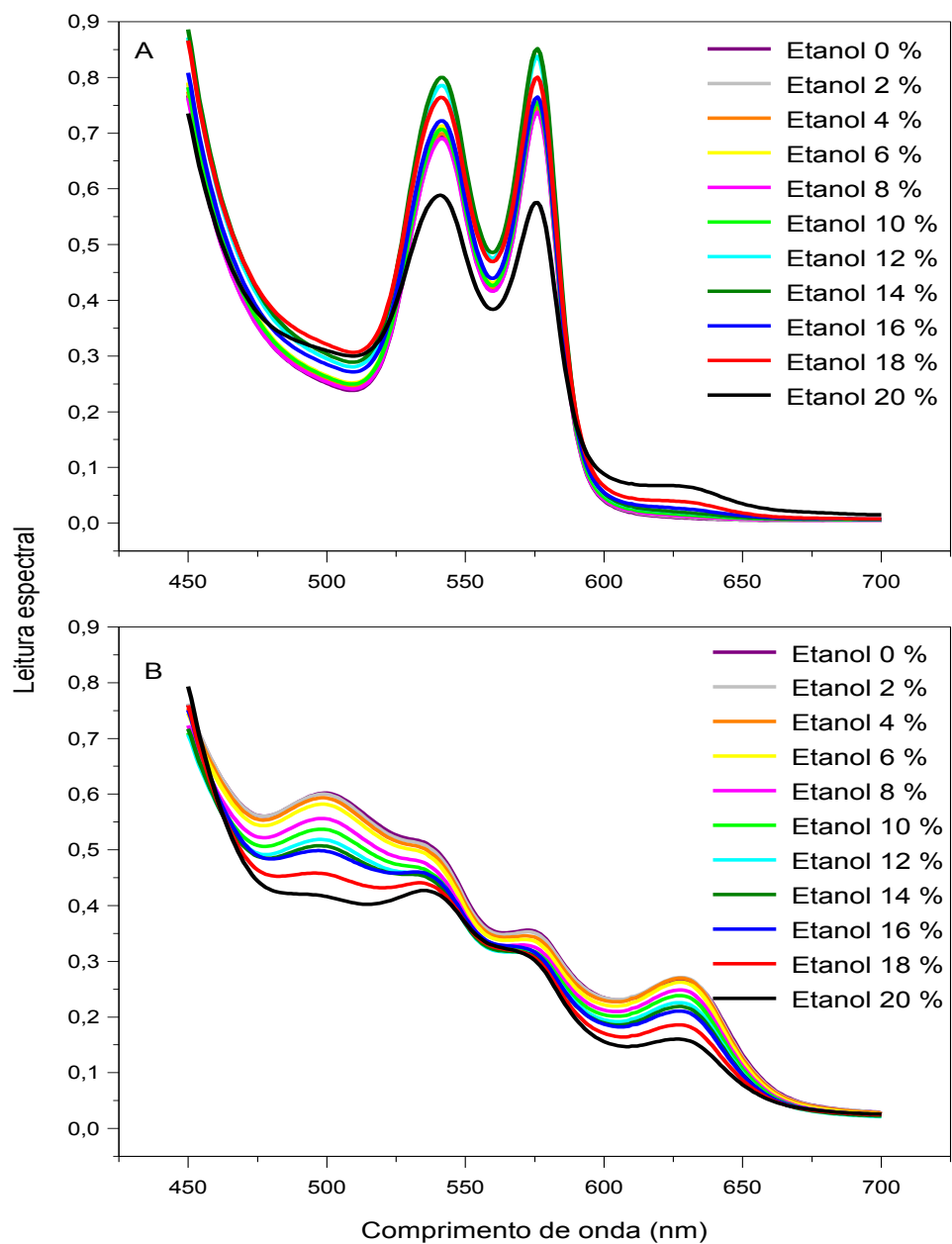


Figura 2.5. Efeitos do etanol associado a 1,5 M de uréia sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) humanas. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl e 37 °C.

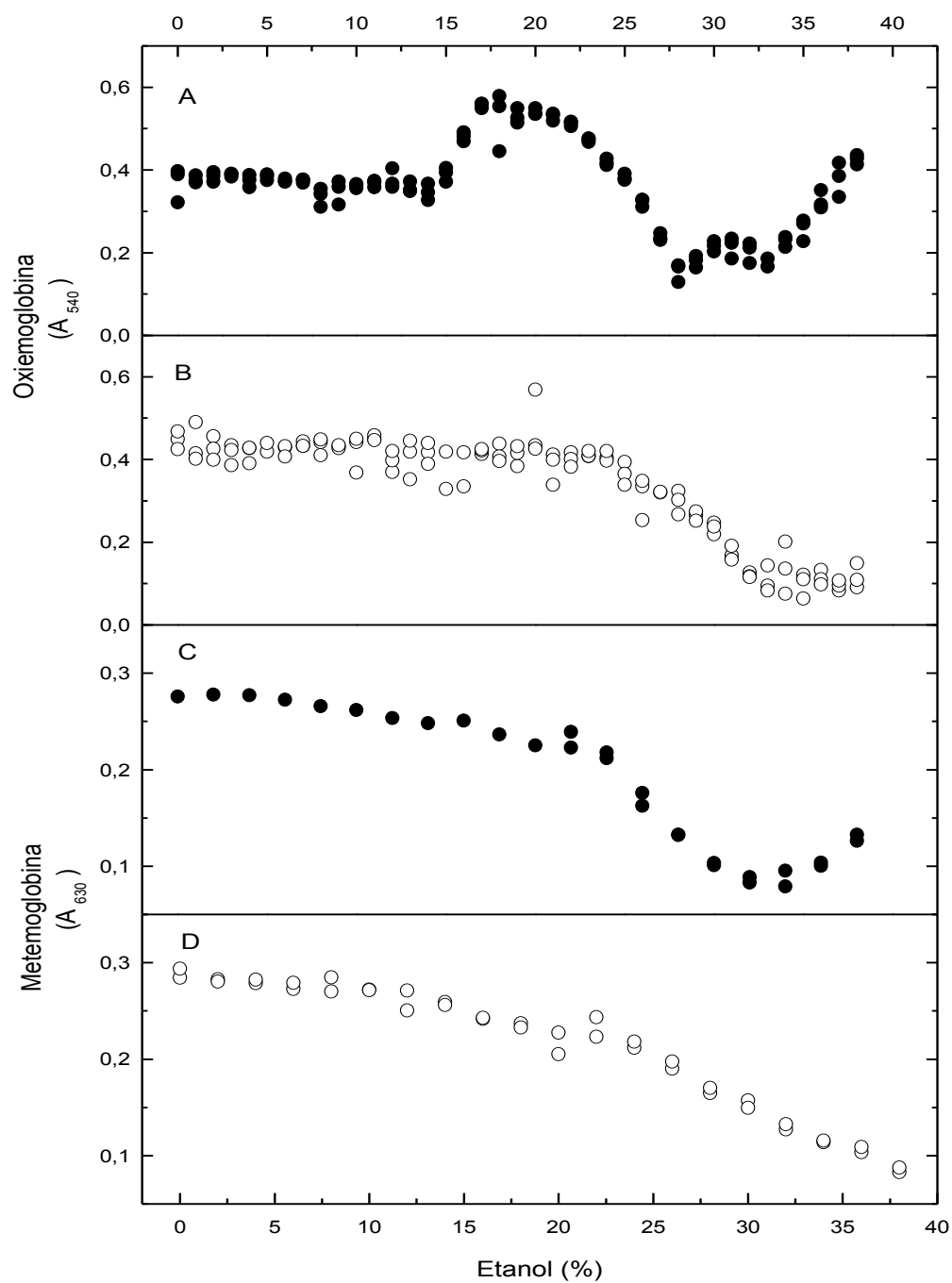


Figura 2.6. Efeitos do etanol sobre a estabilidade da oxiemoglobina (A e B) e da metemoglobina (C e D) humanas. Condições experimentais: em 0.9 g/dL NaCl (●) e em água (○) a 37 °C.

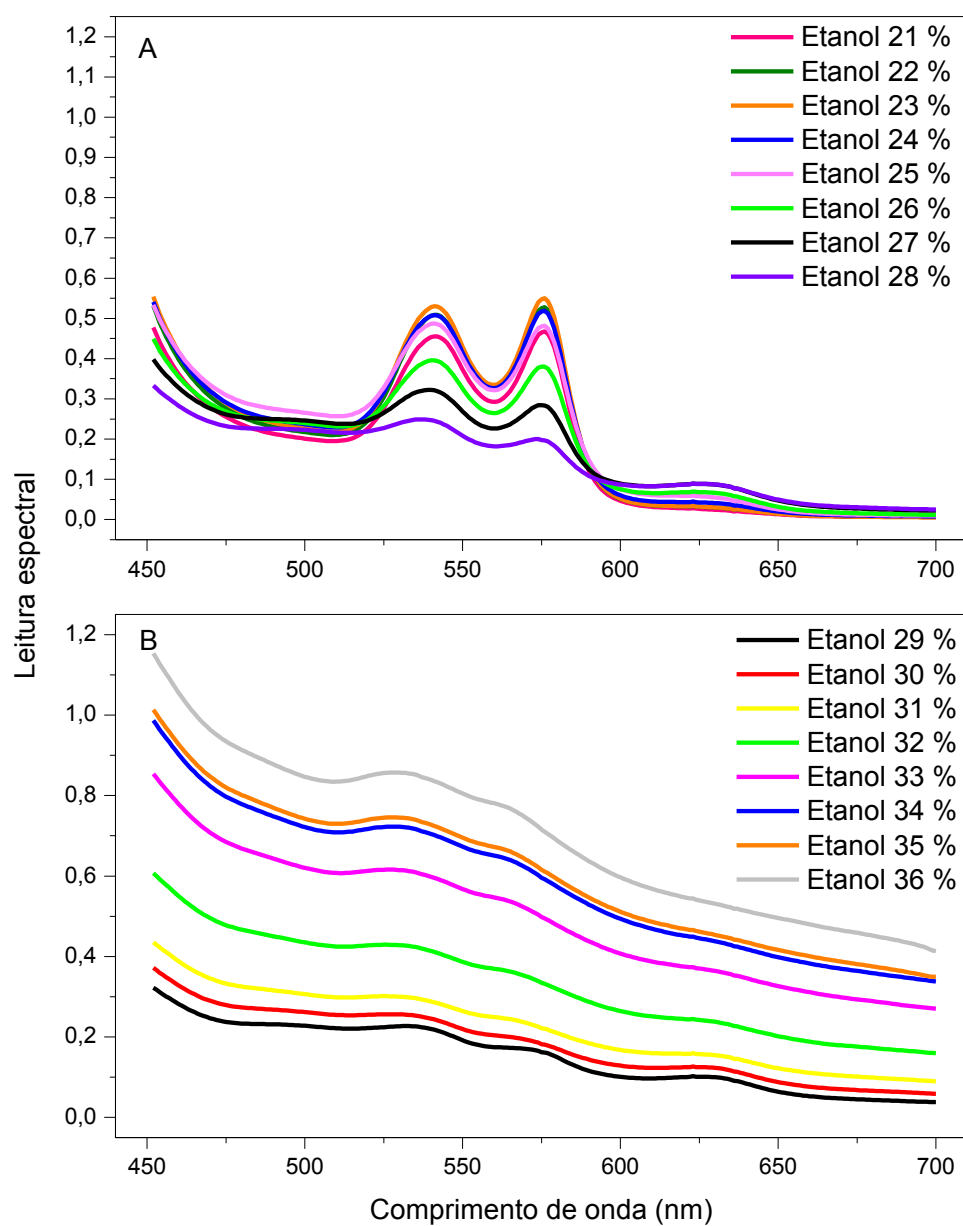


Figura 2.7. Efeito do etanol sobre o espectro visível da oxiemoglobina humana. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl e 37 °C.

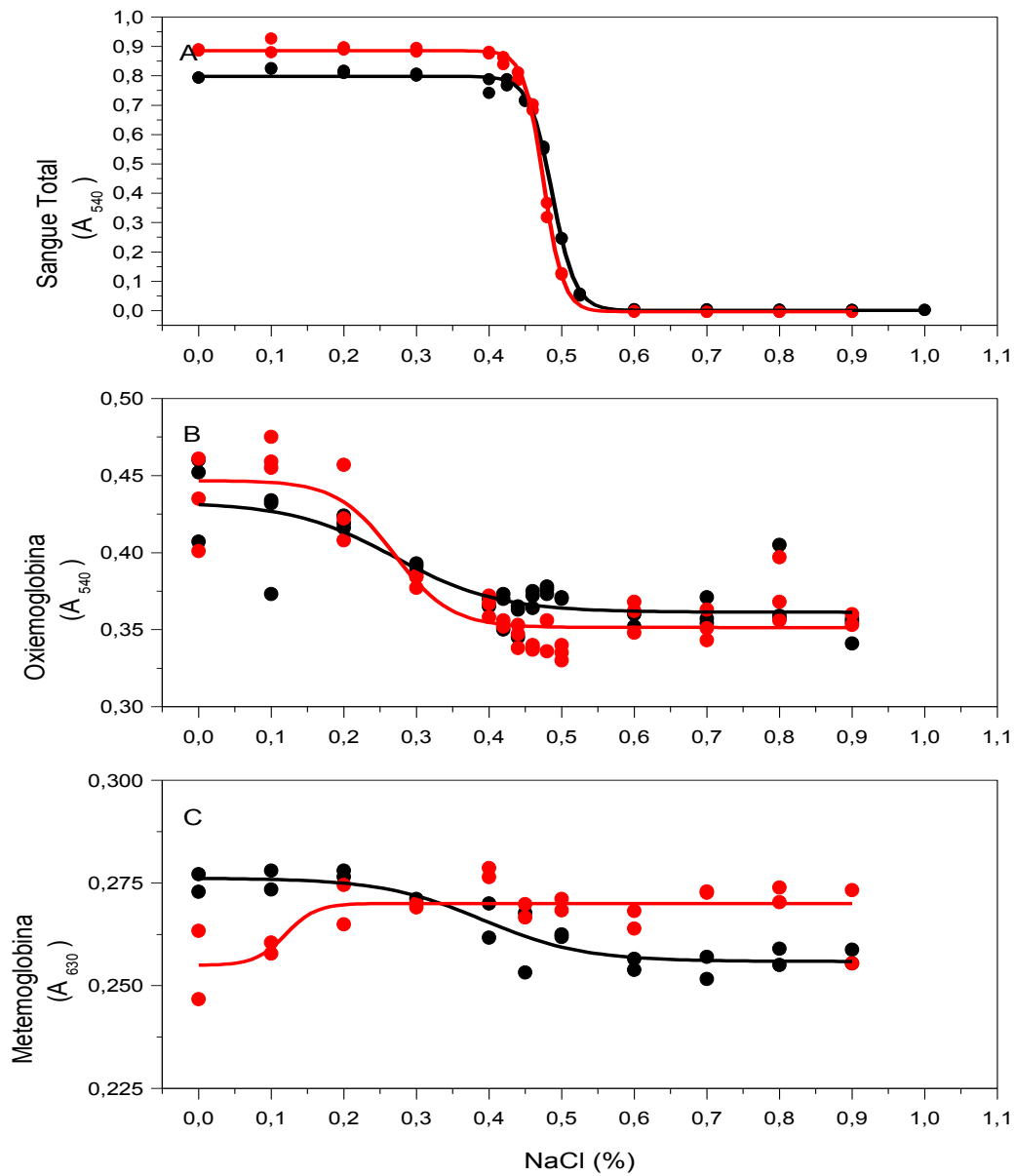


Figura 2.8. Efeitos de diferentes concentrações de NaCl na ausência (●) e na presença 1 M de uréia (●) sobre a estabilidade de eritrócitos (A), da oxiemoglobina (B) e da metemoglobina (C) de origem humana. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl e 37 °C.

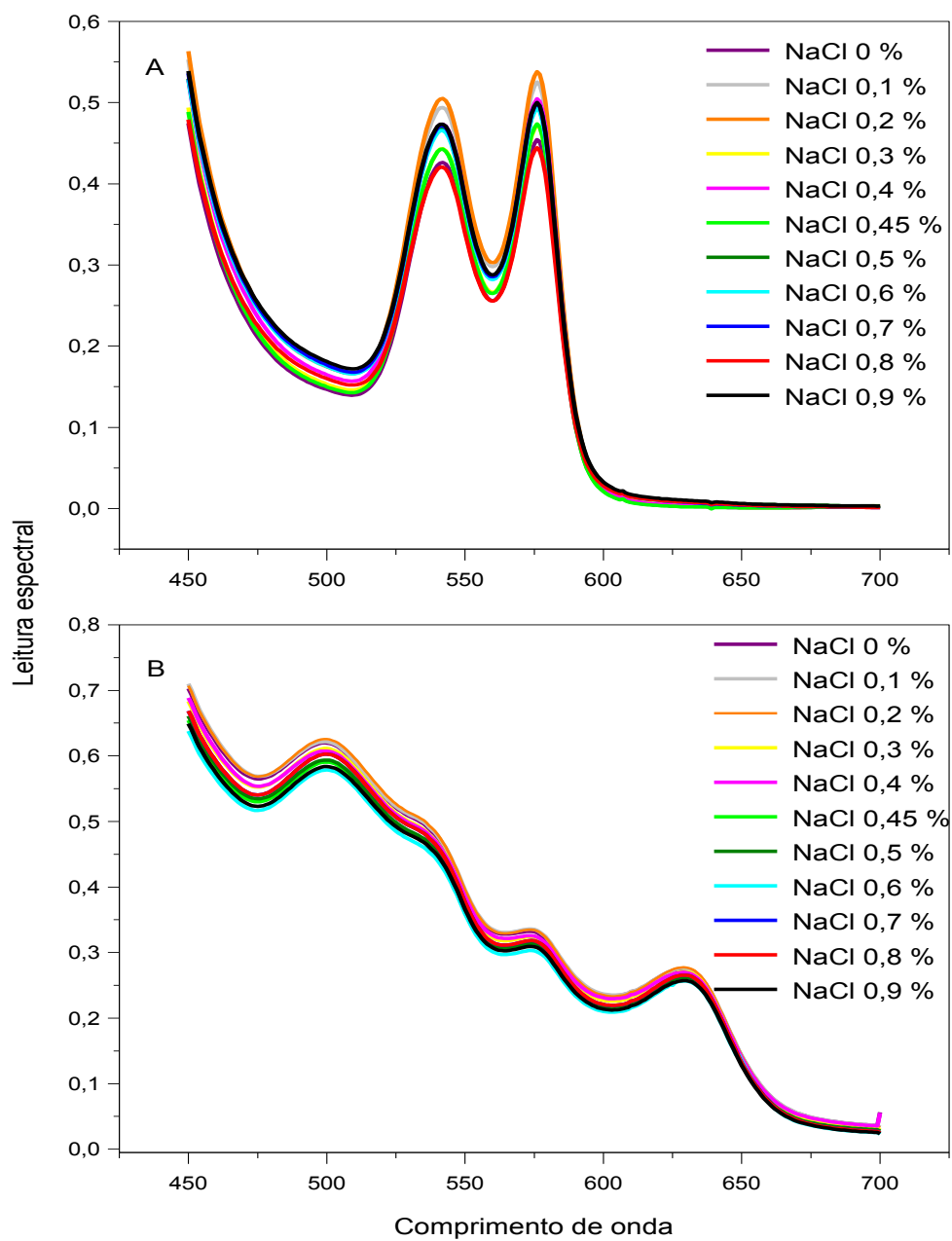


Figura 2.9. Efeitos de diferentes concentrações de NaCl sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) humanas. Condições experimentais: 37 °C.

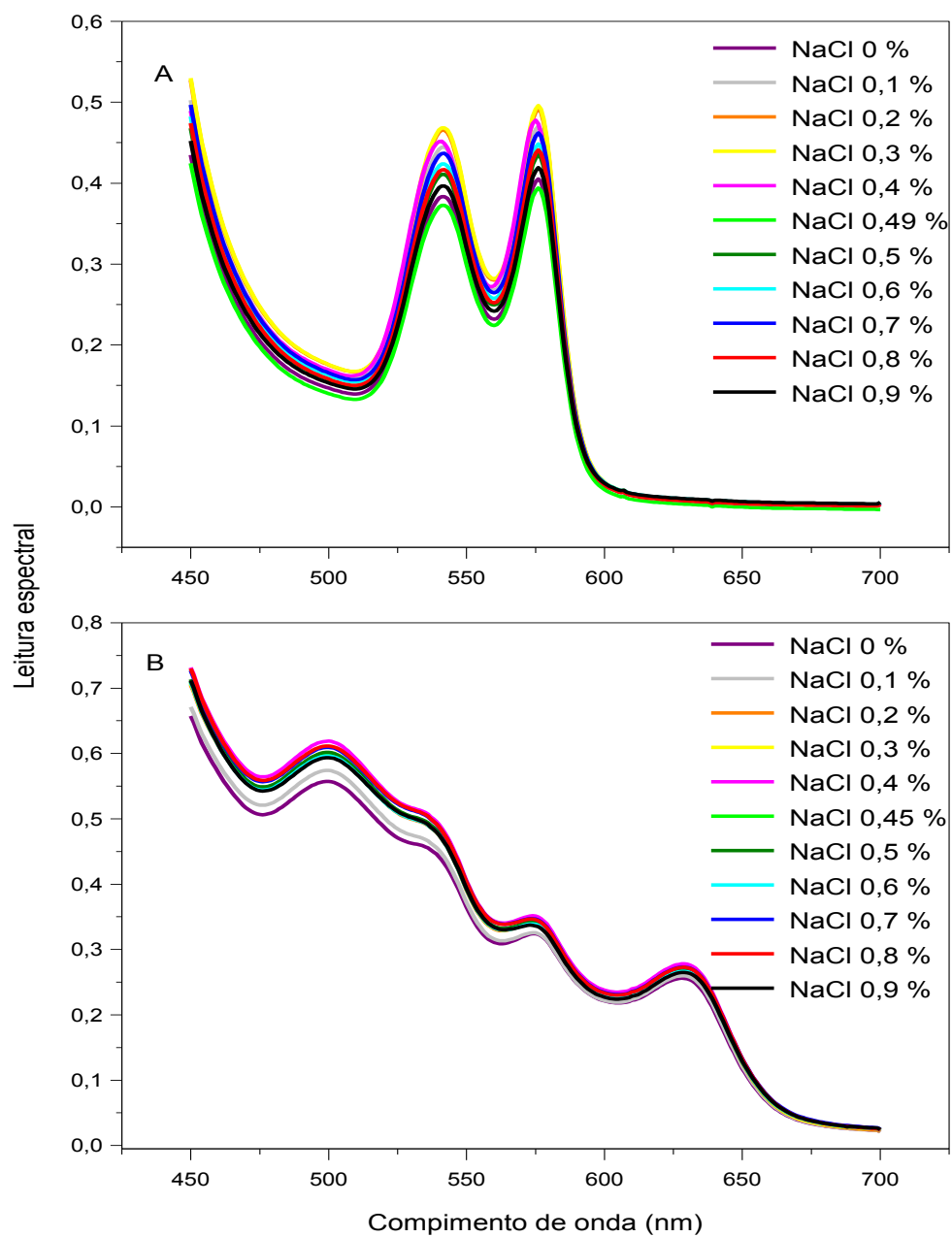


Figura 2.10. Efeitos de diferentes concentrações de NaCl associadas a 1,0 M de uréia sobre o espectro visível da oxiemoglobina (A) e da metemoglobina (B) humanas. Condições experimentais: 37 °C.

REFERÊNCIAS

- ASAKURA, T.; ADACHI, K.; SCHWARTZ, E. Stabilizing Effect of Various Organic Solvents on Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 18, p. 6423-25, 1978.
- ASAKURA, T.; MINAKATA, K.; ADACHI, K.; ROSSELL, M.O.; SCHWARTZ, E. denatured hemoglobin in sickle erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 59, p. 633-40, 1978.
- 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.
- BROWN, C.R.; HONG-BROWN, L.Q.; WELCH, W.J. Correcting temperature-sensitive protein folding defects. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 1432-1444, 1997.
- CANCHI, D.R.; PASCHEK, D.; GARCÍA, A.E. Equilibrium study of protein denaturation by urea. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 7, p. 2338-44, 2010.
- 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.
- CUNHA, C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.
- DILL, K.A.; SHORTLE, D. Denatured states of proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 795-825, 1991.
- ELBAUM, D.; PANDOLFELLI, E.R.; HERSKOVITS, T.T. Denaturation of human and *glycera dibranchiata* hemoglobins by the urea and amide classes of denaturants? **Biochemistry**, v. 13, n. 6, p.1278-84, 1974.

FLORY, P.J. Crystallinity and dimensional charges in fibrous proteins. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 49, sup. 1, p. 175-183, 1957.

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.

HERSKOVITS, T.T.; JAILLET, H. Structural Stability and Solvent Denaturation of Myoglobin. **Science**, v. 163, n. 3864, p. 282-285, 1969.

KAUZMANN, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 14, p. 1-63, 1959.

KRUK, NN. Study of the interaction of hemoglobin with ligands from resonance raman spectra. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 67, n. 5, p. 932-4, 2000.

LEE, J. C. Biopharmaceutical formulation. **Current opinion in biotechnology**, v. 11, p. 81-84, 2000.

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

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. 2211-17, 1971.

PANEK, A.D. Trehalose metabolism--new horizons in technological applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 2, p.169-181, 1995.

PELLER, L. On a Model for Helix-Random Coil Transition in Polypeptides I. The Model and its Thermal Behavior. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 1199-1206, 1959.

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

PRIVALOV, P.L.; GILL, S.J. Stability of protein structure and hydrophobic interaction. **Advances in Protein Chemistry**, v. 39, p. 191-250, 1988.

ROSSKY, P.J. Protein denaturation by urea: Slash and bond. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 16825-6, 2008.

ROTH, E.F.; ELBAUM, D.; NAGEL, R.L. Observations on the mechanical precipitation of oxy HB S and other mutants. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 377-86, 1975.

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

SINKO, J.P.; KAUZMANN, W. The kinetics of the urea denaturation of hemoglobin. Beef oxyhemoglobin. **Biochemistry**, v. 1, n.6, p. 1005-17, 1962.

STEINHARTDT, J. Properties of hemoglobin and pepsin in solutions of urea and other amides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 123, p. 543-575, 1938

STOREY, K.B.; MOSSER, D.D.; DOUGLAS, D.N.; GRUNDY, J.E.; STOREY, J.N. Biochemistry below 0 °C: nature's frozen vertebrates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 283-307, 1996.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p.121–282, 1968.

TIMASHEFF, S.N. Control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 22, p. 67-97, 1993.

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. 355-432, 1998.

TREJO, R.; HARTE, F. The effect of ethanol and heat on the functional hydrophobicity of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2338-43, 2010.

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, p. 15096-15104, 1995.

WELCH, W.J.; BROWN, C.R. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. **Cell Stress Chaperones**, v. 1, n. 2, p. 109-15, 1996.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DE COMBINAÇÕES DE DIFERENTES CAOTRÓPICOS NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS

RESUMO

Influência de combinações de diferentes caotrópicos sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos

Etanol e uréia são caotrópicos que também exercem ações como osmólitos. Altas concentrações de etanol têm mostrado promover estabilização de eritrócitos. Para melhor entender a origem desse efeito estabilizador, nós avaliamos a influência do calor na hemólise por uréia e a influência da uréia na hemólise por etanol e por estresse hipotônico. Ajustes sigmoidais foram usados para determinar os pontos de meia transição de hemólise por uréia (D_{50u}), etanol (D_{50e}) e estresse hipotônico (H_{50}). Aumento na temperatura promoveu diminuição nos valores de D_{50u} , o que pode ser atribuído aos efeitos caotrópicos sinérgicos do calor e da uréia. Aumento da concentração de uréia levou a uma diminuição dos valores de D_{50e} , indicando uma ação sinérgica de uréia com etanol na promoção de hemólise. Aumento na concentração de uréia levou a uma diminuição dos valores de H_{50} , indicando que a uréia antagonizou os efeitos hemolíticos do estresse hipotônico. As dependências de D_{50u} com a temperatura e de D_{50e} com diferentes concentrações de uréia produziram curvas sigmoidais com amplas transições entre duas diferentes regiões de estabilidade. A dependência de H_{50} com a concentração de uréia foi definida por uma curva sigmoidal com nítida transição entre duas diferentes regiões de estabilidade. Este comportamento pode ser atribuído a uma melhora na estabilidade de eritrócitos induzida pela combinação dos caotrópicos.

Palavras-chave: eritrócitos, etanol, estresse hipotônico, estabilidade de membrana, temperatura, uréia.

ABSTRACT

Influence of combinations of different chaotropes on the stability of human erythrocyte membrane

Ethanol and urea are chaotropes that also exert actions as osmolytes. High concentrations of ethanol have been shown to promote the stabilization of erythrocytes. To better understand the origin of this stabilization effect, we have evaluated the influence of heat on hemolysis by urea and the influence of urea on hemolysis by ethanol and hypotonic stress. Sigmoidally-defined curves have been used to determine the half-transition points of hemolysis by urea (D_{50u}), ethanol (D_{50e}), and hypotonic stress (H_{50}). Increasing temperature led to a decrease in the value of D_{50u} , which may be ascribed to the synergistic chaotropic effects of heat and urea. Increasing urea concentration led to a decrease in the value of D_{50e} , indicating a synergistic action of urea with ethanol in promoting hemolysis. Increasing urea concentrations led to decreasing values of H_{50} , indicating that urea antagonized the hemolytic effect of hypotonic stress. The dependences of D_{50u} on temperature and of D_{50e} on urea concentration both produced sigmoid-shaped curves with broad transitions between two different regions of stability. The dependence of H_{50} on the concentration of urea was defined by a sigmoid-shaped curve with a sharp transition between two different regions of stability. This behavior can be attributed to an enhancement of erythrocyte stability induced by the combination of chaotropes.

Keywords: Erythrocyte; ethanol; hypotonic stress; membrane stability; temperature; urea.

INTRODUÇÃO

A hemólise pode ser promovida por fatores que também são responsáveis por desnaturação de proteínas. Estes fatores incluem calor e ação de solutos caotrópicos como a uréia e o etanol. Tanto a uréia quanto o etanol podem entrar no eritrócito, arrastando água com eles, aumentando assim o volume celular. Este efeito, juntamente com o enfraquecimento da força hidrofóbica e desnaturação de proteínas da membrana, facilita a ocorrência de hemólise [JUMAA e MÜLLER, 1999].

A vulnerabilidade à lise também depende da composição da membrana do eritrócito. Por exemplo, ratos têm eritrócitos mais suscetíveis para lise hipotônica do que seres humanos [VIVES *et al.*, 1999]. Além disso, eritrócitos humanos são mais resistentes à lise em solução de glicerol que eritrócitos de carneiros [ZOU *et al.*, 2000]. Esta variação na resistência à hemólise também difere de pessoa para pessoa, o que pode ser compensado experimentalmente usando um tempo suficientemente longo de incubação [CRUZ SILVA *et al.*, 2000].

A hemólise também pode ser desfavorecida por fatores que incluem a ação de osmólitos, tais como glicerol e sorbitol [PENHA-SILVA *et al.*, 2008], e baixas concentrações de surfactantes.

O efeito protetor dos osmólitos sobre as células vermelhas do sangue pode ser devido a um aumento na força hidrofóbica, a qual é essencial para a manutenção da integridade da membrana dessas células [DUFOUR *et al.*, 2005].

Já os surfactantes têm uma ação dualística sobre a membrana celular. Eles têm um efeito protetor em baixas concentrações, mas promovem lise em concentrações mais elevadas. Acredita-se que o surfactante possa ser incorporado na membrana do eritrócito, permitindo que a célula aumente o seu volume para além do normal, mas sem estourar, o que é particularmente importante na proteção contra o estresse hipotônico, em que o eritrócito absorve água e incha até ser lisado. Um aumento da permeabilidade da membrana para íons, com estabelecimento de equivalência entre a pressão osmótica no interior e exterior do eritrócito, pode também proteger o eritrócito novamente contra estresse hipotônico [SÁNCHEZ *et al.*, 2007; VIVES *et al.*, 1999]. Com um aumento em sua concentração, os surfactantes passam a ter uma ação promotora de lise. O duodecil-sulfato de sódio (SDS), que é um caotrópico surfactante, promove desnaturação de proteínas [TANFORD, 1968; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2005; LIU *et al.*, 2007] e de membranas biológicas [HELENIUS e SIMONS, 1975]. A hemólise promovida por

surfactantes pode ocorrer por lise osmótica e por solubilização da membrana [BIELAWISKI, 1990; ISOMAA, 1979; MAHER e SINGER, 1984; SHALEL *et al.*, 2002] e é largamente desfavorecida na presença de concentrações de albumina da ordem daquela presente no plasma humano, em decorrência de sua capacidade em ligar as moléculas do detergente [FONSECA *et al.*, 2010].

A incorporação de etanol ou uréia em uma solução leva a aumento na osmolaridade. Assim, o etanol e a uréia devem combinar suas propriedades caotrópicas com suas ações como osmólitos. Em resumo, altas concentrações de etanol estão associadas com estabilização de eritrócitos [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008]. Neste estudo, nós avaliamos a influência de dois caotrópicos, calor e uréia, na hemólise produzida por estresse hipotônico ou etanol, no intuito de melhor compreender os efeitos estabilizadores descritos para o etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, com a participação de 20 voluntários saudáveis de ambos os sexos e idade entre 20 e 35 anos. Foram excluídos da pesquisa indivíduos portadores de doenças degenerativas, fumantes, etilistas e usuários de drogas lícitas ou ilícitas.

Coleta das amostras de sangue

Amostras de quatro mL de sangue foram coletadas, por punção intravenosa, em tubos evacuados contendo 50 µL de K₄EDTA a 1 g/dL como anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil), após jejum de 8 a 12 horas.

Reagentes e equipamentos

Os reagentes (NaCl, uréia e etanol) foram da marca Synth, com 99,9% de pureza, sendo a mesma corrigida no preparo das soluções. As medidas de volume foram realizadas em pipetas graduadas de vidro refratário e pipetas automáticas (Labystems, modelo Finnpiquette Digital, Helsinki, Finlândia). As medidas de massa foram feitas em uma balança digital (AND, modelo 870, Japão). As incubações foram feitas em banho termostático (Marconi, modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil). A centrifugação foi realizada em centrífuga Hitachi Koki (modelo CF15RXII, Hitachinaka, Japão). As

leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV1650TC, Japão).

Protocolo experimental

Tubos de polietileno (Eppendorff®), em duplicata, foram preenchidos com alíquotas de 1,5 mL de soluções com diferentes composições e concentrações e foram pré-incubadas em cada temperatura por 10 minutos. Após adição de 10 µL de sangue, os tubos foram tampados e seus conteúdos homogeneizados e incubados por 30 minutos. Em seguida eles foram centrifugados a 1600 *g* por 10 minutos. Alíquotas de 1 mL de sobrenadante foram usadas para leitura da absorvância a 540 nm. Este protocolo geral foi usado nos seguintes procedimentos: 1) avaliação do efeito do aumento da temperatura (17, 22, 27, 32, 37, 42, 47 e 52° C) na ação desnaturante da uréia (0-7 M) em 0,9 g/dL de NaCl; 2) avaliação do efeito do aumento da concentração de uréia (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 M) na estabilidade da membrana de eritrócitos contra ação desnaturante do etanol (0 a 20% v/v) em solução salina fisiológica (0,9 g/dL de NaCl) e a 37° C; 3) avaliação do efeitos do aumento da concentração de uréia (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 M) na estabilidade da membrana de eritrócitos sob estresse hipotônico (0 a 0,9 g/dL de NaCl) a 37° C.

Determinação da curva de lise dos eritrócitos

A dependência da absorvância com a concentração de uréia, etanol e NaCl, em cada condição, foi ajustada a uma linha de regressão sigmoideal dada pela equação de Boltzmann,

$$A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(X - X_{50})/dX}} + A_2 \quad (3.1),$$

onde A_1 e A_2 representam os valores médios de A_{540} nos platôs máximo ou mínimo de hemólise, X é a concentração de uréia, etanol ou NaCl, X_{50} representa a concentração de uréia, etanol ou NaCl que causou 50% de hemólise e dX é a variação de X na transição sigmoideal entre A_1 e A_2 .

Assim, para cada voluntário, em cada condição, foi gerado um X_{50} que foi posteriormente analisado. Quando a lise foi promovida por etanol ou por uréia, X_{50} foi representado como D_{50} . E quando a lise foi gerada por estresse hipotônico X_{50} foi representado como H_{50} .

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo Origin 8.0 (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, EUA). Os valores de X_{50} foram comparados entre as diferentes condições usando ANOVA, com aplicação do pós-teste de Tukey. Análises de regressão e diferenças entre os valores de X_{50} foram consideradas significantes quando P foi $< 0,05$.

RESULTADOS

Efeito da temperatura sobre a desnaturação de membranas por uréia em solução salina fisiológica

O efeito da temperatura sobre os valores de D_{50u} podem ser vistos na **Figura 3.1**. O aumento da temperatura desloca progressivamente as curvas de lise dos eritrócitos para a esquerda. Este deslocamento gera uma redução na concentração de uréia necessária para gerar 50% de hemólise (D_{50u}). Assim, houve diminuições significantes ($P < 0,05$) nos valores de D_{50u} com o aumento da temperatura (**Tabela 3.1**). Análise da correlação e regressão dos valores de D_{50u} em função da temperatura na amplitude estudada gerou uma regressão não-linear ($P < 0,05$) entre essas variáveis (**Figura 3.2**).

Efeito do aumento da concentração de uréia (0 a 2,5 mol/L⁻¹) na desnaturação de membranas de eritrócitos por etanol em solução salina fisiológica

Adição de concentrações crescentes de uréia deslocou as curvas de hemólise por etanol para a esquerda (**Figura 3.3**). Em consequência desse deslocamento, houve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na concentração de etanol responsável por 50% de hemólise (D_{50e}) entre todas as concentrações de uréia (**Tabela 3.2**). Uma dependência sigmoideal ($P < 0,05$) foi observada entre os valores de D_{50e} e a concentração de uréia (**Figura 3.4**).

Efeito do aumento da concentração de uréia (0 a 2,5 mol/L⁻¹) na desnaturação de membranas de eritrócitos por estresse hipotônico

A lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico foi também avaliada a 37 °C na ausência e na presença de concentrações crescentes de uréia (0 a 2,5 mol.L⁻¹). O

efeito da adição de uréia está demonstrado na **Figura 3.5**. Houve redução significativa ($P < 0,05$) nos valores de H_{50} com a adição de uréia nas concentrações 1; 1,5; 2,0 e 2,5 mol.L⁻¹ em relação ao choque hipotônico na ausência de uréia (**Tabela 3.3**). Uma dependência sigmoide ($P < 0,05$) foi observada na correlação dos valores de H_{50} com a concentração de uréia (**Figura 3.6**).

DISCUSSÃO

Efeito da temperatura na hemólise promovida por uréia

Em proteínas, a ação caotrópica da uréia está associada com a redução no efeito hidrofóbico [BRESLOW e GUO, 1990] bem como na redução da energia envolvida na formação da camada de hidratação ao redor da macromolécula, o que minimiza a diferença de energia livre entre o estado nativo e o estado desnaturado [WANG e BOLEN, 1997], deslocando o equilíbrio para o estado desnaturado [TIMASHEFF, 2002].

A ação da uréia na membrana de eritrócitos não é totalmente conhecida, mas envolve difusão do caotrópico para o interior da célula, arrastando água com ele, conseqüentemente aumentando o volume celular. Esta ação está associada a uma diminuição na força hidrofóbica, a qual também é importante na formação e manutenção da bicamada lipídica, com desnaturação de proteínas e fuga de fosfolípidios para o ambiente externo da membrana, levando ao rompimento da membrana eritrocitária.

O deslocamento das curvas de hemólise por uréia para a esquerda com o aumento da temperatura (**Figura 3.1**) significa que o calor diminui a quantidade de uréia necessária para promover 50% de hemólise (D_{50u}). Isto pode ser atribuído a uma potencialização do efeito caotrópico da uréia pelo calor, provavelmente através do aumento da agitação térmica dos grupos na membrana. Esta diminuição na estabilidade levaria a uma maior taxa de difusão de uréia para o interior do eritrócito [GORDIYENKO *et al.*, 2004; JUMAA e MÜLLER, 1999].

Compostos que induzem a formação de redes de moléculas de água, tais como NaCl, dificultam a entrada de água no eritrócito, enquanto moléculas que quebram essas redes exercem efeito contrário [JUMAA e MÜLLER, 1999]. Assim, uma elevação de temperatura ajudaria a quebrar as redes de moléculas de água, possivelmente pela

solubilização da uréia, o que permitiria a entrada de mais água no eritrócito, favorecendo ainda mais a ocorrência de lise.

No entanto, esse efeito parece apresentar um comportamento de saturação com o aumento da temperatura. A curva da dependência de D_{50u} com a temperatura torna-se achatada na região de mais alta temperatura do intervalo estudado (**Figura 3.2**). Isso poderia significar a existência de heterogeneidade na população de células vermelhas do sangue ou em um deslocamento do equilíbrio entre populações de eritrócitos com diferentes estabilidades, de tal forma que células menos estáveis estariam sendo convertidas em células mais estáveis, em decorrência da combinação dos efeitos do calor com os da uréia. Esse deslocamento de equilíbrio é consistente com relatos na literatura sobre estabilização induzida pelo aumento da osmolaridade das soluções [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

Efeitos da uréia na hemólise induzida por etanol

A ação caotrópica do etanol nas proteínas está baseada na atenuação da força hidrofóbica e na melhor acomodação no solvente das cadeias laterais apolares dos aminoácidos [CASTRONOUVO *et al.*, 1999; FONSECA *et al.*, 2006; NOZAKI e TANFORD, 1971; WANG e BOLEN, 1997]. A lise de eritrócitos por etanol também pode estar associada a uma atenuação da força hidrofóbica, o que promoveria desnaturação de proteínas e desestabilização da bicamada lipídica da membrana. Nessa situação, a influência da pressão osmótica na hemólise deve ser muito menos significativa, uma vez que concentrações muito baixas de etanol são capazes de promover 50% de lise de eritrócitos humanos, enquanto que concentrações muito mais elevadas de uréia não promoveram lise nas nossas condições experimentais.

A quantidade de etanol requerida para causar 50% de hemólise (D_{50e}) diminui com o aumento da concentração de uréia (**Figura 3.3**). Este efeito se deve a uma ação sinérgica dos dois caotrópicos, provavelmente porque ambos os solutos podem diminuir o efeito hidrofóbico. Entretanto, a combinação dos efeitos da uréia e etanol parece estar sujeita ao mesmo efeito de saturação (**Figura 3.4**) observado para a combinação dos efeitos da uréia e do calor (**Figura 3.2**). Próximo ao limite superior do intervalo de concentração de uréia utilizado a curva sigmóide tornou-se achatada. Isto pode ser devido à heterogeneidade da população de células vermelhas do sangue, com eritrócitos mais resistentes co-existindo com células mais sensíveis, ou então um efeito de estabilização promovido pela combinação de uréia e etanol. Uma propriedade da

solução que aumenta com essa combinação de solutos é a osmolaridade. A ocorrência de estabilização como resultado do aumento da osmolaridade da solução é consistente com relatos prévios da literatura [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

Efeito da uréia na hemólise induzida por estresse hipotônico

O resultado mais interessante e mais intrigante encontrado foi que o aumento da concentração de uréia levou a uma diminuição na concentração de NaCl responsável por 50% de hemólise (H_{50}) (**Figura 3.5**). Isto significa que concentrações crescentes de uréia tornam os eritrócitos mais resistentes à lise por estresse hipotônico. Em um meio isotônico, aumento da concentração de uréia levou a aumento da hemólise (**Figura 3.1**). Entretanto, em um meio hipotônico a uréia teve um efeito protetor (**Figura 3.6**).

A curva sigmoideal observada para a dependência de H_{50} com a concentração de uréia exibe uma transição brusca entre duas regiões de estabilidade, com ponto de meia-transição em torno de 1 M de uréia. De fato, uma redução anormal do volume de reticulócitos falciformes foi verificada na presença de uréia a 0,6 M [JOINER *et al.*, 2007]. Este resultado sugere que a uréia esteja estabilizando os eritrócitos contra o estresse hipotônico, com conversão de eritrócitos menos estáveis em células mais estáveis.

Tal efeito estabilizador deve ser o resultado líquido da soma de diferentes mecanismos. Um maior influxo de uréia para os eritrócitos seria esperado com o aumento da concentração desse soluto na solução. No entanto, isto reforçaria a lise através de um novo aumento da pressão osmótica da célula em relação ao ambiente externo. Uma vez que os eritrócitos foram estabilizados e não sofrem lise na presença de altas concentrações deste caotrópico, é razoável supor que o efeito protetor da uréia seja proveniente das moléculas de uréia que se encontram fora e não dentro da célula.

A uréia pode promover a formação de redes de moléculas de água por diminuição do custo energético associado com este processo. Isto poderia ser a razão pela qual a uréia promove a solubilização de compostos hidrofóbicos [DUFOUR *et al.*, 2005]. O favorecimento para a formação de redes de moléculas de água por uréia tornaria a entrada de água no eritrócito mais difícil. Esta ação deve ser proporcional à concentração de uréia. A grande concentração extracelular de uréia tornaria a membrana plasmática do eritrócito mais permeável aos íons, permitindo sua fuga para o ambiente externo. Isto pode ser devido a uma reorganização dos lipídios, ou mesmo uma maior abertura dos canais iônicos, ambos associados a uma diminuição na força hidrofóbica.

De fato, a contração do volume produzido pela uréia em reticulócitos falciformes tem sido associada com a sua estimulação de um co-transportador KCl [JOINER *et al.*, 2007]. O efluxo de íons diminuiria a diferença de pressão osmótica entre o eritrócito e o meio externo. Uma teoria similar é utilizada para explicar o efeito protetor de alguns surfactantes [VIVES *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2007].

Se o efeito líquido de uréia na solução for baseado nestes mecanismos, nós esperaríamos um aumento da capacidade de acomodação dos fosfolipídios da membrana na solução. Este mecanismo está, provavelmente, em funcionamento, mas em conjunto com outro mecanismo que limita este processo. Tal mecanismo pode ser o aumento da osmolaridade na fase externa da solução. De fato, o aumento da estabilidade baseado no aumento da osmolaridade tem sido amplamente descrito na literatura [BOUTRON e ARNAUD, 1984; PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997;. WAGNER *et al.*, 2002]. Esta estabilização foi considerada em um modelo de transição morfológica que considerou a existência de hemácias em formas menos estáveis, coletivamente designadas como células em estado R, e em formas mais estáveis, coletivamente designados como células em estado T, presentes em meios de baixa e alta osmolaridade, respectivamente [CUNHA *et al.*, 2007;. PENHA- SILVA *et al.*, 2008].

CONCLUSÃO

A combinação de caotrópicos produziu mudanças nas curvas de hemólise compatíveis com a ocorrência da estabilização de eritrócitos induzida por esses caotrópicos.

Tabela 3.1. Efeito da temperatura no ponto de meia-transição (D_{50u}) da lise de eritrócitos humanos por uréia. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl.

Temperatura °C	D_{50u} (média $\pm$ desvio padrão)	P
17	4,00 $\pm$ 0,12 (N = 10)	a
22	3,85 $\pm$ 0,26 (N = 11)	a, b
27	3,66 $\pm$ 0,26 (N = 11)	b, c
32	3,51 $\pm$ 0,22 (N = 11)	c
37	3,14 $\pm$ 0,20 (N = 11)	
42	2,71 $\pm$ 0,17 (N = 11)	
47	2,15 $\pm$ 0,10 (N = 10)	
52	1,57 $\pm$ 0,07 (N = 10)	

^{a,b,c} $P > 0,05$ indicando que não houve diferença estatisticamente significante entre as temperaturas (teste de Tukey).

Tabela 3.2. Efeito da concentração de uréia sobre o ponto de meia-transição (D_{50e}) da lise de eritrócitos humanos por etanol a 37 °C. Condições experimentais: 0,9 g/dL NaCl.

Uréia (M)	D_{50e} (média $\pm$ desvio padrão)	<i>P</i>
0	14,36 $\pm$ 0,25 (N = 10)	*
0,5	13,64 $\pm$ 0,56 (N = 10)	*
1,0	12,16 $\pm$ 0,14 (N = 10)	*
1,5	10,47 $\pm$ 0,41 (N = 10)	*
2,0	6,35 $\pm$ 0,36 (N = 10)	*
2,5	3,16 $\pm$ 0,31 (N = 10)	*

* $P < 0,05$ indicando diferença estatisticamente significante entre as concentrações de uréia (teste de Tukey).

Tabela 3.3. Efeito da concentração de uréia sobre o ponto de meia transição (H_{50}) da lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico a 37 °C.

Uréia (M)	H_{50} (média $\pm$ desvio padrão)	<i>P</i>
0	0,487 $\pm$ 0,005 (N = 10)	a
0.5	0,490 $\pm$ 0,002 (N = 10)	a
1.0	0,471 $\pm$ 0,006 (N = 10)	
1.5	0,462 $\pm$ 0,006 (N = 12)	
2.0	0,456 $\pm$ 0,005 (N = 10)	b
2.5	0,454 $\pm$ 0,005 (N = 10)	b

^{a,b} $P > 0.05$ indicando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de uréia (teste de Tukey).

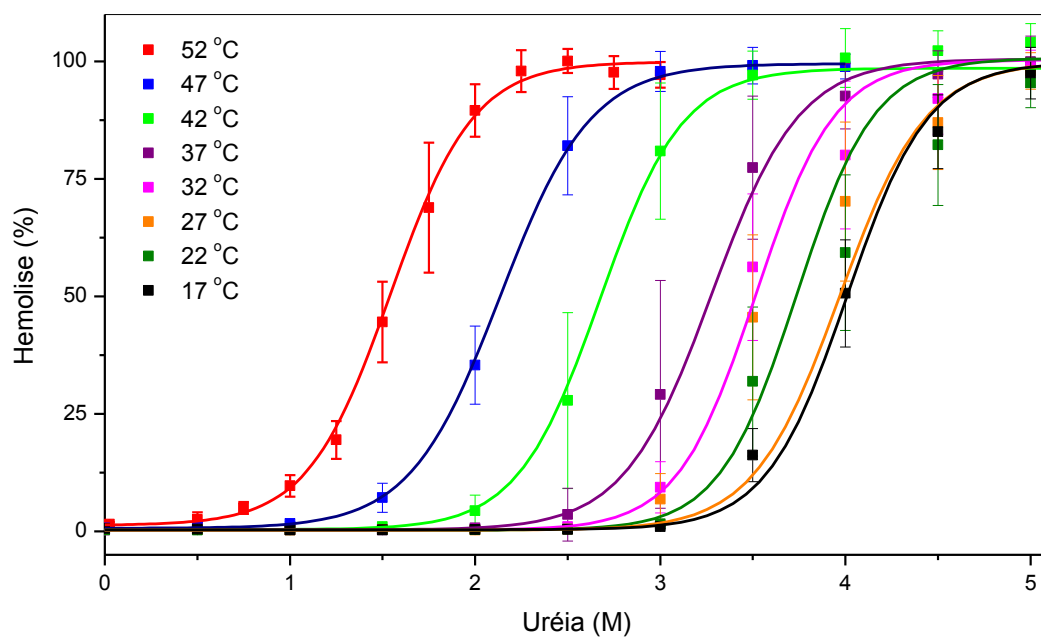


Figura 3.1. Efeito da temperatura na curva de lise de eritrócitos humanos por uréia. Condições experimentais: 0,9 g/dL NaCl.

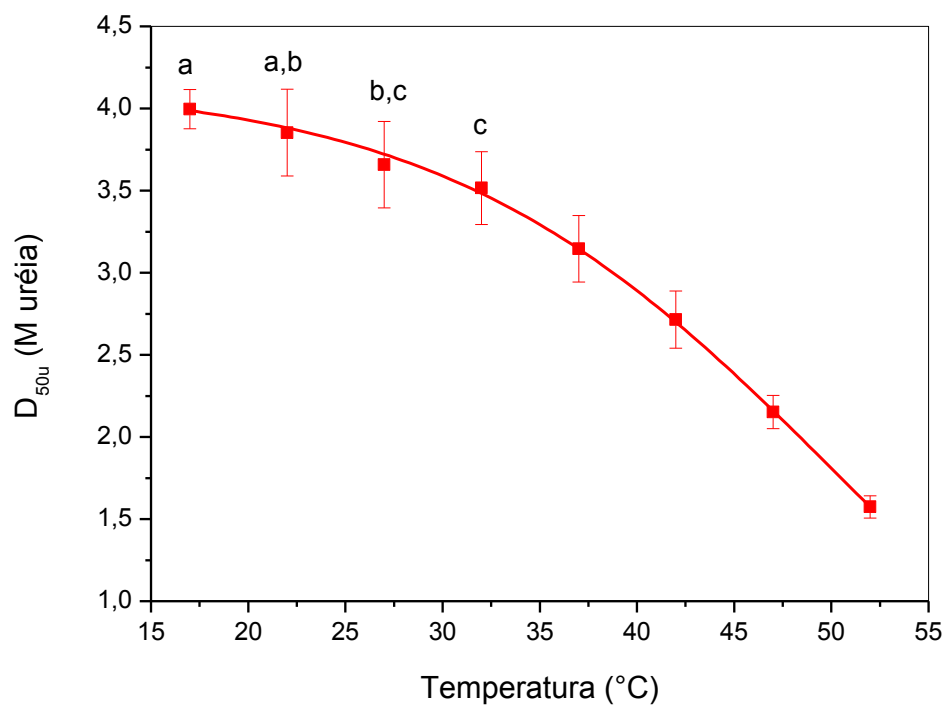


Figura 3.2. Dependência dos valores de meia-transição da hemólise por uréia (D_{50u}) com a temperatura. ^{a,b,c} $P > 0.05$ indicando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas (teste de Tukey).

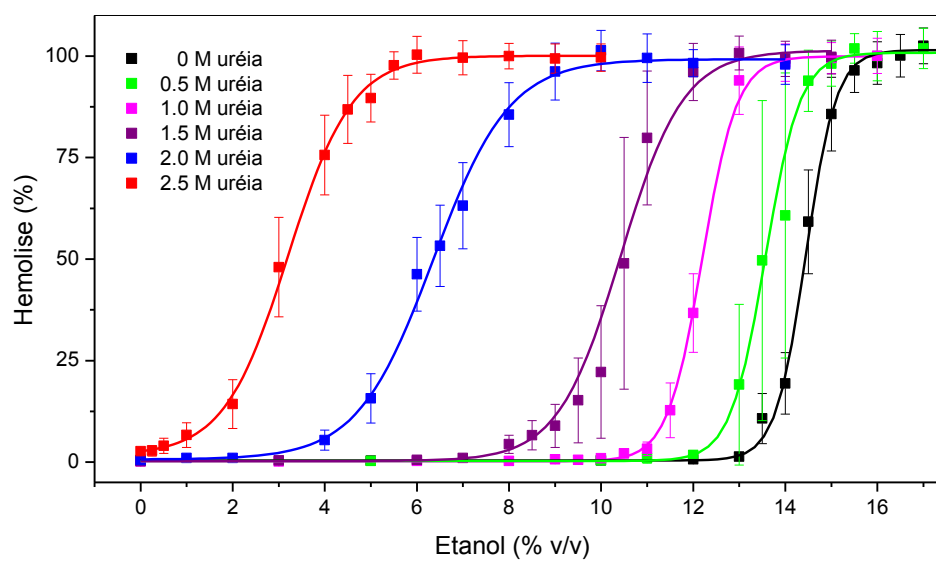


Figura 3.3. Efeito da adição de uréia na curva de lise de eritrócitos humanos por etanol. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl e 37 °C.

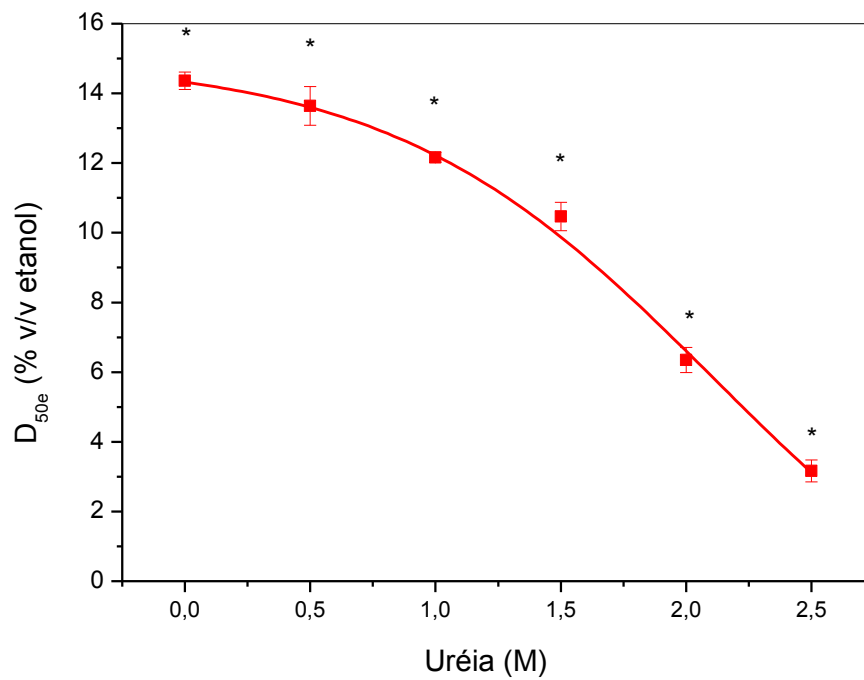


Figura 3.4. Dependência dos valores de meia-transição da lise de eritrócitos humanos por etanol (D_{50e}) com a concentração de uréia. Condições experimentais: 0.9 g/dL NaCl e 37 °C. * $P < 0,05$ indicando diferenças estatisticamente significantes entre todas as concentrações de uréia (teste de Tukey).

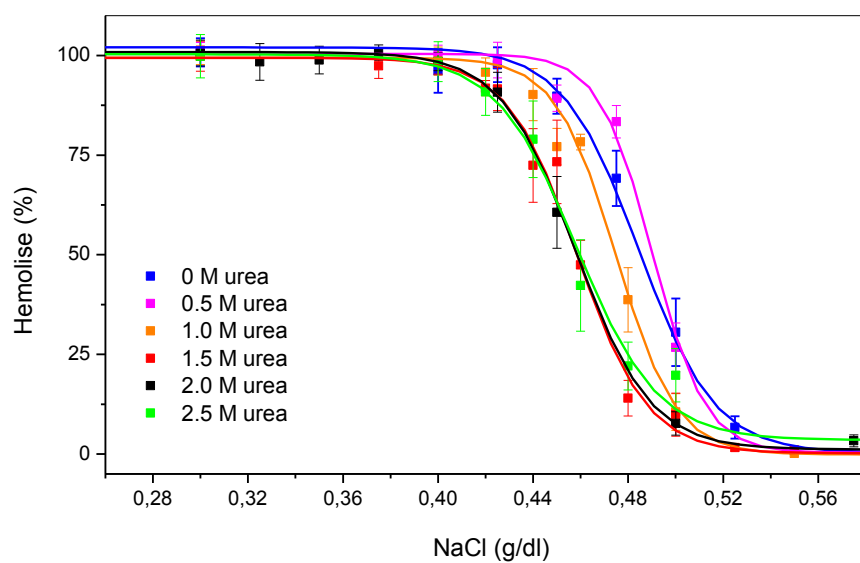


Figura 3.5. Efeito da adição de uréia na lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico. Condições experimentais: 37 °C.

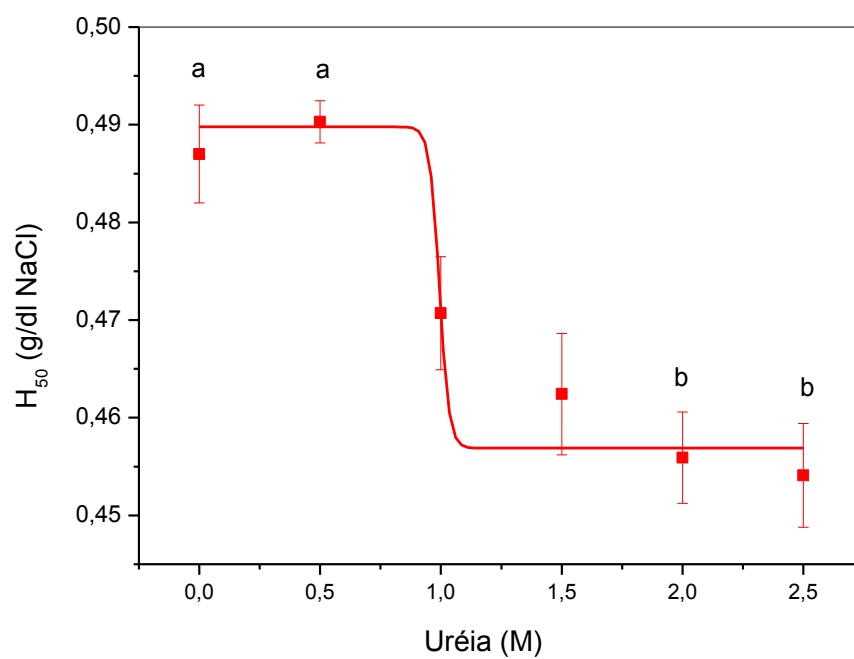


Figura 3.6. Dependência dos valores de meia-transição da lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico (H_{50}) com a concentração de uréia. Condições experimentais: 37 °C. ^{a,b} $P > 0.05$ indicando que não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de uréia (teste de Tukey).

REFERÊNCIAS

BIELAWSKY, J. Two types of haemolytic activity of detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1035, p. 214-7, 1990.

BOUTRON, P.; ARNAUD, F. Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. **Cryobiology**, v. 21, p. 348–58, 1984.

BRESLOW, R.; GUO, T. Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 167-9, 1990.

CASTRONOUOVO, 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.

CRUZ SILVA, M.M.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M.; CUSTÓDIO, J.B.A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1464, p. 49-61, 2000.

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

DUFOUR, S.; DALEU, M.; NOTT, K.; WATHELET, B.; THONART, P.; PAQUOT, M. Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physicochemical properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 87-95, 2005.

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.

FONSECA, L.; ARVELOS, L.; NETTO, R.; LINS, A.; GARROTE-FILHO, M.; PENHA-SILVA, N. (2010) Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Sept 21 [Epub ahead of print], 2010. doi: 10.1007/s10863-010-9310-y.

GORDIYENKO, O.I.; LINNIK, T.P.; GORDIYENKO, E.O. Erythrocyte membrane permeability for a serie of diols. **Bioelectrochemistry**, v. 62, p. 115-118, 2004.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 415, p. 29-79, 1975.

ISOMAA, B. Interactions of surface-active alkyltrimethylammonium salts with the erythrocyte membrane. **Biochemical Pharmacology**, v. 28, p. 975- 980, 1979.

JOINER, C.H.; RETTIG, R.K.; JIANG, M.; RISINGER, M.; FRANCO, R.S. Urea stimulation of KCl cotransport induces abnormal volume reduction in sickle reticulocytes. **Blood**, v. 109, p. 1728-1735, 2007.

JUMAA, M.; MÜLLER, B.W. In vitro investigation of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, p. 207-212, 1999.

LIU, W.; GUO, X.; GUO, R. The interaction between hemoglobin and two surfactants with different charges. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 548–557, 2007.

MAHER, P.; SINGER, S.J. Structural changes in membranes produced by the binding of small amphipathic molecules. **The Journal of Biochemistry**, v. 23, p. 232- 240, 1984.

MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. Thermodynamics of protein denaturation by sodium dodecyl sulfate. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 2, p. 189-196, 2005.

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

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

SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, V.; INFANTE, M.R.; MITJANS, M.; VINARDELL, M.P. Hemolysis and antihemolysis induced by amino acid-based surfactants. **Toxicology Letters**, v. 169, p. 177-184, 2007.

SHALEL, S.; STREICHMAN, S.; MARMUR, A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 252, p. 66–76, 2002.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 121–282, 1968.

TIMASHEFF, S.N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 9721-9726, 2002.

VIVES, M.A.; INFANTE, M.R.; GARCIA, E.; SELVE, C.; MAUGRAUS, M.; VINARDELL, M.P. Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. **Chemico-Biological Interactions**, v. 118, p. 1-18, 1999.

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

ZOU, C.C.; AGAR, N.S.; JONES, G.L. Hemolysis of human and sheep red blood cells in glycerol media: the effect of pH and the role of band 3. **Comparative Biochemistry**

and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, v. 127, p. 347-353, 2000.