

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

**EFEITOS DE COMBINAÇÕES DE HIDROCLORETO DE GUANIDINA,
ETANOL, CALOR E HIPOTONICIDADE NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA
DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Leticia Ramos de Arvelos**
Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

UBERLÂNDIA, MG
2010

**EFEITOS DE COMBINAÇÕES DE HIDROCLORETO DE GUANIDINA,
ETANOL, CALOR E HIPOTONICIDADE NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA
DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Leticia Ramos de Arvelos**
Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

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

UBERLÂNDIA, MG
2010

**EFEITOS DE COMBINAÇÕES DE HIDROCLORETO DE GUANIDINA,
ETANOL, CALOR E HIPOTONICIDADE NA ESTABILIDADE DE MEMBRANA
DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

Estudante: **Leticia Ramos de Arvelos**

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Data da defesa: **20/06/2010**

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

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

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

(Isaías 40: 31, Bíblia Sagrada)

DEDICATÓRIA

A Deus,

pelo que sou,
pela fé e perseverança,
pela conquista.

Aos meus pais,

exemplos de caráter, dignidade, luta, confiança, humildade e fé,
por todo carinho, preocupação e amor,
por estarem sempre presentes.
A vocês, agradeço e dedico minha alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar me iluminando e me guiando.

Aos meus pais, **Juvêncio Ramos Diniz e Divina Aparecida Ramos de Arvelos**, pela oportunidade de estudo.

Aos meus irmãos, **Eudes José Ramos e Eudimar Ramos de Arvelos**, pelo incentivo.

As minhas cunhadas, **Andréia Cristina Rosa Ramos e Fernanda Flávia Ferreira de Arvelos**, por sempre torcerem por mim.

As minhas sobrinhas **Ellen Cristina Rosa Ramos, Laura Ferreira de Arvelos e Maria Júlia Rosa Ramos**, motivo de felicidade e alegrias.

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

Ao meu orientador, Dr. **Nilson Penha-Silva**, meu sincero agradecimento por compartilhar seu tema de pesquisa, sabedoria, e principalmente, por ser paciente e compreensivo nos momentos difíceis do desenvolvimento do trabalho. Pela amizade e alegria de trabalharmos juntos.

À **Cleine Chagas da Cunha Arvelos**, pelo início da minha formação científica.

Às minhas amigas e colega de laboratório **Vanessa Custódio Afonso Rocha e Lúbia Cristina Fonseca**, pela amizade e companheirismo.

Aos demais colegas do laboratório, **Rita de Cássia Mascarenhas Neto, Mariana Vaini de Freitas, Aline Lins, Guilherme Santos Duarte Lemos, Mário da Silva Garrote Filho, Liandra Freitas Márquez Bernardes, Morun Bernardino Neto, Gabriela Pereira Félix, Larissa Freitas Rodrigues, Fernando Vieira Rodrigues e José Otávio Batista Leite**, pelos auxílios, ensinamentos e amizade.

Às minhas amigas **Vanessa Macedo Tomás da Cunha e Rita de Cássia Vieira** pela ajuda no início do mestrado.

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica, particularmente a **Lindaaura Arantes de Carvalho, Jusciane Aparecida Sousa e Gerson Fraissat Mamede**, pelo auxílio, colaboração e amizade.

E a todos que de alguma forma colaboraram para execução desse trabalho.

APOIO

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR



CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU)



ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	ix
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
Apresentação	01
Capítulo 1. Fundamentação teórica	03
Estabilidade de membrana	04
Estrutura e composição da membrana de eritrócito	05
Estabilidade de membrana de eritrócito	07
Considerações finais	09
Referências	12
Capítulo 2. Trabalho experimental	19
Resumo	20
Abstract	21
Introdução	22
Material e métodos	25
Resultados	29
Discussão	52
Conclusões	57
Referências	58

ABREVIATURAS

A₁	Absorvância antes da transição de lise dos eritrócitos por etanol, hidrocloreto de guanidina ou depois da transição de lise por estresse hipotônico
A₂	Absorvância depois da transição de lise dos eritrócitos por etanol, hidrocloreto de guanidina ou antes da transição de lise por estresse hipotônico
D	Desnaturante (etanol, hidrocloreto de guanidina)
D₅₀	Concentração de caotrópico que produz 50% de hemólise
D_{50Et}	Concentração de etanol que produz 50% de hemólise
D_{50GuHCl}	Concentração de hidrocloreto de guanidina que produz 50% de hemólise
D_{50R}	Concentração de etanol que produz 50% de lise do estado <i>R</i> dos eritrócitos
D_{50T}	Concentração de etanol que produz 50% de lise do estado <i>T</i> dos eritrócitos
dD	Amplitude da concentração do desnaturante na transição de desnaturação
Estado R	Estado expandido dos eritrócitos
Estado T	Estado compactado dos eritrócitos
FOE	Fragilidade osmótica dos eritrócitos
GuHCl	Hidrocloreto de guanidina
H₅₀	Concentração de NaCl que produz 50% de hemólise
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados ('polyunsaturated fatty acids')
Salina	Solução de NaCl a 0,9 g.dL ⁻¹
SFA	Ácidos graxos saturados ('saturated fatty acids')
UFA	Ácidos graxos insaturados ('unsaturated fatty acids')

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Relações entre a estabilidade e a funcionalidade de uma membrana biológica com sua fluidez	10
Figura 2.1. Efeito da temperatura sobre as curvas de lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina	33
Figura 2.2. Ajuste linear da dependência da meia transição de lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina com a temperatura	35
Figura 2.3. Ajuste polinomial cúbico da dependência da meia transição de lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina com a temperatura	36
Figura 2.4. Efeito do hidrocloreto de guanidina sobre a curva de lise de eritrócitos humanos por etanol	37
Figura 2.5. Ajuste linear da dependência do ponto de meia transição de lise de eritrócitos humanos por etanol com a concentração de hidrocloreto de guanidina	39
Figura 2.6. Ajuste sigmoidal da dependência do ponto de meia transição de lise de eritrócitos humanos por etanol com a concentração de hidrocloreto de guanidina	40
Figura 2.7. Efeito do hidrocloreto de guanidina sobre a lise de eritrócitos por estresse hipotônico	41
Figura 2.8. Curva típica de lise de eritrócitos humanos por de hidrocloreto de guanidina	42
Figura 2.9. Efeito da concentração de hidrocloreto de guanidina sobre a desnaturação de hemoglobina humana	43
Figura 2.10. Efeito da concentração de etanol sobre a absorvância em 540 nm de hemoglobina humana	44
Figura 2.11. Efeito da presença de 0,6 M de GuHCl sobre a absorvância em 540 nm na região de pré-transição de desnaturação da hemoglobina humana por etanol	45
Figura 2.12. Efeito da temperatura sobre a lise de eritrócitos por estresse hipotônico	46
Figura 2.13. Ajuste linear da dependência da meia transição de lise hipotônica (H_{50}) de eritrócitos humanos com a temperatura	48
Figura 2.14. Ajuste sigmoidal da dependência da meia transição de lise hipotônica (H_{50}) de eritrócitos humanos com a temperatura	49
Figura 2.15. Efeito da concentração de NaCl sobre a absorvância em 540 nm de hemoglobina humana	51

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1. Principais proteínas de membrana e citoesqueleto do eritrócito.....	11
Tabela 2.1. Efeito da temperatura sobre os valores de D_{50G} (média $\pm$ desvio padrão) para lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina em solução de NaCl a 0,9 g/dL	34
Tabela 2.2. Efeito da concentração de hidrocloreto de guanidina sobre os valores de D_{50} para a lise de eritrócitos humanos por solução de etanol em NaCl a 0,9 g/dL e 35 °C	38
Tabela 2.3. Efeito da temperatura sobre os valores de H_{50} (média $\pm$ desvio padrão) para lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico.....	47
Tabela 2.4. Valores do parâmetro A_1 (média $\pm$ desvio-padrão) obtido na regressão sigmoidal para a dependência da absorvância em 540 nm com a concentração de NaCl em diferentes temperaturas	50

APRESENTAÇÃO

Os complexos organizacionais biológicos compreendem as proteínas, ácidos nucleicos e membranas. Eles dependem da preservação de suas estruturas para exercer suas funções. A capacidade de manter sua estrutura, definida como estabilidade, é um requisito essencial para preservação de sua função. Entretanto, estabilidade e funcionalidade não são propriedades equivalentes em um sentido absoluto. Um excesso de estabilidade compromete a maleabilidade necessária para a ocorrência dos eventos transconformacionais associados à funcionalidade desses complexos. Qualquer complexo biológico deve congrega um nível necessário de estabilidade com o nível de funcionalidade exigido pelo organismo.

As relações entre estabilidade e funcionalidade de complexos biológicos têm sido alvo de investigação no Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia. Estes estudos começaram com a avaliação de efeitos de caotrópicos e de osmólitos sobre a estabilidade de enzimas e mais recentemente incorporaram a membrana do eritrócito como objeto de estudo.

A estabilidade da membrana do eritrócito pode ser facilmente monitorada pela quantidade de hemólise, a qual pode ser avaliada por espectrofotometria visível. A hemólise está associada a uma elevação sigmoide da absorvância nas regiões do espectro onde a hemoglobina apresenta picos de absorvância, como no comprimento de onda de 540 nm. A dependência da absorvância em 540 nm em função da concentração do agente hemolítico pode ser analisada por regressão não-linear, com base na equação de Boltzmann. Essa linha de regressão caracteriza a transição dos eritrócitos de um estado íntegro para um estado lisado, permitindo a definição do ponto de meia-transição de lise, que pode ser referido genericamente como X_{50} . Isso permite a avaliação de agentes caotrópicos, como hipotonicidade, etanol, uréia, hidrocloreto de guanidina e calor, bem como de agentes estabilizantes ou protetores contra hemólise, como glicerol e sorbitol, sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos. Para a lise por hipotonicidade, em gradiente decrescente de NaCl, X_{50} apresenta uma relação inversa com a estabilidade, pois a membrana do eritrócito é tanto mais estável quanto menor o valor de X_{50} . Por isso, X_{50} apresenta uma relação direta com a fragilidade osmótica dos eritrócitos e foi convenientemente designado de H_{50} , a concentração de NaCl que promove 50% de hemólise. Para a lise pelos outros agentes hemolíticos, em gradiente crescente de concentração do caotrópico, X_{50} apresenta uma relação direta com a estabilidade, pois a membrana do eritrócito é tanto mais estável quanto maior é o valor de

X₅₀. Por isso, **X₅₀** é designado como **D₅₀**, a concentração do caotrópico que promove 50% de hemólise.

Essa dissertação apresenta os resultados obtidos a respeito da influência 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.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Estabilidade de membrana

A estabilidade de membrana é a propriedade desse complexo biológico em manter sua estrutura diante de condições ou agentes que favoreçam sua desintegração. Ela depende de fatores associados a sua composição e à composição da solução e das condições ambientais.

A maior estabilidade de membrana não coincide necessariamente com a melhor funcionalidade. Uma membrana deve apresentar um nível necessário de estabilidade que garanta sua melhor funcionalidade. Estabilidade e funcionalidade são propriedades que dependem do grau de fluidez de membrana. Fluidez é uma propriedade da matéria que aumenta à medida que se vai do estado sólido para o estado gasoso. O balanço necessário entre a estabilidade e a funcionalidade de uma membrana biológica exige um nível intermediário de fluidez, chamado de fluidez crítica, encontrada entre os estados sólido e líquido (**Figura 1.1**).

Na região de fluidez crítica da membrana, ela congrega a estabilidade necessária para preservação do nível de elasticidade necessário para que as células sofram as alterações conformacionais exigidas pelo exercício de funções como a transdução de sinais hormonais para o interior da célula e o transporte de solutos [[SINENSKY, 1974](#)].

A manutenção da fluidez crítica é feita por mecanismos homeostáticos como a regulação do teor de colesterol e ácidos graxos saturados (SFA) de fosfolipídeos em relação ao teor de ácidos graxos insaturados (UFA) dos fosfolipídios de membrana [[SINENSKY, 1974](#); [CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993](#)].

A fluidez de membranas biológicas aumenta com a elevação no teor de ácido graxo insaturado (nos fosfolipídeos) e diminui com a elevação no teor de ácido graxo saturado e de colesterol (**Figura 1.1**). Um aumento exagerado no teor de UFA e/ou uma diminuição excessiva no teor de colesterol da membrana eleva sua fusibilidade, ou seja, sua vulnerabilidade a sofrer fusão, causando lise. Por outro lado, um aumento excessivo no teor de SFA e/ou de colesterol promove rigidificação da membrana, a qual se torna sujeita à lise por friabilidade. Assim, a membrana perde estabilidade e funcionalidade tanto aquém quanto além da fluidez crítica. De fato, uma diminuição ou aumento exagerado no teor de colesterol pode causar disfunções celulares [[CALISKAN et al., 2000](#)].

Fatores ambientais também podem afetar a estabilidade e funcionalidade de membranas. O calor também promove fusão de membrana (**Figura 1.1**). Isso carece de maior significado em organismos homeotérmicos, mas tem grande importância em organismos poiquilotérmicos. É por isso que microorganismos que vivem em regiões mais quentes têm

mais ácidos graxos saturados em seus fosfolipídeos de membrana do que organismos que vivem em regiões mais frias [YATVIN, 1977].

Entre os fatores ambientais é importante destacar a osmolaridade do meio. A estabilidade de complexos biológicos também pode ser aumentada pela produção e acúmulo de pequenos solutos que elevam a osmolaridade do meio, razão pela qual são chamados de osmólitos [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]. Estes solutos estabilizam os complexos biológicos de acordo com um mecanismo chamado de solvofóbico [TIMASHEFF, 1998] ou osmofóbico [BOLEN e BASKAKOV, 2001; BOLEN, 2004].

Outro fator ambiental danoso para as membranas biológicas são as chamadas espécies reativas do oxigênio (ROS), que podem promover a lipoperoxidação na membrana. A mitocôndria pode usar parte do oxigênio (O₂) que recebe para produzir ‘superóxido’, o qual pode ser convertido pela catalase em ‘peróxido de hidrogênio’, que por sua vez é precursor do ‘radical hidroxila’ [HENSLEY *et al.*, 2000]. As ROS podem ser combatidas pela ação de antioxidantes e mecanismos de reparo celular, salvo quando produzidos em excesso, situação em que eles geram um estado de desequilíbrio chamado estresse oxidativo. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de membrana são estruturas muito vulneráveis a ação dessas espécies radicalares que provocam danos à membrana ao seqüestrarem elétrons dos PUFAS, segundo um mecanismo chamado lipoperoxidação [BEGUM e TERAQ, 2002].

Estrutura e composição da membrana do eritrócito

O eritrócito é a unidade morfológica da série vermelha e mede aproximadamente 8 µm de diâmetro. Ele tem forma discóide bicôncava e uma consistência flexível, o que facilita o transporte de gases e lhe proporciona a deformabilidade necessária para passar por pequenos capilares e poros estreitos do sistema reticuloendotelial, especialmente no baço [SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007]. Nos rins, o eritrócito pode se expandir ou encolher rapidamente em decorrência de alterações bruscas na osmolaridade extracelular [NELSON e COX, 2008]. A deformabilidade do eritrócito está relacionada com a fluidez de sua membrana e com a flexibilidade e resistência conferida por proteínas da bicamada (banda 3 e glicoforina) e da região interna da membrana (espectrina, anquirina e proteína 4.1) que formam o citoesqueleto. A **Tabela 1.1** apresenta uma relação dessas proteínas de membrana

do eritrócito. As proteínas representam cerca de 50% da massa total da membrana de eritrócitos [COOPER, 1997].

A banda 3 é a proteína de maior expressão na membrana dos eritrócitos, representado cerca de 25% das proteínas de membrana. Isso certamente se deve ao fato dela ser uma proteína integral de multipassagem pela bicamada envolvida no transporte de ânions (Cl^- e HCO_3^-). Ela permite a entrada, situação que ocorre nos pulmões, e também a saída de O_2 , situação que ocorre nos tecidos extrapulmonares. Ela também troca Cl^- por HCO_3^- nos tecidos extrapulmonares e HCO_3^- por Cl^- nos pulmões, processos necessários para promover o equilíbrio ácido-básico e o transporte de CO_2 [MURADOR e DEFFUNE, 2007]. No lado citoplasmático da membrana, a banda 3 se liga às proteínas periféricas anquirina, que por sua vez se liga à espectrina, e banda 4.2, que auxilia na estabilização do citoesqueleto. A banda 4.1 ancora o esqueleto da espectrina na membrana e liga a glicoforina (glicoproteína de passagem única) à actina [SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007].

É a espectrina dá a forma bicôncava ao eritrócito. Sob estresse mecânico, a espectrina muda sua conformação e altera a forma, mas não a área superficial do eritrócito [SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007].

Na esferocitose hereditária, os eritrócitos são esferoidais, frágeis e inflexíveis, o que pode ocorrer por diferentes causas, como defeitos na espectrina, na ligação da espectrina à banda 4.1 [CHASIS e MOHANDAS, 1986], na banda 3 ou na banda 4.1 [VOET, VOET e PRATT, 2002]. Esses eritrócitos são mais suscetíveis a mudanças osmóticas [AKKER *et al.*, 2010].

O eritrócito maduro é desprovido de núcleo e organelas, sendo incapaz de sintetizar proteínas. Aproximadamente 98% das proteínas encontradas no seu citoplasma são moléculas de hemoglobina.

O eritrócito normal vive em média 120 dias. À medida que ele envelhece, há diminuição na atividade de suas enzimas da glicólise e aumento em sua densidade, fragilidade osmótica e aglutinabilidade. Há desestruturação de proteínas de membrana, especialmente com agregações da banda 3 e da banda 4.1, o que parece ser um sinal para que os macrófagos reconheçam os eritrócitos envelhecidos e promovam sua fagocitose, o que ocorre nos sistema reticuloendotelial do baço, embora uma pequena parte dos eritrócitos sofra lise na própria circulação [SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007].

Embora os eritrócitos presentes no sangue sejam constantemente renovados, parece que o envelhecimento do indivíduo está associado a mudanças homeostáticas que interferem no comportamento de suas células sanguíneas. Diminuição na meia-vida, aumento na

densidade e redução na concentração de grupos tióis livres e na atividade de glutathione-redutase foram observados em eritrócitos de ratos velhos em relação a ratos jovens [ABRAHAM,TAYLOR e LANG, 1978]. Outras alterações reportadas incluem diminuição na flexibilidade de membrana do eritrócito em função do aumento do teor de colesterol e da taxa de lipoperoxidação [MILLÁN *et al.*, 2004], além de aumento na estabilidade de membrana de eritrócitos em mulheres acima de 60 anos de idade em comparação com mulheres de 20 a 49 anos de idade [PENHA-SILVA *et al.*, 2007].

Estabilidade de membrana de eritrócitos

Os eritrócitos constituem um modelo prático para estudo da estabilidade de membranas biológicas, uma que vez que sua lise libera hemoglobina, que pode ser quantificada por espectrofotometria visível [NELSON e COX, 2008].

A estabilidade de eritrócitos pode ser afetada por muitos fatores, tais como composição da membrana, volume, tamanho e forma, tipo e quantidade de hemoglobina, viscoelasticidade e composição química e estrutural das membranas [PERK, FREI e HERZ, 1964]. Além disso, também afetam a estabilidade de eritrócitos variações fisiológicas (variações pós-prandiais) ou patológicas (hemoglobinopatias, presença de hematozoários, uremia, cirrose, processos autoimunes, hepatopatias, insuficiência renal) [JAIN, 1973; STASIW *et al.*, 1977] e outros fatores, como pequenas alterações no pH, temperatura, idade, quantidade de O₂ e de CO₂ [SUESS *et al.*, 1948] e vários tipos de drogas [SEEMAN, 1966; AKI e YAMAMOTO, 1991; DE FREITAS *et al.*, 2010].

A composição da membrana do eritrócito é um fator intrínseco importante na determinação da estabilidade de sua membrana. O eritrócito é muito sensível a elevações na colesterolemia [COOPER *et al.*, 1975; SCHICK e SCHICK, 1985]. O excesso de colesterol da LDL vai para a membrana celular [MARTINEZ *et al.*, 1996], diminuindo a fluidez e a deformabilidade do eritrócito [COOPER, 1977; MULLER *et al.*, 1990; DWIGHT, MENDES-RIBEIRO e HENDRY, 1996]. Essa rigidificação da membrana altera suas propriedades e as características reológicas do sangue, com aumento na viscosidade e diminuição do aporte de oxigênio aos tecidos [CHABANEL *et al.*, 1983; KOTER *et al.*, 2002]. Se a elevação da colesterolemia aumenta o teor de colesterol na membrana do eritrócito e afeta suas propriedades, uma diminuição da colesterolemia deveria ter efeitos contrários. De fato, o tratamento com estatinas causou redução no teor de colesterol na

membrana de eritrócitos [LIJNEN *et al.*, 1994; MARTINEZ *et al.*, 1996], o que seria responsável pela diminuição da viscosidade sanguínea e melhora na microcirculação [MARTINEZ *et al.*, 1996]. Essas alterações na composição, fluidez e estabilidade de membrana de eritrócito em função do uso de drogas hipocolesterolemiantes não é um processo rápido e deve ocorrer após quatro [RABINI *et al.*, 1993] a seis meses do decorrer da terapia [DE FREITAS *et al.*, 2010].

A estabilidade de eritrócitos pode ser avaliada contra choque hipotônico (fragilidade osmótica eritrocitária ou FOE) [JAIN, 1986; CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2008; DE FREITAS *et al.*, 2010] ou concentração de solutos estabilizantes (como o glicerol) e caotrópicos (como o etanol) [GOUVÊA-E-SILVA, 2006; PENHA-SILVA *et al.*, 2008; DE FREITAS *et al.*, 2010].

A FOE pode ser avaliada pelo uso de soluções tamponadas de NaCl com concentrações entre 0.9 e 0% [JAIN, 1986]. Em meio hipotônico, os eritrócitos aumentam até alcançar um volume crítico antes de serem lisados. Há diferenças na FOE entre espécies [JAIN, 1986] e entre indivíduos de diferentes idades de uma mesma espécie [PENHA-SILVA *et al.*, 2007]. A FOE é muito usada no diagnóstico de doenças [SUESS *et al.*, 1948], mas também no estudo e caracterização de substâncias hemolíticas [DE FREITAS *et al.*, 2008].

Os efeitos do etanol sobre as propriedades de membrana de eritrócitos são muitos e muitas vezes antagônicos dependendo de sua concentração. O etanol aumenta a fluidez de membrana dos eritrócitos [SUN e SUN, 1985; BENEDETTI *et al.*, 1986; BENAÏM *et al.*, 1994], o que pode ter implicações benéficas associadas a melhora no comportamento reológico do sangue.

Embora os eritrócitos não metabolizem o etanol, pois não têm a enzima álcool desidrogenase [ZORZANO, RUI DEL ARBOR e HERRERA, 1989], suas membranas sofrem a ação oxidante de metabólitos desse álcool formados em outros locais do organismo. Esse seria um dos mecanismos pelo qual o alcoolismo crônico causa aumento na taxa de hemólise e anemia crônica [WISLOFF e BOMAN, 1979; COLMAN e HERBERT, 1980]. O etanol, assim como outros anfifílicos, insere-se na bicamada até uma concentração limite e pode induzir a lise por esse motivo [ROTH e SEEMAN, 1972].

O etanol é também um agente caotrópico, capaz de desnaturar complexos biológicos, como proteínas, ácidos nucleicos e membranas. Junto com essas propriedades caotrópicas, ele também aumenta a osmolaridade do meio, o que significa que ele congrega propriedades desestabilizantes e estabilizantes [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

Em soluções de alta osmolaridade, os eritrócitos podem sofrer alterações na forma e volume [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996; LANG *et al.*, 1998]. Essas alterações foram consideradas em um modelo de equilíbrio morfológico, segundo o qual os eritrócitos existiriam em um estado expandido ou relaxado (**R**), nas condições naturais do sangue, e um estado condensado ou tenso (**T**), em situações de alta osmolaridade [AVERSI-FERREIRA, 2004; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006; ARVELOS, 2007; DE FREITAS REIS, 2007; CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

Em soluções salinas fisiológicas com baixas concentrações de etanol, os eritrócitos estão presentes no estado **R**. Com o aumento na concentração de etanol, os eritrócitos do estado **R** sofrem lise. Mas a incubação dos eritrócitos em soluções salinas com concentrações mais elevadas de etanol (em torno de 5 M) causa contração de volume que caracteriza o estado **T** daquelas células, as quais também podem sofrer lise com elevação na concentração de etanol [GOUVÊA-E-SILVA, 2006; ARVELOS, 2007; DE FREITAS REIS, 2007; CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008]. De fato, eritrócitos íntegros estavam presentes em um estado expandido, sob baixas concentrações de etanol, e em um estado contraído, sob altas concentrações de etanol [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996; GOUVÊA-E-SILVA, 2006].

Tal modelo de equilíbrio morfológico de eritrócitos reflete o antagonismo existente nas ações do etanol sobre as membranas plasmáticas. Embora o álcool seja um típico desnaturante em qualquer concentração, ele também aumenta a osmolaridade do meio e promove estabilização de complexos biológicos, ação que prevalece quando ele está em concentrações muito elevadas [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

Considerações finais

O entendimento dos limites entre as ações tipicamente caotrópicas e as ações estabilizantes de agentes caotrópicos sobre a membrana do eritrócito pode ser ampliado com a avaliação dos efeitos de outros caotrópicos, como uréia e hidrocloreto de guanidina, sobre essas células. Esses efeitos podem ser avaliados com utilização desses caotrópicos em diferentes concentrações e com a utilização de combinações de diferentes caotrópicos entre si e com agentes tipicamente estabilizantes de membrana.

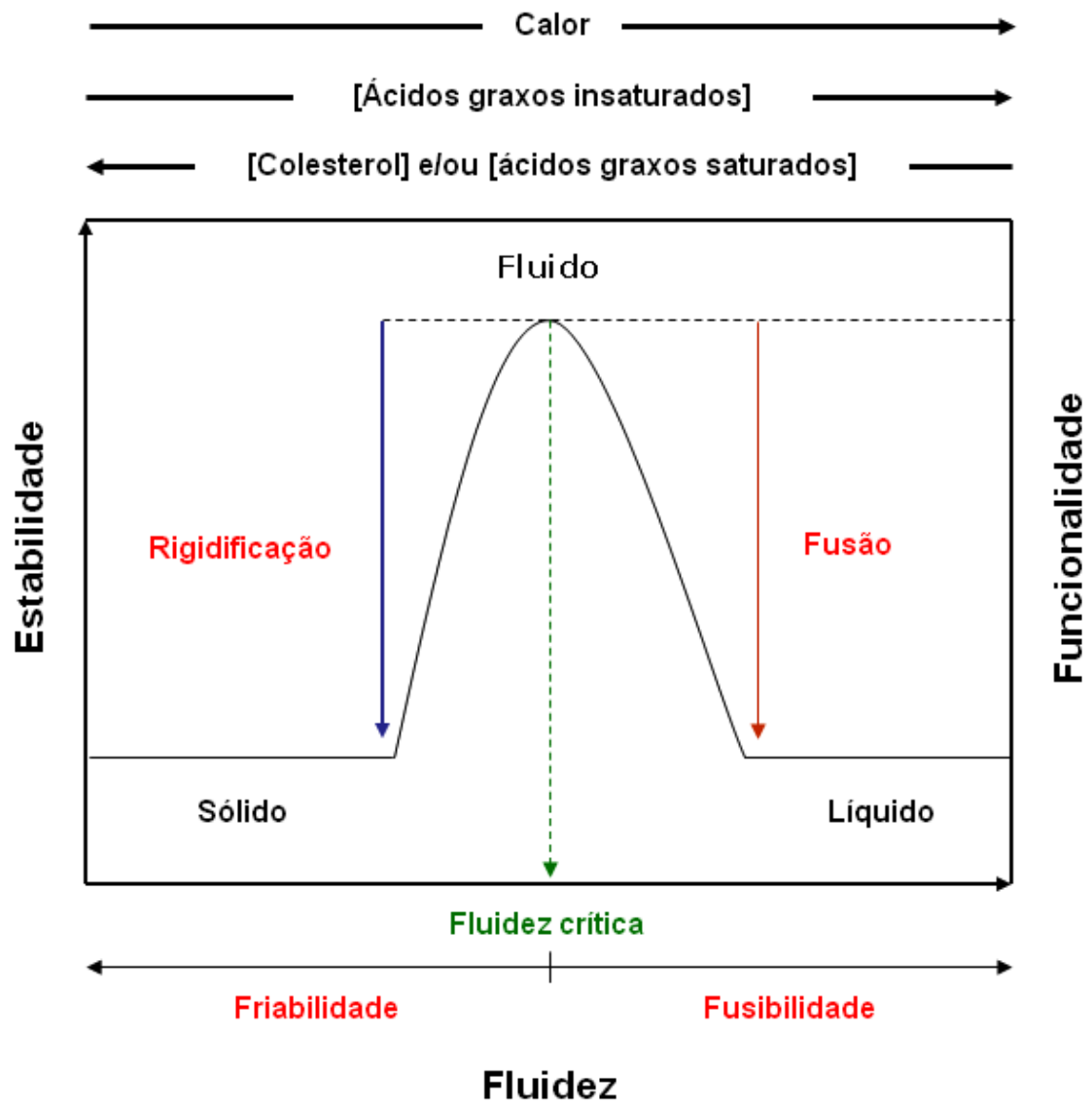


Figura 1.1. Relações entre a **estabilidade** e a **funcionalidade** de uma membrana biológica com sua **fluidez**.

Tabela 1.1. Principais proteínas de membrana e citoesqueleto do eritrócito*.

Proteína	MM (kDa)	Interações	Função
Aducina		Actina e espectrina	
Banda 1 (Espectrina α)	240	Anquirina e banda 4.1	Sustentação da membrana
Banda 2 (Espectrina β)	220	Actina	Sustentação da membrana
Banda 2.1 (Anquirina ou Sideína)	434	Espectrina e banda 3	Controla a função da espectrina e banda 3
Banda 3	102	Anquirina, banda 4.1 e banda 4.2	Regulação do metabolismo Troca de íons (Cl^- por HCO_3^-)
Banda 4.1	90	Espectrina, actina e glicoforina C	Organizadores do sistema de aderência
Banda 4.2	80	Banda 3 Anquirina	Estabilidade Flexibilidade
Banda 4.5			Receptor Transportador de glicose
Banda 4.9 (Dematina)	46	Actina	Reação imune em eritrócitos de anfíbios
Banda 5 (Actina)	33	Espectrina, banda 4.1, aducina e tropomiosina	Forma o complexo juncional que fortalece a ligação da actina à espectrina
Banda 6	36	Banda 3	
Banda 7 (Tropomiosina ou Estomatina)	32		Integra o complexo juncional associado à actina
Glicoforina A	16	Banda 3	Antígenos dos grupos sanguíneos M e N, receptores de lectina dos vírus <i>Influenza</i> e <i>Myxovirus</i> , parasita da malária <i>P. falciparum</i> e do vírus Sendai
Glicoforina B	10		Define os antígenos S e s
Glicoforina C	35		Define os grupos sanguíneos Gerbich

*Fontes: MURADOR e DEFFUNE, 2007; AKKER *et al.*, 2010.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E.C.; TAYLOR, J.F.; LANG, C.A. Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism. **Biochemical Journal**, v. 174, p. 819-825, 1978.

AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, p. 133-138, 1991.

AKKER, E.V.D.; SATCHWELL, T.J.; WILLIAMSON, R.C.; TOYE, A.M. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 2010 [Epub ahead of print], doi:10.1016/j.bcmd.2010.02.019.

ARVELOS, C.C.C. **Efeitos do glicerol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos**. Uberlândia, 2007, 40f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

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.

BEGUM, 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.

BENAIM, G.; CERVINO, V.; LOPEZ-ESTRANO, C. WEITZMAN, C. Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1195, p. 141-148, 1994.

BENEDETTI, A.; BIRARELLI, A.M.; BRUNELLI, E.; CURATOLA, G.; FERRETTI, G.; JEZEQUEL, A.M.; ORLANDI, F. Effect of chronic ethanol abuse on the physico-chemical

properties of erythrocyte membranes in man. **Pharmacological Research Communications**, v. 18, p. 1003-1014, 1986.

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).

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.

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.

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.

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.

CHABANEL, A.; FLAMM, M.; SUNG, K.L.; LEE, M.M.; SCHACHTER, S.L.; CHIEN, S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophysical Journal**, v. 44, p. 171-176, 1983.

CHASIS, J. A.; MOHANDAS, N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. **The Journal Cell Biology**, v. 103, p. 343-350, 1986.

COLMAN, N.; HERBERT, V. Hematologic complications of alcoholism: overview. **Seminars in Hematology**, v. 17, p. 164-176, 1980.

COOPER, G.M. The cell surface. In: **The Cell: A molecular approach**. Washington: ASM Press, 1997, p. 467-517.

COOPER, R.A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in pathogenesis of disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 297, p. 371-377, 1977.

COOPER, R.A.; ARNER, E.C.; WILEY, J.S.; SHATTIL, J.S. Modifications of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 55, p. 115-125, 1975.

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 REIS, F.G. **Dependência térmica dos efeitos de glicerol e sorbitol a 1 M sobre a estabilização e desestabilização de eritrócitos humanos por etanol**. Uberlândia, 2007, 74f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

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

DE FREITAS, 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.

DWIGHT, J.F.; MENDES-RIBEIRO A.C.; HENDRY, B.M. Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. **Clinica Chimica Acta**, v. 256, p. 53-63, 1996.

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).

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).

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.

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

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

KOTER, M.; BRONCEL, M.; CHOJNOWSKA-JEZIERSKA, J.; KLIKCYNSKA, K.; FRANIAK, I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. **Pharmacodynamics**, v. 58, p. 501-506, 2002.

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.

LIJNEN, P.; CELIS, H.; FAGARD, R.; STAESSEN, J.; AMERY, A. Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and cationic transport system. **Journal of Hypertension**, v. 12, p. 59-64, 1994.

MARTINEZ, M.; VAYA, A.; MARTI, R.; GIL, L.; LUCH, J.; CARMENA, R.; GIL, L.; LUCH, J.; CARMENA, R., AZNAR, J. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and haemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. **Thrombosis Research**, v. 83, p. 375-388, 1996.

MILLÁN, C.G.; MARINERO, M.L.S.; CASTAÑEDA, A.Z.; LANAO, J.M. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 27-49, 2004.

MULLER, S.; ZIEGLER, O.; DONNER, M.; DROUIN, P.; STOLTZ, J.F. Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. **Atherosclerosis**, v. 83, p. 231-237, 1990.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol. 29, p. 168-178, 2007.

NELSON, D.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2008, 1263 pp.

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

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.

RABINI, R.A.; POLENTA, M.; STAFFOLANI, R.; TOCCHINI, M.; SIGNORI, R.; TESTA, I.; MAZZANTI, L. Effect of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors on the

functional properties of erythrocytes membranes. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 59, p. 51-57, 1993.

ROTH, S.; SEEMAN, P. The membrane concentration of neutral and positive anesthetics (alcohol, chlorpromazine, morphine) fit the Meyer-Overton rule of anesthesia: negative narcotics do not. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 255, p. 207-219, 1972.

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

SCHICK, B.P.; SCHICK, P.K. Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 833, p. 281-290, 1985.

SEEMAN, P. Erythrocyte membrane stabilization by local anesthetics and tranquilizers. **Biochemical Pharmacology**, v. 15, p. 1753-1766, 1966.

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.

SMITH, C.; MARKS, A.D., LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica**. 2ª ed. Porto Alegre: Artemed, 2007, 980 p.

STASIW, D.M.; ROSATO, S.; MAZZA, J.; CERNY, L.C. Quantitative osmotic fragility and disease states: a preliminary study. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 89, p. 409-413, 1977.

SUESS, J.; LIMENTANI, D.; DAMESHEK, W.; DOLLOFF, M. A quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility. **Blood**, v. 3, p. 1290-1303, 1948.

SUN, G.Y.; SUN, A.Y. Ethanol and membrane lipids. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 9, p. 164-180, 1985.

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.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artemed, 2002, 931 p.

WISLOFF, F.; BOMAN, D. Haemolytic anaemia in alcohol abuse. A review of 14 cases. **Acta Medica Scandinavica**, v. 205, p. 237-242, 1979.

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.

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.

ZORZANO, A.; RUIZ DEL ARBOR, L.; HERRERA, E. Effects of liver disorders on ethanol elimination and alcohol and aldehyde dehydrogenase activities in liver and erythrocytes. **Clinical Science**, v. 76, p. 51-57, 1989.

CAPÍTULO II

TRABALHO EXPERIMENTAL

RESUMO

Efeitos de combinações de hidrocloreto de guanidina, etanol, calor e hipotonicidade na estabilidade de membrana de eritrócitos humanos

A estabilidade de membrana do eritrócito pode ser monitorada pela quantidade de lise por agentes caotrópicos como calor, hipotonicidade, hidrocloreto de guanidina e etanol. O presente trabalho estuda os efeitos de combinações desses caotrópicos, dois a dois, na estabilidade de eritrócitos humanos. Foram utilizados eritrócitos de amostras de sangue humano colhidos de 10 voluntárias sadias (26 ± 4 anos de idade). A estabilidade de eritrócitos foi avaliada pelas constantes de meia-transição das curvas de lise por hidrocloreto de guanidina, etanol e estresse hipotônico, obtidas por análises de regressão sigmoidal das dependências da absorvância em 540 nm com a concentração de cada caotrópico, após incubação por tempo fixo de 30 minutos. Os resultados foram comparados entre si por análise de variância, utilizando o teste de Tukey. As combinações de hidrocloreto de guanidina com calor e etanol produziram sempre efeitos caotrópicos sinérgicos sobre a lise de eritrócitos e sobre a desnaturação da hemoglobina. Mas a utilização de 0,1 a 0,6 M de hidrocloreto de guanidina causou proteção de eritrócitos contra o estresse hipotônico. Esse efeito protetor deve ser decorrente da natureza salina do hidrocloreto de guanidina. Proteção contra lise também foi parcialmente observada na presença de 0,9 mas não de 1,0 M de hidrocloreto de guanidina, quando o efeito caotrópico desse agente predominou. Aumentos entre 20 e 50 °C na temperatura também foram associados com proteção discreta, porém significativa, de eritrócitos humanos contra estresse hipotônico.

Palavras-chave: Calor, eritrócitos, estabilidade de membrana, estresse hipotônico, etanol, hidrocloreto de guanidina.

ABSTRACT

Effects of combinations of guanidine hydrochloride, ethanol, heat and hypotonicity on membrane stability of human erythrocytes

The stability of the erythrocyte membrane can be monitored by the amount of lysis by chaotropic agents such as heat, hypotonicity, guanidine hydrochloride and ethanol. This paper studies the effects of combinations of chaotropic, two by two, on the stability of human erythrocytes. We used erythrocytes from blood samples taken from 10 female healthy volunteers (26 ± 4 years old). The stability of erythrocytes was assessed by the half-transition points of curves of lysis produced by guanidine hydrochloride, ethanol and hypotonic stress, obtained by regression analysis of the sigmoidal dependencies of the absorbance at 540 nm with the concentration of each chaotropic agent, after incubation for a fixed time of 30 minutes. The results were compared by analysis of variance using the Tukey test. The combinations of guanidine hydrochloride with ethanol or heat produced synergistic chaotropic effects on the lysis of erythrocytes and on the denaturation of hemoglobin. But using 0.1 to 0.6 M guanidine hydrochloride caused protection of erythrocytes against hypotonic stress. This protective effect should be due to the saline nature of guanidine hydrochloride. Protection against lysis was also partly observed in the presence of 0.9 but not 1.0 M guanidine hydrochloride, where the effect of chaotropic agent predominated. Increases between 20 and 50 °C in temperature have also been associated with slight but significant protection of human erythrocytes against hypotonic stress.

Key words: Heat, erythrocytes, membrane stability, hypotonic stress, ethanol, guanidine hydrochloride.

INTRODUÇÃO

As membranas biológicas são estruturas complexas compostas por lipídeos, proteínas e carboidratos. Elas formam a barreira que separa uma célula da outra, garantindo a individualidade e permeabilidade seletiva de cada célula. A capacidade da membrana de manter sua integridade diante de agentes desnaturantes é designada como estabilidade. O comprometimento da integridade da estrutura da membrana afeta sua estabilidade e evidentemente todos os processos celulares.

Assim, a manutenção da estabilidade de membrana é um requisito essencial para sua funcionalidade biológica. Porém, um aumento excessivo na estabilidade irá prejudicar sua funcionalidade. Desta forma, as membranas devem equilibrar estabilidade e funcionalidade.

A estabilidade de membrana pode ser influenciada por alterações em sua composição. A estabilidade de membrana aumenta com o aumento do teor de esteróis e de ácidos graxos saturados nos fosfolipídios da bicamada lipídica.

A preservação da estabilidade celular também pode usar uma estratégia fundamentada no aumento da osmolaridade do meio, o que envolve a produção e o acúmulo de solutos que, por esta razão, são genericamente chamados de osmólitos [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].

A preservação da estabilidade de membrana pelos osmólitos certamente está associada à estabilização das proteínas de membrana. A estabilização de proteínas pelo aumento da osmolaridade do meio se dá por um mecanismo designado como efeito solvofóbico [TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1998] ou osmofóbico [BOLEN; BASKAKOV, 2001]. Esse efeito osmofóbico também deve se manifestar sobre a bicamada lipídica da membrana. Contudo, a origem dos efeitos de solutos caotrópicos e estabilizantes sobre as membranas biológicas ainda precisa ser mais bem compreendida.

O eritrócito constitui um modelo muito utilizado para estudo da estabilidade de membrana, por ser de fácil obtenção e baixo custo. A membrana do eritrócito é composta por fosfolipídeos, esfingolipídeos, colesterol e várias proteínas [DODGE, MITCHELL E HANAHAN, 1963]. Os lipídios são importantes para manter a flexibilidade e deformabilidade da célula. Já o citoesqueleto da membrana é formado por uma matriz estrutural de proteínas como a espectrina, a actina e a banda 4.1, que se encontra ligada à banda 3 na bicamada através da anquirina, proteína responsável por várias propriedades da membrana do eritrócito [MOHANDAS, CHASIS e SHOHET, 1983]. Outras proteínas de

membrana dos eritrócitos compreendem a glicoforina A, que possui carboidratos negativamente carregados na porção externa, o que previne a aglutinação, e a banda 3, que funciona como transportador de ânions e água. A banda 3 faz ligações importantes com as proteínas periféricas aquirina e espectrina, que servem de sustentação do citoesqueleto com a membrana [MURADOR e DEFFUNE, 2007; AKKER *et al.*, 2010].

O aumento da osmolaridade do meio é uma estratégia empregada para aumentar a estabilidade de eritrócitos e permitir sua criopreservação [PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; LANG *et al.*, 1998; DE LOECKER *et al.*, 1993]. A elevação da osmolaridade altera a forma e o volume dos eritrócitos [PELLERIN-MENDES *et al.*, 1997; LANG *et al.*, 1998; DE LOECKER *et al.*, 1993; BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996]. Essas alterações foram consideradas em um modelo de equilíbrio morfológico, segundo o qual os eritrócitos existiriam em dois estados morfológicos principais, um estado expandido ou relaxado (**R**), presente nas condições naturais do sangue, e um estado condensado ou tenso (**T**), presente em situações de alta osmolaridade [AVERSI-FERREIRA, 2004; BERNADINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; DE FREITAS REIS, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

Alterações neste equilíbrio podem ocorrer mesmo em decorrência da mudança na osmolaridade determinada pela presença de solutos caotrópicos na solução. Em baixas concentrações de etanol e na presença de NaCl a 0,9%, os eritrócitos estão no estado **R**. O aumento da concentração de etanol provoca hemólise desses eritrócitos expandidos. Mas em concentrações muito mais elevadas de etanol (aproximadamente 5 M) e salina fisiológica, eritrócitos **T** íntegros podem ser encontrados [AVERSI-FERREIRA, 2004; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; DE FREITAS REIS, 2007]. De fato, eritrócitos **T** íntegros foram visualizados por microscopia de luz sob as altas concentrações de etanol [GOUVÊA-E-SILVA, 2006]. A existência de eritrócitos íntegros e compactados nessas elevadas concentrações de etanol foi explicada com base na osmolaridade [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

O etanol é um caotrópico, que atenua a força hidrofóbica e favorece a desnaturação de proteínas, adaptando melhor os grupos apolares dos aminoácidos no solvente [NOZAKI e TANFORD, 1971; CASTRONUOVO *et al.*, 1999; WANG, ROBERTSON e BOLEN, 1995].

Muitos estudos foram feitos sobre a ação do etanol nas membranas de eritrócito. *In vitro*, o etanol promove um aumento na fluidez da membrana [WARING *et al.*, 1981; RUBIN e ROTTENBERG 1982; SUN e SUN, 1985; SWANN, 1987; BENAÏM *et al.*, 1994] alterando a estrutura e promovendo um aumento dos poros [ZAVODNICK, PILETSKAIA e

STEPURO, 1994]. A membrana de eritrócitos também é sensível aos metabólitos oxidantes [PARMAHAMSA, REDDY e VARADACHARYULU, 2004; MATURU *et al.*, 2010] e anfifílicos em geral: anestésicos, fenotiazínicos, tranqüilizantes [MALHEIROS, MEIRELLES e DE PAULA, 2000]

Os agentes caotrópicos compreendem também o calor e o hidrocloreto de guanidina, dentre outros [TANFORD, 1968; TANFORD, 1970].

O calor aumenta a entropia vibracional dos grupamentos químicos, o que favorece a ruptura das ligações não covalentes, sejam elas iônicas, de hidrogênio ou de Van der Waals [TANFORD, 1970; FONSECA *et al.*, 2006]. Antagonisticamente, o calor também aumenta a pressão osmótica do meio, o que contribui para contração e aumento da estabilidade de eritrócitos [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

O hidrocloreto de guanidina é frequentemente utilizado como desnaturante de proteínas. A guanidina é uma base forte e em pH fisiológico se protona, formando o cátion guanidínio, um análogo estrutural da cadeia lateral do aminoácido arginina [MASON *et al.*, 2004]. Como o hidrocloreto de guanidina é eletricamente carregado, ele exerce um efeito mais forte do que a uréia sobre a estrutura de proteínas [BENNION e DAGGETT, 2003], mas seu mecanismo de ação caotrópica ainda não está bem definido [RAY *et al.*, 2005].

Em concentrações acima de 1 M, o hidrocloreto de guanidina é utilizado para desnaturar proteínas. Ele aparentemente rompe as ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura nativa das proteínas [TANFORD, 1968; TANFORD, 1970]. Há evidências de que ele também possa diminuir a força hidrofóbica, acomodando melhor as cadeias laterais hidrofóbicas na solução aquosa [FONSECA *et al.*, 2006].

O presente trabalho objetiva investigar os efeitos do hidrocloreto de guanidina e suas relações com os efeitos do etanol, da hipotonicidade e do calor sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

População

As amostras de sangue analisadas foram doadas por 10 voluntárias, com idade média de 26 ± 4 anos, saudáveis, não fumantes, não usuárias de medicamentos ou drogas e, especialmente, não consumidoras de bebidas alcoólicas. O estudo foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Cada voluntária assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Coleta das amostras de sangue

Amostras de 4,5 mL de sangue foram colhidas das voluntárias por punção endovenosa, após jejum noturno de 8 a 14 horas, em tubos evacuados (Vacutainer[®], Becton, Dickinson & Company, Juiz de Fora, MG, Brasil) contendo 50 µL de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 1g/dL, como anticoagulante.

Reagentes e equipamentos

O NaCl e o etanol utilizados (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), tinham um grau de pureza de 99,5%, e o hidrocloreto de guanidina tinha 98% de pureza (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). As quantidades utilizadas de cada um desses reagentes foram devidamente corrigidas com base em seus graus de pureza para preparo das soluções. A hemoglobina humana foi obtida de um concentrado de hemácias por lise em água destilada. As medidas de volume foram realizadas em bureta de vidro refratário e com pipetas automáticas Labsystems, modelo Finnpipette Digital (Thermo Scientific, EUA). As medidas de massa foram feitas em uma balança digital analítica da marca AND, modelo 870. As incubações foram feitas em banho termostático Marconi, modelo MA 184. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro digital (modelo UV-1650, Shimadzu, Kyoto, Japão). As centrifugações foram realizadas em uma centrífuga modelo Hitachi Koki CF15RX II (Hitachinaka, Japão).

Preparo da solução de hemoglobina

Amostras de sangue foram centrifugados a 1600 *xg* por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e, em seguida, foram realizadas três lavagens em solução de NaCl a 0,9 g/dL. Logo após as lavagens, foi feita uma diluição de 1 mL da papa de eritrócitos para 2 mL de

água desionizada para promoção de hemólise. Os restos celulares foram removidos em outra centrifugação nas mesmas condições anteriores.

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

Baterias de pequenos tubos de polietileno (Eppendorff®), em duplicata, contendo 1,5 mL de solução de hidrocloreto de guanidina em concentrações de 0 a 1,7 M em solução salina fisiológica (NaCl a 0,9 g/dL) foram pré-incubadas durante 10 minutos a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C. Após adição de alíquotas de 10 µL de sangue total aos tubos, eles foram fechados, homogeneizados, incubados por 30 minutos em cada temperatura e, em seguida, centrifugados a 1600 x.g durante 10 minutos. A desnaturação dos eritrócitos foi acompanhada pela medida da absorbância em 540 nm (A_{540}) do sobrenadante em função da concentração de hidrocloreto de guanidina, em cada uma das temperaturas consideradas.

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

A estabilidade dos eritrócitos sob a ação desnaturante do etanol foi analisada na presença de diferentes concentrações de hidrocloreto de guanidina. Soluções com 0 a 26% de etanol e 0, 0,1, 0,3, 0,5 ou 0,6 M de hidrocloreto de guanidina em NaCl a 0,9 g/dL foram preparadas para analisar o efeito da concentração de hidrocloreto de guanidina sobre a lise de eritrócitos humanos por etanol a 35 °C. A cada série de tubos de polietileno (Eppendorff®), em duplicata, foram adicionados 1,5 mL da solução teste nas diferentes concentrações de etanol e a uma única concentração de hidrocloreto de guanidina. Após pré-incubação por 10 minutos à temperatura do ensaio, foram feitas adições de 10 µL de sangue a cada um dos tubos, que foram fechados, homogeneizados, incubados por 30 minutos e centrifugados por 10 minutos a 1600 xg. A desnaturação dos eritrócitos foi acompanhada pela medida da absorbância em 540 nm (A_{540}) do sobrenadante em cada concentração de etanol.

Determinação da estabilidade de eritrócitos em solução de hidrocloreto de guanidina contra estresse hipotônico

A uma série de baterias, em duplicata, de tubos de polietileno (Eppendorff®) contendo 1,5 mL de solução de NaCl em concentrações de 0 a 0,9 g/dL e hidrocloreto de guanidina a 0, 0,1, 0,3, 0,6, 0,9 ou 1,0 M, pré-incubadas a 35 °C por 10 minutos, foram adicionadas alíquotas de 10 µL de sangue. Após homogeneização, os tubos eram incubados por 30

minutos e depois centrifugados por 10 minutos a 1600 $\times g$. Durante as incubações os tubos permaneciam fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes eram lidas em 540 nm (A_{540}) contra um tubo controle contendo as respectivas concentrações de hidrocloreto de guanidina.

Determinação da estabilidade de eritrócitos contra choque hipotônico em diferentes temperaturas

Baterias, em duplicata, de tubos de polietileno (Eppendorff®) contendo 1,5 mL de solução de NaCl em concentrações de 0 a 0,9 g/dL, foram pré-incubados a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C por 10 minutos. Após adição de alíquotas de 10 μ L de sangue e homogeneização, os tubos foram incubados por 30 minutos e depois centrifugados por 10 minutos a 1600 $\times g$. Durante a incubação os tubos permaneceram fechados. A lise dos eritrócitos foi acompanhada pela medida da absorvância em 540 nm (A_{540}) do sobrenadante em função da concentração de NaCl, em cada uma das temperaturas.

Determinação da estabilidade de eritrócitos em solução de hidrocloreto de guanidina

Um conjunto de soluções de hidrocloreto de guanidina nas concentrações entre 0,1 a 1,4 M foi preparado para analisar a estabilidade dos eritrócitos na ausência de NaCl.

A uma série de baterias, em duplicata, de tubos de polietileno (Eppendorff®) contendo 1,5 mL de solução de NaCl em concentrações de 0,1 a 1,4 M de hidrocloreto de guanidina, pré-incubadas a 35 °C por 10 minutos, foram adicionadas alíquotas de 10 μ L de sangue. Após homogeneização, os tubos foram incubados por 30 minutos e depois centrifugados por 10 minutos a 1600 $\times g$. Durante as incubações os tubos permaneceram fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes foram lidas em 540 nm (A_{540}) contra um tubo controle contendo apenas água.

Determinação da estabilidade da hemoglobina contra hidrocloreto de guanidina

A estabilidade da hemoglobina contra hidrocloreto de guanidina também foi analisada.

Um conjunto de tubos de polietileno (Eppendorff®) foi preparado em duplicata com 1,5 mL de solução de hidrocloreto de guanidina em concentrações entre 0,1 a 3,2 M. Após uma pré-incubação por 10 minutos, foram adicionados 10 μ L de hemoglobina àquelas soluções. Os tubos foram homogeneizados, incubados a 35 °C por 30 minutos e centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. Os sobrenadantes foram analisados por espectrofotometria visível em 540 nm (A_{540}).

Determinação das curvas de transição de lise dos eritrócitos

A dependência de A_{540} com a concentração de hidrocloreto de guanidina, etanol ou NaCl, em cada condição, foi ajustada por uma linha de regressão sigmoidal, dada pela equação de Boltzmann,

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

em que A_1 e A_2 representam os valores mínimo e máximo de hemólise, X é a concentração do hidrocloreto de guanidina, etanol ou NaCl, X_{50} representa a concentração do hidrocloreto de guanidina, etanol ou NaCl que causa 50% de hemólise e dX é a amplitude da transição sigmoidal entre A_1 e A_2 .

Os valores de X_{50} foram obtidos para cada voluntário e cada situação. O parâmetro X_{50} foi designado como $D_{50GuHCl}$, D_{50Et} ou H_{50} quando a lise era promovida por hidrocloreto de guanidina, etanol ou estresse hipotônico, respectivamente.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o aplicativo OriginPro 8.0 (Microcal Inc., Massachusetts, EUA).

Os valores de X_{50} foram obtidos em cada situação e comparados usando ANOVA, aplicando-se o teste de Tukey. As análises de comparação e regressão dos valores de X_{50} foram consideradas significantes diferentes quando $P < 0,05$.

A dependência dos valores de X_{50} com a ação de um segundo caotrópico foi ajustada por regressão sigmoidal, polinomial cúbica ou linear.

RESULTADOS

Efeito da temperatura na lise da membrana de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina em NaCl a 0,9 g/dL entre 20 e 50 °C

O efeito da temperatura sobre a lise de eritrócitos humanos em solução de NaCl a 0,9 g/dL induzido por GuHCl foi mostrado na **Figura 2.1**. Um aumento progressivo na temperatura de 20 a 50 °C gerou um deslocamento para a esquerda na curva de hemólise por GuHCl. Isso significa que a concentração de hidrocloreto de guanidina necessária para promover 50% de lise ($D_{50GuHCl}$) diminuiu com o aumento na temperatura. Os valores de $D_{50GuHCl}$ obtidos a cada uma das temperaturas foram mostrados na **Tabela 2.1**. De fato, os valores de $D_{50GuHCl}$ obtidos nas diferentes temperaturas foram significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$), exceto aqueles obtidos em 25 °C em relação aos valores obtidos em 20 e 30 °C. Os valores de $D_{50GuHCl}$ apresentaram uma dependência linear inversa significativa com o aumento da temperatura (**Figura 2.2**), embora os dados experimentais tenham se ajustado melhor a uma linha de regressão polinomial cúbica (**Figura 2.3**). De qualquer forma, isso significa que os valores de $D_{50GuHCl}$ declinaram com o aumento da temperatura.

Efeito de concentrações fixas de hidrocloreto de guanidina (entre 0 e 0,6 M) na lise de membrana de eritrócitos por etanol em NaCl a 0,9 g/dL e 35 °C

O aumento na concentração de hidrocloreto de guanidina entre 0 e 0,6 M promoveu deslocamentos progressivos nas curvas de hemólise por etanol para a esquerda (**Figura 2.4**). Os valores de concentração de etanol necessária para promover 50% de hemólise (D_{50Et}), obtidos a partir de cada curva da **Figura 2.4**, foram mostrados na **Tabela 2.2**. Os valores de D_{50Et} obtidos nas diferentes concentrações de GuHCl foram todos significativamente diferentes entre si, sem exceções. Um ajuste linear da dependência desses valores de D_{50Et} com a concentração de GuHCl foi mostrada na **Figura 2.5**. O conjunto desses pontos se ajustou significativamente à reta de regressão mostrada, mas a utilização de um ajuste não-linear (sigmoidal) desses mesmos dados (**Figura 2.6**) mostrou uma correlação mais expressiva.

Efeito de concentrações fixas de hidrocloreto de guanidina entre 0 e 1 M na lise de membrana de eritrócitos por choque hipotônico a 35 °C

A hemólise por hipotonicidade foi avaliada a 35 °C na presença de concentrações fixas de GuHCl entre 0 e 1,0 M (**Figura 2.7**). Uma curva típica de lise por estresse hipotônico na

ausência de GuHCl foi mostrada no topo do painel da **Figura 2.7**. Na presença de 0,1 e 0,3 M de GuHCl, esse caotrópico protegeu completamente os eritrócitos contra lise em gradiente decrescente de concentração de NaCl. Esse efeito poderia ser decorrente do fato do GuHCl ser um sal e ter neutralizado os efeitos da hipotonicidade associada ao gradiente decrescente de NaCl. De fato, na ausência de NaCl, aumento na concentração de GuHCl até cerca de 0,8 M não determinou hemólise, embora uma transição sigmoidal de lise ocorra com aumento adicional na concentração desse caotrópico (**Figura 2.8**). Em 0,6 e 0,9 M de GuHCl, a presença desse caotrópico causou hemólise nas concentrações mais elevadas de NaCl do gradiente salino (**Figura 2.7**). Essa lise deve ter sido decorrente das condições de hipertonicidade determinadas pela soma das concentrações do NaCl com as concentrações do GuHCl. Na presença de 1,0 M de GuHCl ocorreu hemólise total em toda a extensão do gradiente salino, o que pode ter sido decorrente da hipertonicidade promovida pela mistura de GuHCl e NaCl, mas também da própria ação caotrópica do GuHCl, uma vez que a média dos valores de $D_{50GuHCl}$ está em torno de $0,87 \pm 0,04$ M. Os valores de absorvância em 540 nm na presença de 1 M de GuHCl foram mais baixos do que na ausência do caotrópico (**Figura 2.7**), o que sugere que o GuHCl possa estar de fato causando alguma alteração estrutural na hemoglobina, refletida em sua absorção ótica. Realmente, nas curvas de lise de eritrócitos por GuHCl, houve uma diminuição na absorvância em regiões onde a concentração do caotrópico foi mais elevada (**Figura 2.8**). Esse comportamento poderia ser decorrente da ação caotrópica do GuHCl sobre a hemoglobina. Isso demandou uma avaliação criteriosa da influência da concentração de GuHCl sobre a hemoglobina nas condições de incubação por tempo fixo (30 minutos) usadas nos experimentos descritos neste trabalho.

Influência da concentração de hidrocloreto de guanidina sobre a absorvância de hemoglobina humana em 540 nm a 35 °C

Protocolos com incubação por tempo fixo de 30 minutos foram utilizados para avaliar a influência da concentração do GuHCl sobre a absorvância da hemoglobina em 540 nm. Nestes experimentos foram utilizadas amostras de hemoglobina humana obtidas dos mesmos voluntários cujas amostras de sangue foram usadas nos protocolos de hemólise. De fato, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, a hemoglobina sofre desnaturação, como pode ser inferido da curva sigmoidal decrescente obtida para a dependência da A_{540nm} com a concentração de GuHCl (**Figura 2.9**). O ponto de meia transição de desnaturação da hemoglobina por GuHCl ocorreu em torno de $1,49 \pm 0,027$ M do caotrópico.

Influência da concentração de etanol sobre a absorvância em 540 nm de hemoglobina humana

Protocolos com incubação por tempo fixo de 30 minutos também foram utilizados para avaliar a influência da concentração de etanol sobre a absorvância em 540 nm da hemoglobina humana na ausência (**Figura 2.10**) e na presença de 0,6 M de GuHCl (**Figura 2.11**). Nestes experimentos foram utilizadas amostras de hemoglobina humana obtidas dos mesmos voluntários cujas amostras de sangue foram usadas nos protocolos de hemólise. Nas condições experimentais deste trabalho, a hemoglobina sofreu desnaturação, como pode ser inferido da curva sigmoideal decrescente obtida para a dependência da A_{540nm} com a concentração de etanol (**Figura 2.10**). O ponto de meia transição de desnaturação da hemoglobina por etanol ocorreu em torno de $28,76 \pm 0,28\%$ (V/V) desse caotrópico, com uma extensa região de pré-transição, até aproximadamente 20% (V/V) de etanol. Como as transições de hemólise por etanol apresentadas na **Figura 2.4** ocorreram abaixo de 20% (V/V) desse caotrópico, essas curvas certamente não sofreram a influência do etanol sobre a hemoglobina. Mas a combinação de 0,6 M de GuHCl teve pequena influência na região de pré-transição da curva de desnaturação de hemoglobina pelo etanol (**Figura 2.11**). Isso pode significar que os efeitos associados ao aumento na concentração de GuHCl sobre as curvas de hemólise por etanol (**Figura 2.4**) tenham sofrido uma pequena influência dos efeitos da combinação desses caotrópicos sobre as propriedades espectrais da hemoglobina nas condições empregadas neste trabalho.

Efeito da temperatura sobre a lise de eritrócitos por estresse hipotônico

A lise de eritrócitos humanos provocada por estresse hipotônico foi avaliada nas temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C (**Figura 2.12**). As curvas de lise hipotônicas sofreram deslocamentos discretos para a esquerda com o aumento progressivo da temperatura. Isso significa que o calor reduziu a concentração de NaCl necessária para promover 50% de hemólise (H_{50}). Os valores de H_{50} obtidos em cada temperatura foram mostrados na **Tabela 2.3**. Embora, alguns desses decréscimos em H_{50} não tenham apresentado diferenças significantes entre si, os valores de H_{50} apresentaram uma dependência inversa significativa com o aumento da temperatura (**Figura 2.13** e **Figura 2.14**). O ajuste sigmoideal desse decréscimo (**Figura 2.14**) mostrou uma correlação apenas um pouco melhor do que o ajuste linear (**Figura 2.13**). Esse decréscimo não deve ter sido decorrente da ação direta do calor sobre a estrutura e comportamento espectral da hemoglobina, uma vez que os valores da absorvância máxima da sigmóide, A_1 , que

representa a absorvância do estado lisado dos eritrócitos, não sofreram alteração significativa com o aumento da temperatura, como foi mostrado na **Tabela 2.4**. Entretanto, é preciso considerar os efeitos da própria concentração de NaCl sobre a hemoglobina. A **Figura 2.15** mostra que a absorvância em 540 nm da hemoglobina apresentou uma dependência pequena, porém significativa, com o aumento na concentração de NaCl a 35 °C.

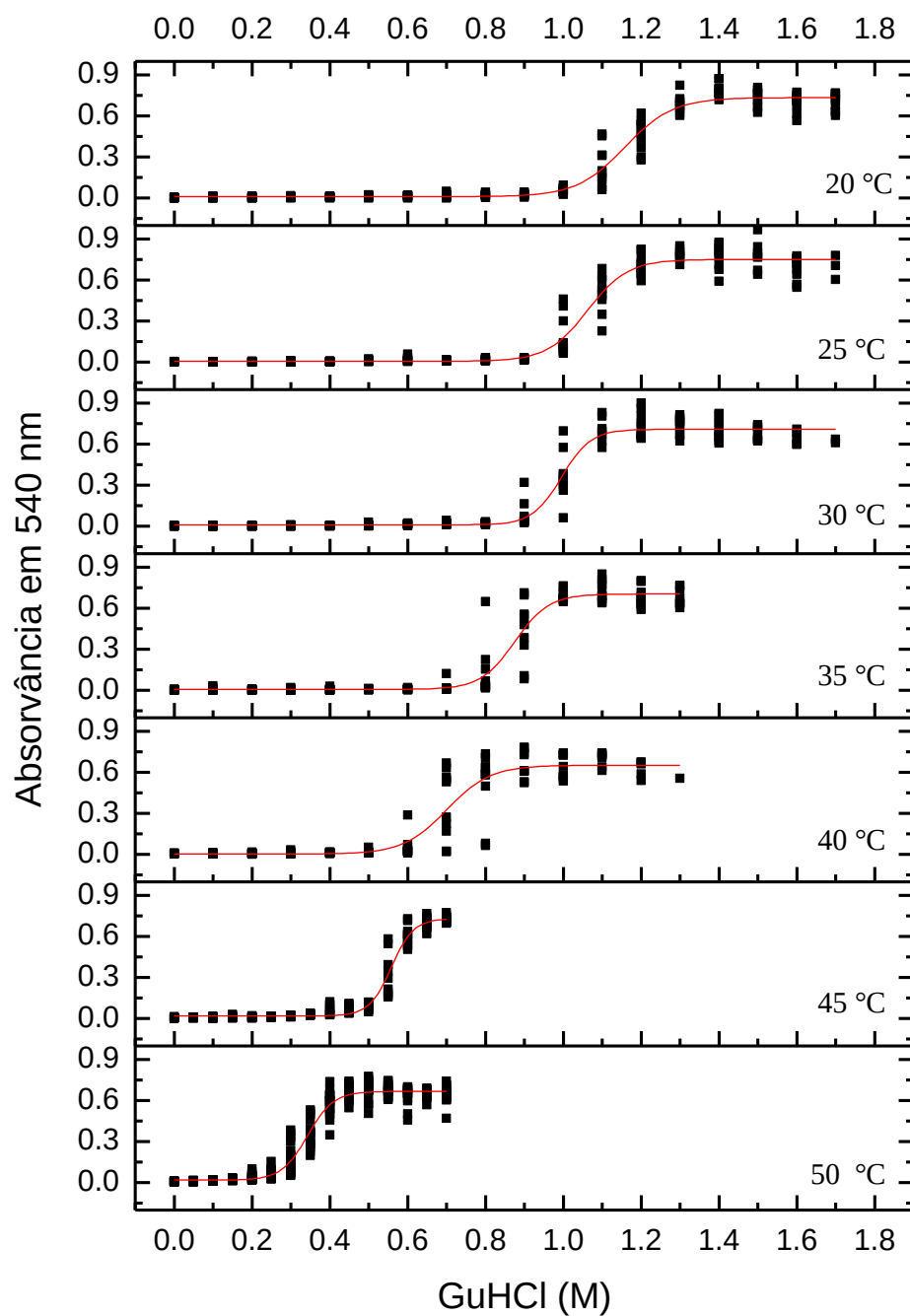


Figura 2.1. Efeito da temperatura sobre as curvas de lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina. Condições: incubação em tempo fixo de 30 minutos em solução de NaCl a 0,9 g/dL.

Tabela 2.1. Efeito da temperatura sobre os valores de **D₅₀** (média ± desvio padrão) para lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina em solução de NaCl a 0,9 g/dL.

Temperatura (°C)	Hidrocloreto de guanidina (M)	P
20	1,15 ± 0,05 (N= 5)	*
25	1,05 ± 0,04 (N= 5)	§
30	0,98 ± 0,04 (N= 5)	*
35	0,87 ± 0,04 (N= 5)	*
40	0,70 ± 0,09 (N= 5)	*
45	0,55 ± 0,01 (N= 5)	*
50	0,33 ± 0,02 (N= 10)	*

*P < 0,05 indicando que houve diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas (teste de Tukey).

§P < 0,05 indicando que houve diferença estatisticamente significativa em relação a todas as temperaturas, exceto entre 20 e 30 °C (teste de Tukey).

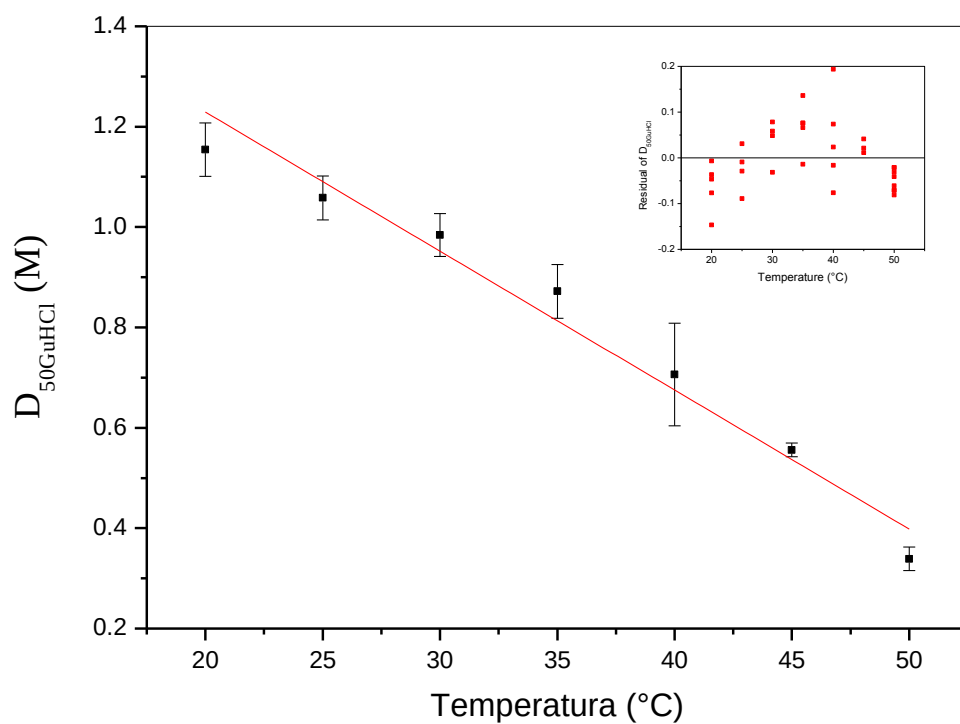


Figura 2.2. Ajuste linear da dependência da meia transição de lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina ($D_{50GuHCl}$) com a temperatura. Condições: incubação em tempo fixo de 30 minutos em NaCl a 0,9 g/dL. Equação: $Y = A + BX$; $A = 1,77 \pm 0,0398$; $B = -0,0275 \pm 0,00105$; $N = 39$; $GL = 37$; $R^2 = 0,9477$.

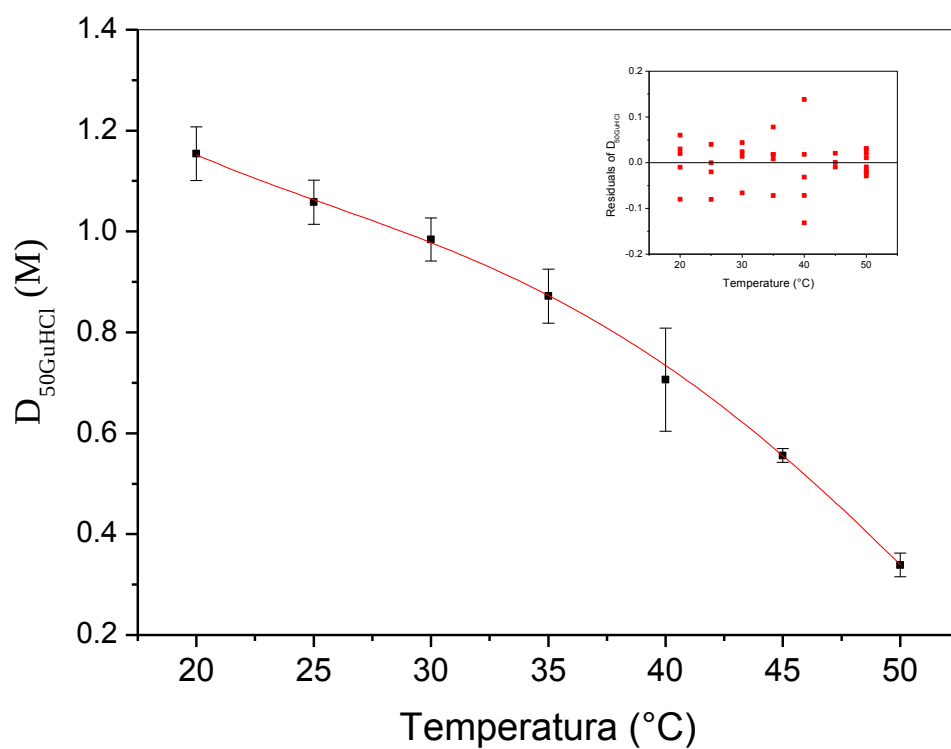


Figura 2.3. Ajuste polinomial cúbico da dependência da meia transição de lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina ($D_{50GuHCl}$) com a temperatura. Condições: incubação em tempo fixo de 30 minutos em NaCl a 0,9 g/dL. Equação: $Y = A + BX + CX^2 + DX^3$; $A = 1,444 \pm 0,453$; $B = -0,0177 \pm 0,0422$; $C = 0,000305 \pm 0,00124$; $D = -0,00000787 \pm 0,0000117$; $N = 39$; $GL = 37$; $R^2 = 0,9723$.

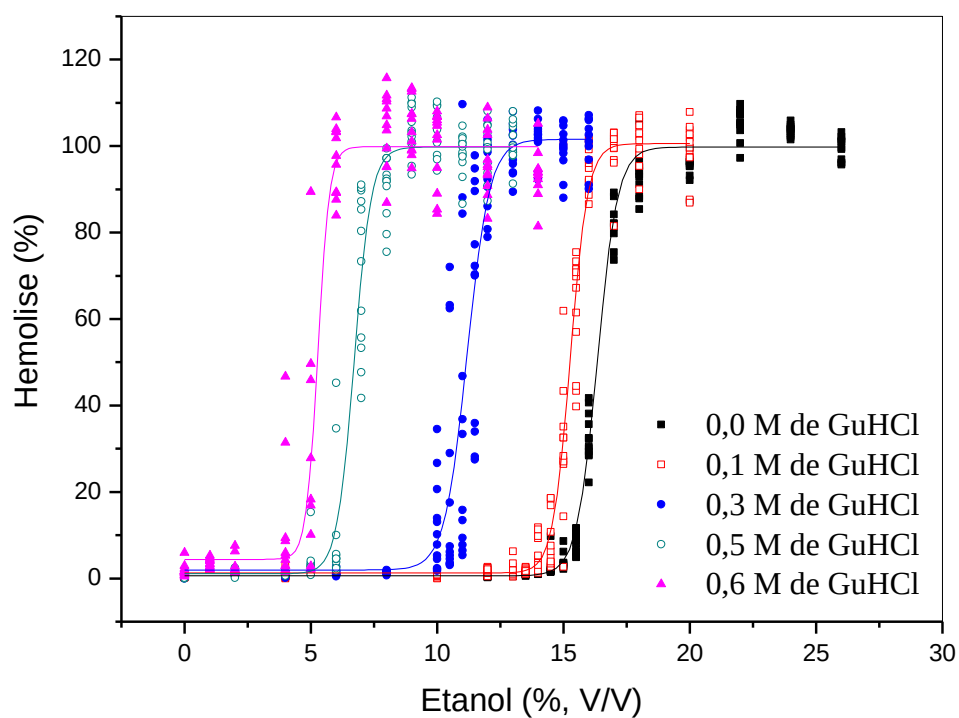


Figura 2.4. Efeito da concentração de hidrocloreto de guanidina sobre a curva de lise de eritrócitos humanos por etanol. Condições: incubação em tempo fixo de 30 minutos, a 35 °C, em 0,9 g/dL NaCl e 0 a 0,6 M GuHCl.

Tabela 2.2. Efeito da concentração de hidrocloreto de guanidina sobre os valores de D_{50} para a lise de eritrócitos humanos por solução de etanol em NaCl 0,9 a g/dL e 35 °C.

Hidrocloreto de guanidina (M)	$D_{50(Et)}$ (média $\pm$ desvio padrão)	<i>P</i>
0	16,36 $\pm$ 0,10 (N= 6)	*
0,1	15,25 $\pm$ 0,17 (N= 6)	*
0,3	11,15 $\pm$ 0,44 (N= 6)	*
0,5	6,73 $\pm$ 0,16 (N= 6)	*
0,6	5,09 $\pm$ 0,45 (N= 6)	*

* $P < 0,05$ indicando diferenças estatisticamente significantes entre os valores de $D_{50(Et)}$ nas diferentes concentrações de hidrocloreto de guanidina (teste de Tukey).

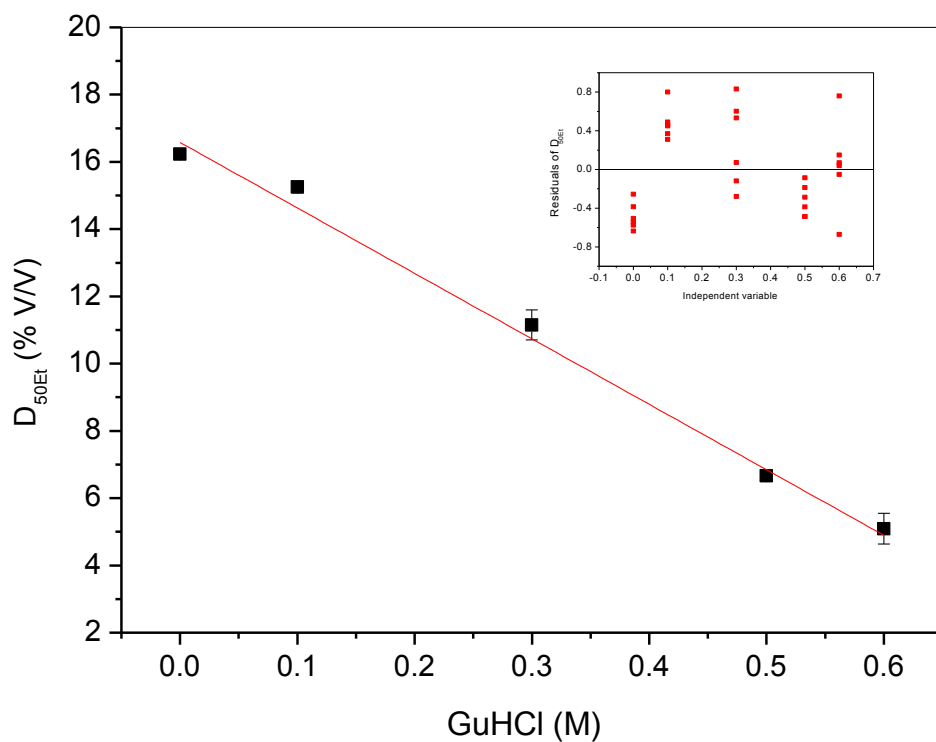


Figura 2.5. Ajuste linear da dependência do ponto de meia transição de lise de eritrócitos humanos por etanol (D_{50Et}) com a concentração de hidrocloreto de guanidina. Condições: incubação em tempo fixo de 30 minutos em NaCl a 0,9 g/dL e 35 °C. Equação: $Y = A + BX$; $A = 16,7155 \pm 0,1428$; $B = -19,4583 \pm 0,3789$; $N = 30$; $GL = 28$; $R^2 = 0,9891$.

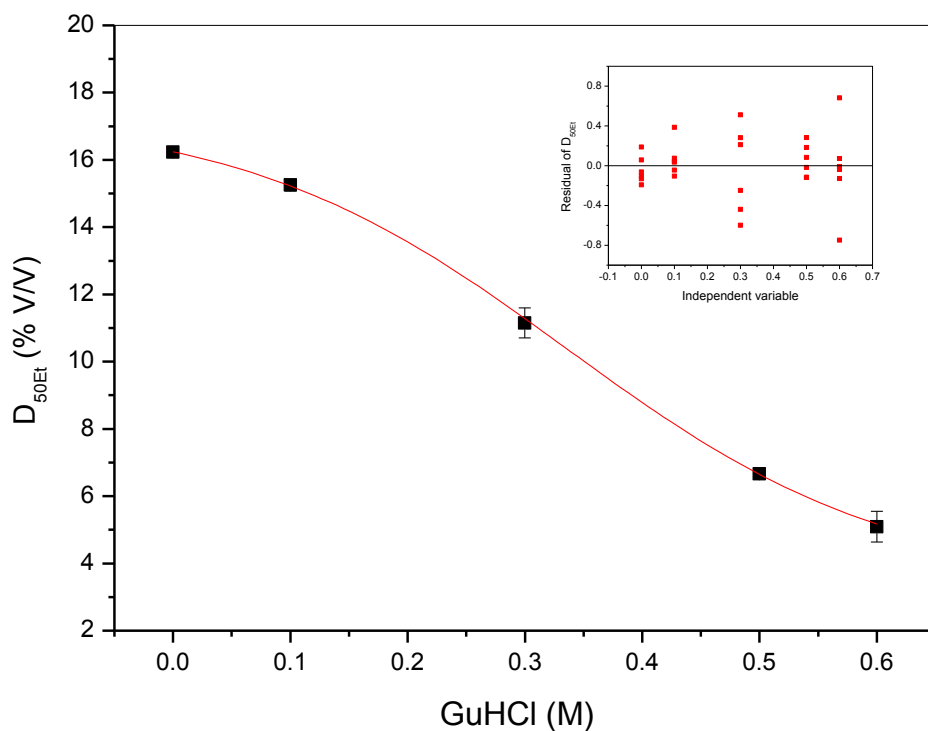


Figura 2.6. Ajuste sigmoidal da dependência do ponto de meia transição de lise de eritrócitos humanos por etanol (D_{50Et}) com a concentração de hidrocloreto de guanidina. Condições: incubação em tempo fixo de 30 minutos em NaCl a 0,9 g/dL e 35 °C. Equação: $Y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 - \exp((X - X_0)/dX))$; $A_1 = 17,59 \pm 0,4800$; $A_2 = 3,130 \pm 0,6901$; $X_0 = 0,3339 \pm 0,0116$; $dX = 0,1450 \pm 0,0178$; $N = 30$; $GL = 26$; $R^2 = 0,9954$.

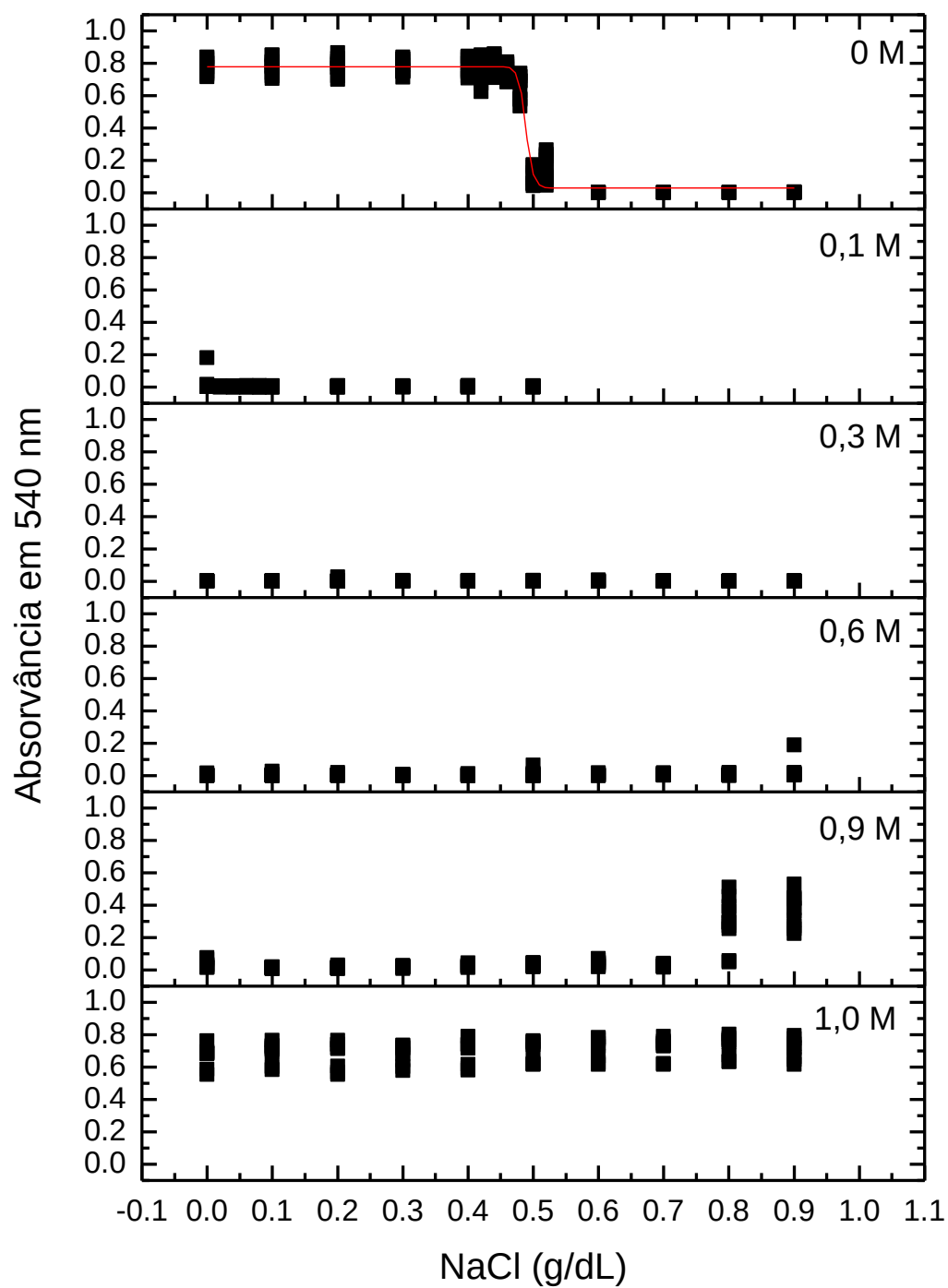


Figura 2.7. Efeito do hidrocloreto de guanidina sobre a lise de eritrócitos por estresse hipotônico. Condições: incubação em tempo fixo de 30 minutos a 35 °C.

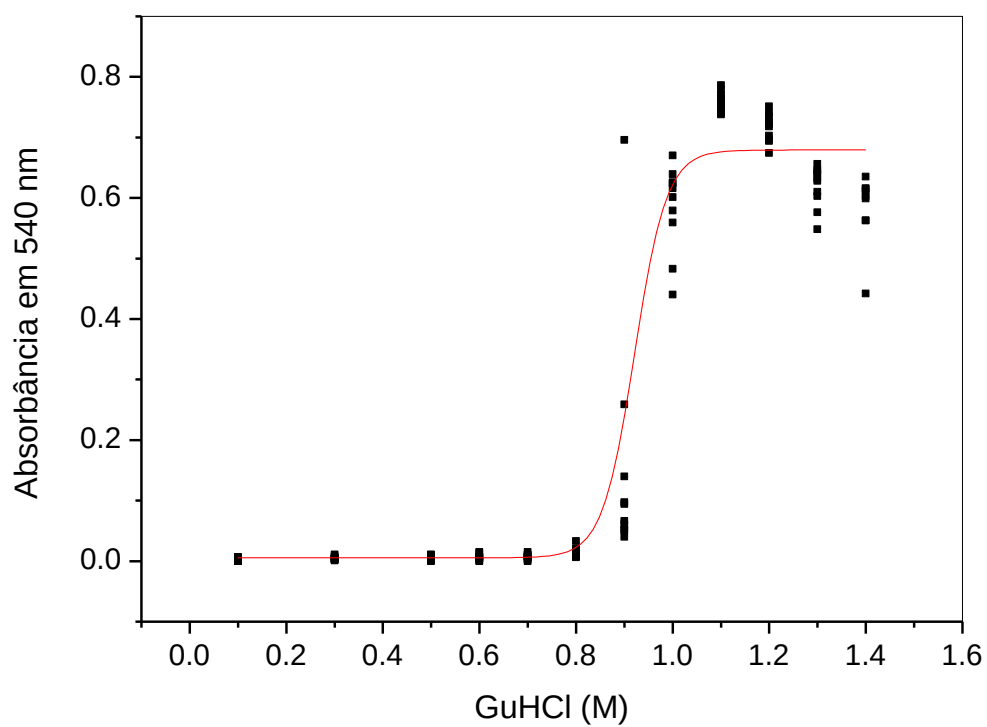


Figura 2.8. Curva de lise de eritrócitos humanos por de hidrocloreto de guanidina. Condições: incubação em tempo fixo de 30 minutos a 35 °C (sem NaCl). Equação: $Y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 - \exp((X - X_0)/dX))$; $A_1 = 0,0056 \pm 0,0159$; $A_2 = 0,6792 \pm 0,02025$; $X_0 = 0,9212 \pm 0,0092$; $dX = 0,0331 \pm 0,0087$; $N = 58$; $GL = 54$; $R^2 = 0,9335$.

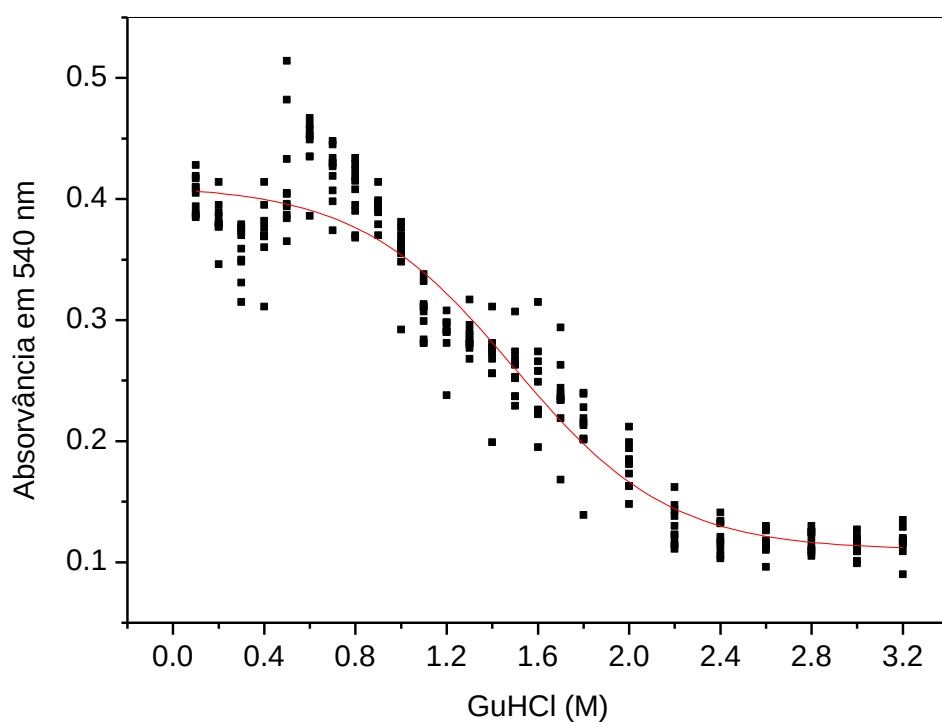


Figura 2.9. Efeito da concentração de hidrocloreto de guanidina sobre a absorvância em 540 nm de hemoglobina humana. Condições: incubação por tempo fixo de 30 minutos a 35 °C. $Y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 - \exp((X - X_0)/dX))$; $A_1 = 0,4116 \pm 0,0061$; $A_2 = 0,1099 \pm 0,0058$; $X_0 = 1,495 \pm 0,0265$; $dX = 0,3430 \pm 0,0278$; $N = 249$; $GL = 245$; $R^2 = 0,9237$.

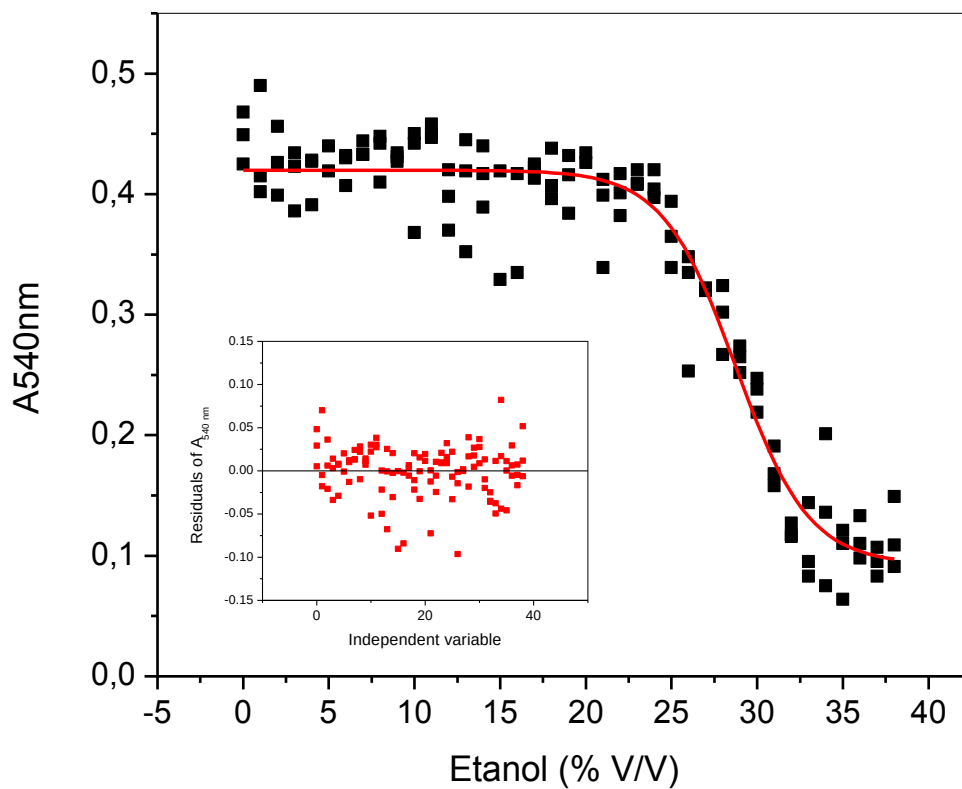


Figura 2.10. Efeito da concentração de etanol sobre a absorvância em 540 nm de hemoglobina humana. Condições: incubação por tempo fixo de 30 minutos a 37 °C. $Y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 - \exp(-(X - X_0)/dX))$; $A_1 = 0,4198 \pm 0,0038$; $A_2 = 0,0930 \pm 0,0108$; $X_0 = 28,76 \pm 0,2805$; $dX = 2,137 \pm 0,2341$; $N = 116$; $GL = 112$; $R^2 = 0,9237$.

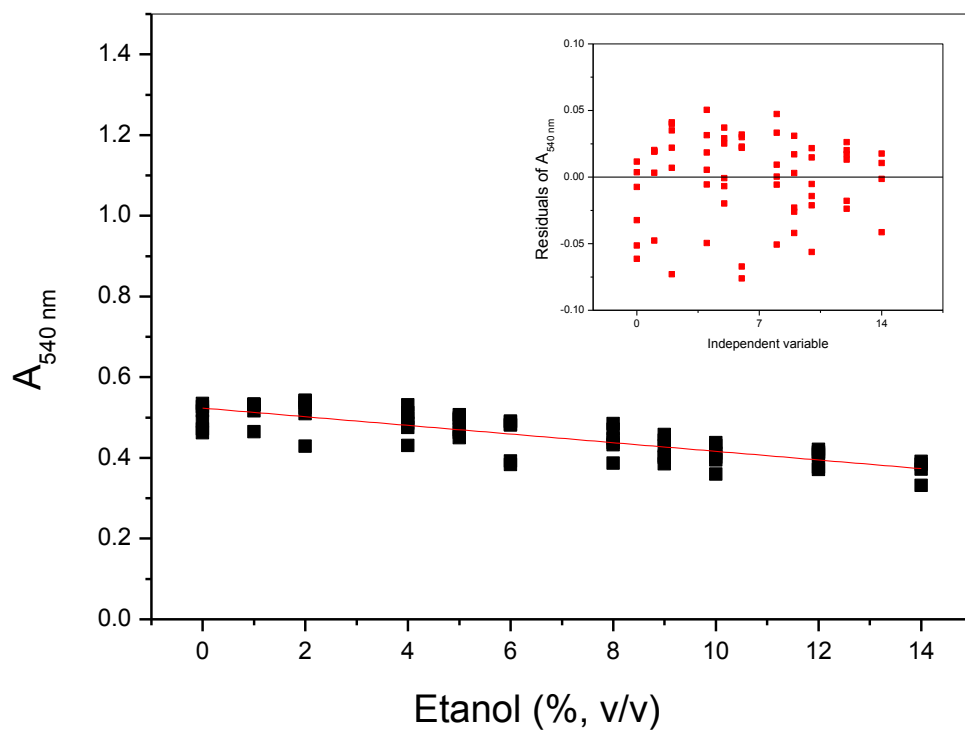


Figura 2.11. Efeito da presença de 0,6 M de GuHCl sobre a absorvância em 540 nm na região de pré-transição de desnaturação da hemoglobina humana por etanol. Condições: incubação por tempo fixo de 30 minutos a 35 °C. Equação: $Y = A + BX$, onde $A = 0,5234 \pm 7,17E-3$; $B = -0,0107 \pm 9,548E-4$; $N = 64$; $GL = 62$; $R^2 = 0,6648$.

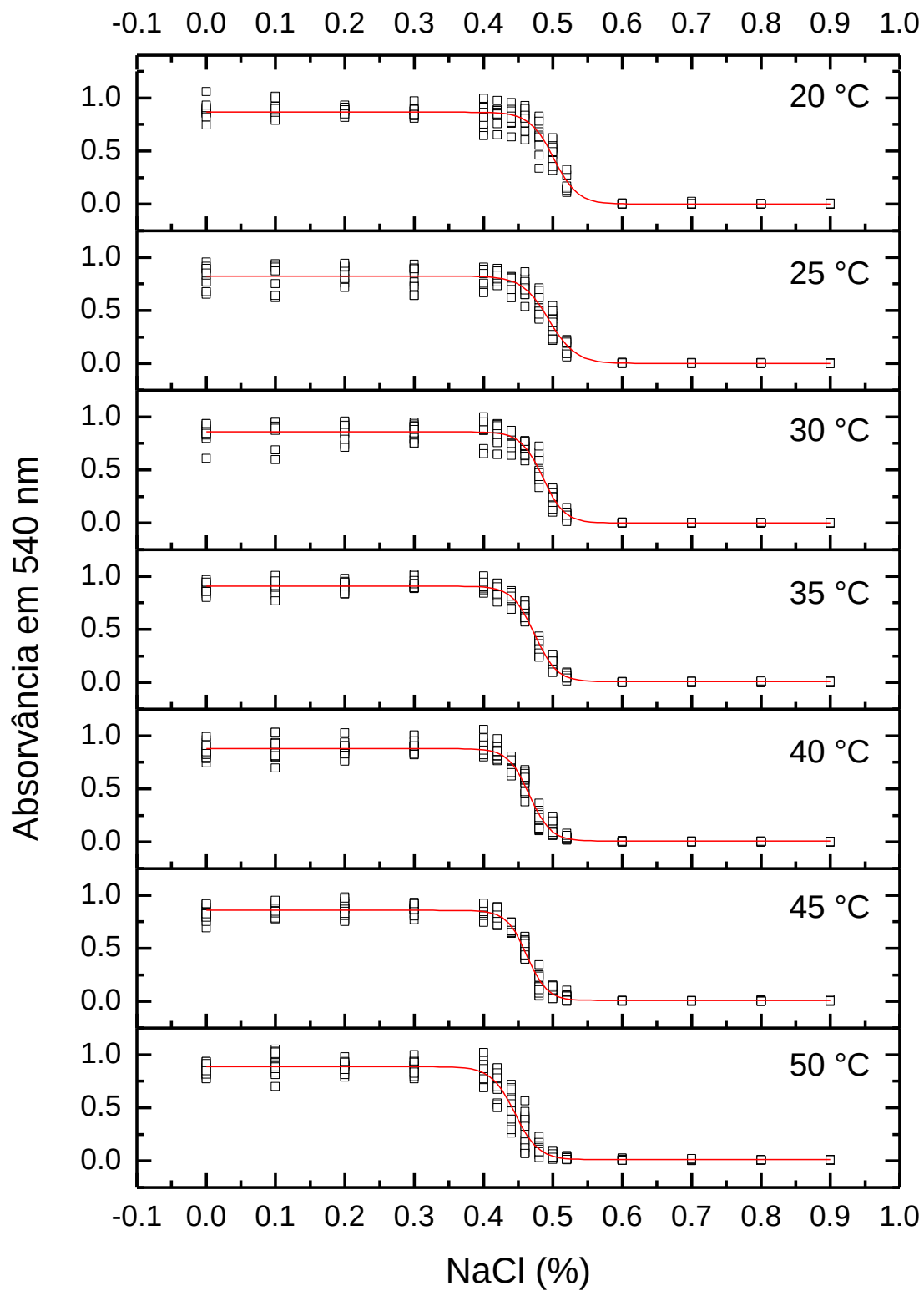


Figura 2.12. Efeito da temperatura sobre a lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico. Condição: incubação por tempo fixo de 30 minutos.

Tabela 2.3. Efeito da temperatura sobre os valores de H_{50} (média $\pm$ desvio padrão) para lise de eritrócitos humanos por estresse hipotônico.

Temperatura (°C)	H_{50} (média $\pm$ desvio padrão)	P*
20	0,49 $\pm$ 0,002 (N= 6)	a
25	0,49 $\pm$ 0,004 (N= 6)	a
30	0,48 $\pm$ 0,001 (N= 7)	
35	0,47 $\pm$ 0,005 (N= 7)	b
40	0,46 $\pm$ 0,006 (N= 8)	b,c
45	0,46 $\pm$ 0,004 (N= 8)	c
50	0,45 $\pm$ 0,005 (N= 8)	

*P < 0,05, indicando diferenças estatisticamente significantes entre as temperaturas, exceto entre os pares de temperatura indicados por uma mesma letra (teste de Tukey).

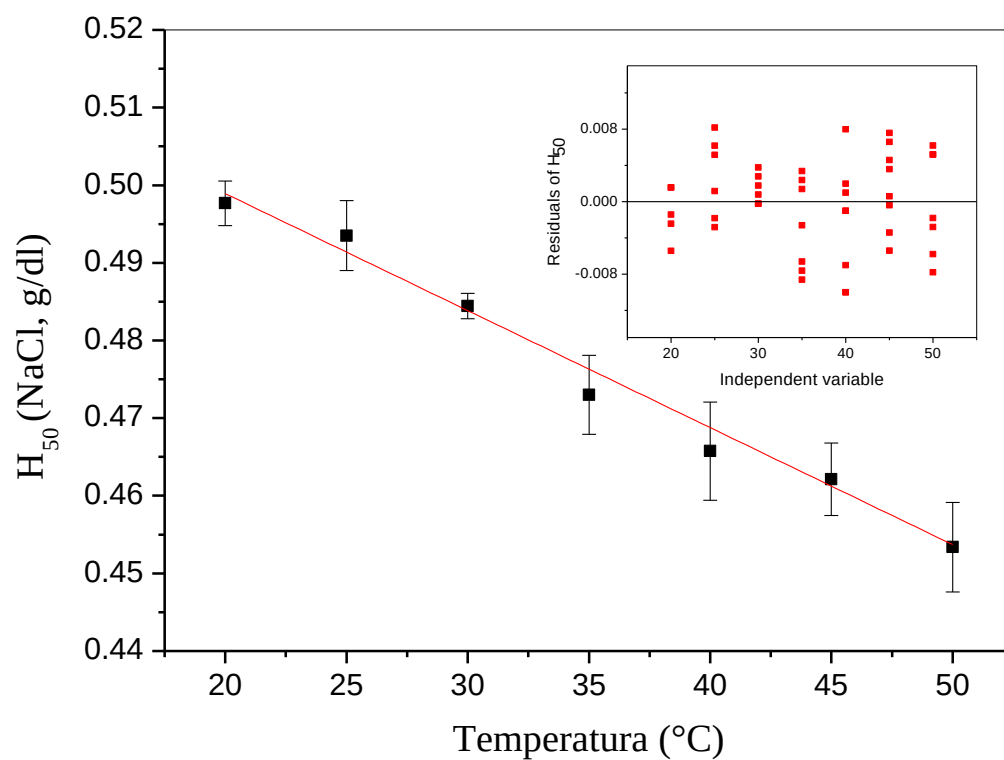


Figura 2.13. Ajuste linear da dependência da meia transição de lise hipotônica (H_{50}) de eritrócitos humanos com a temperatura. Equação: $Y = A + BX$; $A = 0,5289 \pm 0,0026$; $B = -0.0015 \pm 6,873E-5$; $N = 51$; $GL = 49$; $R^2 = 0,9072$.

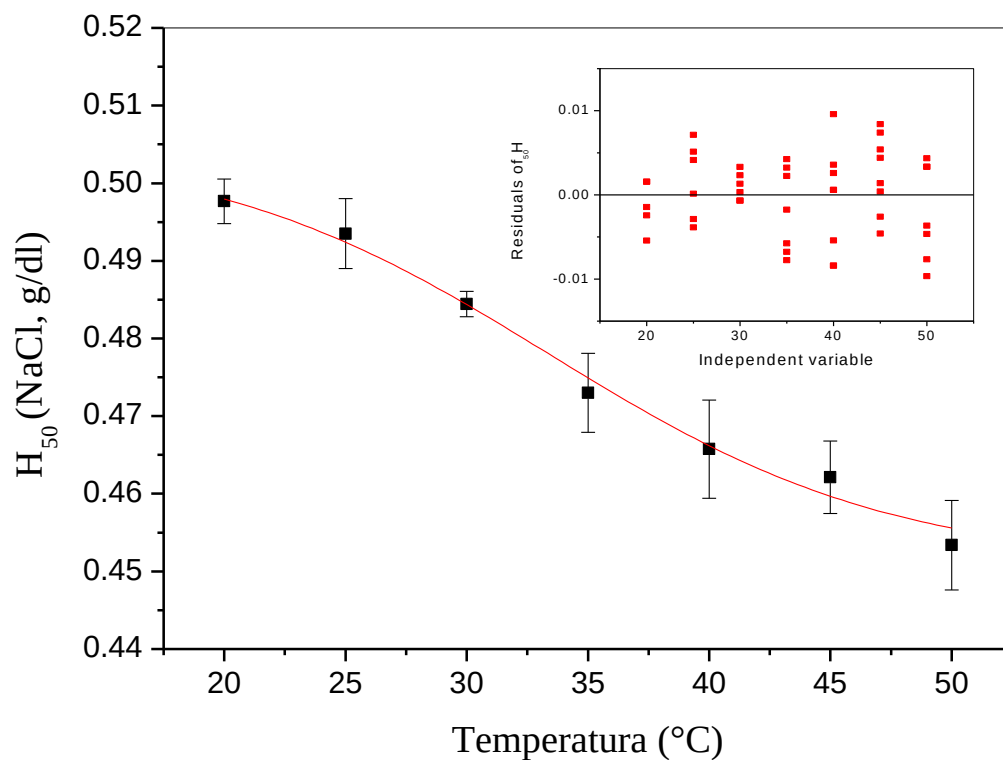


Figura 2.14. Ajuste sigmoidal da dependência da meia transição de lise hipotônica (H_{50}) de eritrócitos humanos com a temperatura. Equação: $Y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 - \exp(-(X - X_0)/dX))$; $A_1 = 0,5111 \pm 0,0136$; $A_2 = 0,4462 \pm 0,0089$; $X_0 = 32,82 \pm 2,672$; $dX = 9,042 \pm 3,935$; $N = 51$; $GL = 47$; $R_2 = 0,9078$.

Tabela 2.4. Valores do parâmetro A_1 (média $\pm$ desvio-padrão) obtido na regressão sigmoidal para a dependência da absorvância em 540 nm com a concentração de NaCl em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	N	A_1	P
20	6	$0,8683 \pm 0,0516$	*
25	6	$0,8246 \pm 0,0700$	*
30	7	$0,8592 \pm 0,0764$	*
35	7	$0,9053 \pm 0,0217$	*
40	8	$0,8773 \pm 0,0554$	*
45	8	$0,8569 \pm 0,0433$	*
50	8	$0,8895 \pm 0,0525$	*

* $P > 0,05$ indicando ausência de diferença estatisticamente significantes entre os valores de A_1 nas temperaturas (teste de Tuckey).

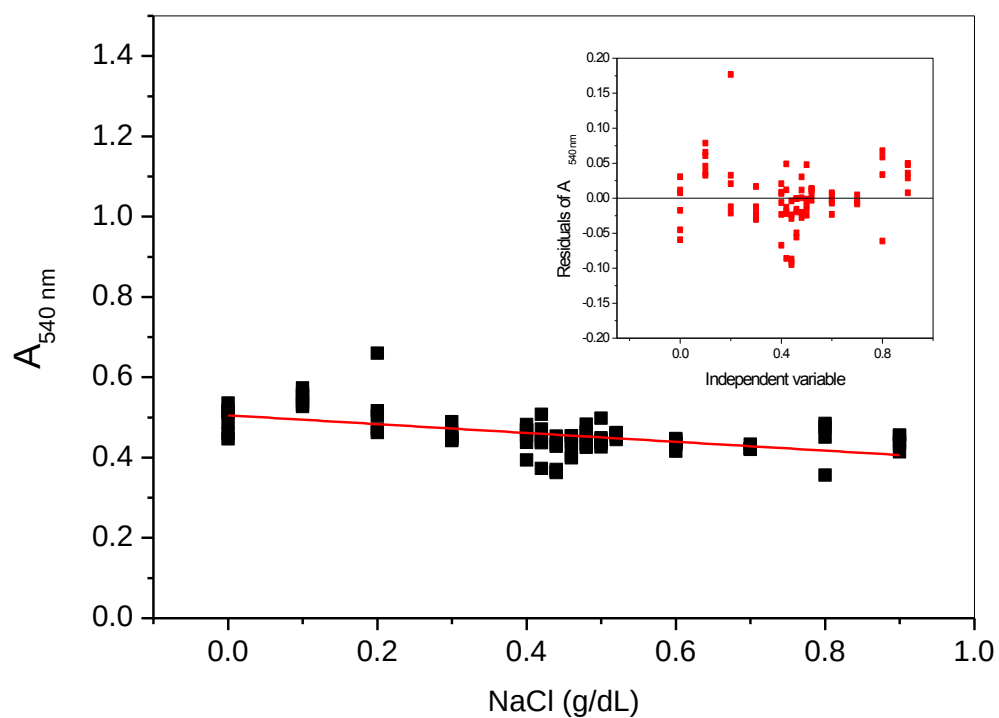


Figura 2.15. Efeito da concentração de NaCl sobre a absorvância em 540 nm de hemoglobina humana. Condições: incubação por tempo fixo de 30 minutos a 35 °C. Equação: $Y = A + BX$, onde $A = 0,5053 \pm 0,0098$; $B = -0,1100 \pm 0,0198$; $N = 83$; $GL = 81$; $R^2 = 0,2669$; $P = 3,45E-7$.

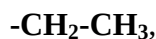
DISCUSSÃO

Essa dissertação apresenta os resultados obtidos a respeito da influência de combinações duplas dos agentes caotrópicos hidrocloreto de guanidina, etanol, calor e hipotonicidade sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos. As combinações de etanol e calor e etanol e choque hipotônico já haviam sido estudadas [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008]. Os possíveis significados dos efeitos das combinações aqui avaliadas, sempre duas a duas, foram discutidos nas seções seguintes.

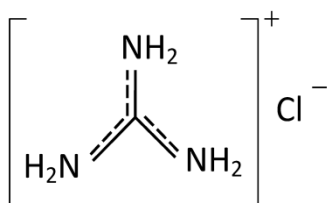
Efeito da combinação do calor com a ação do hidrocloreto de guanidina na lise da membrana de eritrócitos em NaCl a 0,9 g/dL entre 20 e 50 °C

A curva de lise de eritrócitos por hidrocloreto de guanidina apresentou o típico padrão sigmoidal observado para a lise por outros caotrópicos [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008]. Isso significa que a lise ocorre de maneira cooperativa.

A lise por etanol está bastante associada à diminuição das interações hidrofóbicas dos componentes da membrana, promovida pela incorporação desse álcool na água, em função do segmento apolar de sua estrutura,



que estimula a mistura de componentes apolares de um complexo biológico (proteína, ácido nucléico ou membrana) no solvente [TANFORD, 1970; FONSECA *et al.*, 2006]. A lise por hidrocloreto de guanidina também deve estar associada a uma melhor acomodação de grupos apolares no solvente, uma vez que esse caotrópico desenovela proteínas. Essa capacidade está seguramente associada à estrutura trigonal plana do cátion guanidínio,



cuja carga positiva se acha deslocalizada sobre os três grupamentos amino, de tal forma que os momentos dipolares desses grupamentos são vetorialmente cancelados dentro do cátion. Isto confere ao guanidínio certa hidrofobicidade, que permite a acomodação no solvente de grupos apolares do complexo biológico.

O deslocamento para a esquerda promovido pelo calor da curva de lise por GuHCl (**Figura 2.1**) significa que o calor potencializou o efeito caotrópico do hidrocloreto de guanidina. Esse sinergismo de ação entre o calor e o GuHCl não parece ser um processo completamente homogêneo em que ambos os caotrópicos participem equitativamente da hemólise, uma vez que o melhor ajuste para a curva foi de uma polinomial cúbica decrescente (**Figura 2.3**) e não de uma reta (**Figura 2.2**). A polinomial cúbica (**Figura 2.3**) permitiu a ocorrência de uma melhor correlação entre os valores de $D_{50GuHCl}$ e a temperatura em relação à reta (**Figura 2.2**). Isso pode ser visualmente verificado pela análise de resíduos do ajuste cúbico, mostrada como inserção na **Figura 2.3**, em relação ao ajuste linear, mostrada como inserção na **Figura 2.2**. Essa tendência não linear decrescente mostra que a influência do calor foi mais expressiva na faixa mais elevada do intervalo de temperatura estudado.

Certamente, o calor aumentou o grau de agitação de grupos da membrana, diminuindo as forças atrativas entre eles e favorecendo sua migração para o ambiente externo da solução, com liberação de hemoglobina.

Efeito da combinação de hidrocloreto de guanidina na lise de eritrócitos humanos por etanol em NaCl a 0,9 g/dL e 35 °C

O GuHCl potencializou o efeito caotrópico do etanol, uma vez que as curvas de lise por etanol migraram para a esquerda com o aumento na concentração do GuHCl (**Figura 2.4**). Não resta dúvida alguma a respeito da significância dessa migração, uma vez que os valores de D_{50Et} dessas curvas foram todos significantemente diferentes entre si, sem exceções (**Tabela 2.2**).

Este sinergismo de ação caotrópica faz bastante sentido, uma vez que ambos os solutos têm reconhecida ação caotrópica. O fato do D_{50Et} ter-se ajustado melhor à concentração de GuHCl por uma sigmóide (**Figura 2.6**) do que por uma reta (**Figura 2.5**) poderia ser decorrente de heterogeneidade nos mecanismos de ação caotrópica do hidrocloreto de guanidina em relação ao etanol. Essa sigmoidização na curva de D_{50Et} versus GuHCl não foi decorrente do efeito isolado do GuHCl sobre as propriedades espectrais da hemoglobina, uma vez que nesta faixa de concentração esse caotrópico não promoveu alterações significantes nos valores de A_{540} da hemoglobina (**Figura 2.9**). A sigmoidização da curva tão pouco foi devida a uma alteração promovida pela ação isolada do etanol nas características espectrais da hemoglobina, porque até um pouco além de 20% (V/V) de etanol não houve alteração na

absorvância em 540 nm de hemoglobina humana após incubação com esse caotrópico durante 30 minutos (**Figura 2.10**). Entretanto, o sinergismo de ação caotrópica observado entre o GuHCl e o etanol sobre a lise de eritrócitos (**Figura 2.6**) também se manifestou sobre a hemoglobina (**Figura 2.11**). É bem provável que a sigmoidização observada na dependência entre os valores de D_{50Et} e a concentração de GuHCl seja pelo menos em parte consequência das contribuições simultâneas daqueles dois caotrópicos sobre a lise de eritrócitos e sobre a estrutura nativa (desnaturação) da hemoglobina. De fato, a subtração da percentagem de precipitação de hemoglobina inferida a partir da **Figura 2.11** na curva de hemólise por etanol na presença de 0,6 M de GuHCl (**Figura 2.4**) permite o cálculo do ponto de meia-transição de hemólise por etanol corrigido, ou seja, o valor que teria sido obtido se não tivesse ocorrido precipitação de hemoglobina. O valor de D_{50Et} aumenta significativamente ($P < 0,05$) de $5,09 \pm 0,45$ (**Tabela 2.2**) para $5,97 \pm 0,51$ ($N = 6$). Não é difícil ver que a inserção desse valor recalculado de D_{50Et} na **Figura 2.6** descaracterizaria a pretensa natureza sigmoidal da dependência de D_{50Et} com a concentração de GuHCl. Isso deve significar que o GuHCl não tem ação protetora sobre a lise de eritrócitos por etanol e que esses dois caotrópicos agem de modo sinérgico na promoção de hemólise.

Efeito da combinação de hidrocloreto de guanidina na lise de membrana de eritrócitos por choque hipotônico

A ausência de elevação espectral na região de 540 nm determinada pela incubação por tempo fixo (30 minutos) de eritrócitos em condições hipotônicas na presença de concentrações entre 0,1 e 0,6 M de GuHCl (**Figura 2.7**) poderia ser explicada pela ocorrência de lise seguida por precipitação da hemoglobina por este caotrópico. Essa possibilidade deve ser descartada em função do fato de que elevações em $A_{540\text{ nm}}$ associada à hemólise ocorre apenas acima de 0,8 M de GuHCl (**Figura 2.8**). Isso significa que nas condições utilizadas neste experimento não houve lise de eritrócitos em concentrações de GuHCl entre 0,1 e 0,6 M (**Figura 2.7**). Tão pouco esse comportamento espectral poderia ser atribuído à precipitação de hemoglobina, porque entre 0 e 0,8 M de GuHCl não houve alteração espectral significativa na hemoglobina após incubação em tempo fixo com o caotrópico (**Figura 2.9**). A explicação plausível para os efeitos de concentrações entre 0,1 e 0,6 M GuHCl (**Figura 2.7**) é que houve proteção dos eritrócitos contra a lise por hipotonicidade. Entretanto, em 0,9 M de GuHCl houve hemólise apenas nas soluções com maior concentração de NaCl (**Figura 2.7**). Como o

GuHCl também é um sal, esse efeito deve ter sido decorrente de hipertonicidade, embora 0,9 M de GuHCl esteja bem próximo do valor de $D_{50\text{GuHCl}}$ ($0,87 \pm 0,04$ M) a 35 °C, temperatura em foi estudada a influência da concentração desse caotrópico sobre a hemólise por hipotonicidade (**Figura 2.7**).

A ação protetora contra a lise observada para o GuHCl deve coexistir com sua ação caotrópica. Nas concentrações de GuHCl abaixo de 0,9 M houve um predomínio desse efeito protetor. Entretanto, o efeito caotrópico predominou acima daquela concentração de GuHCl. Em 1 M de GuHCl houve hemólise em toda a extensão da faixa de concentração de NaCl estudada (**Figura 2.7**).

Como a absorvância máxima em 540 nm observada na presença de 1 M de GuHCl foi menor do que na ausência desse caotrópico, isso significa que ele deve ter também agido sobre a hemoglobina liberada na hemólise. De fato, o ponto de meia transição de desnaturação da hemoglobina pelo GuHCl foi de 1,4948 M (**Figura 2.9**), de tal forma que a 1 M de concentração daquele caotrópico já há um pequeno declínio em A_{540} devido à desnaturação de uma pequena fração das moléculas de hemoglobina nas condições experimentais aqui empregadas.

Efeito da combinação da temperatura na lise de eritrócitos por estresse hipotônico

O NaCl forma circuitos de moléculas de água, o que evita a entrada de água no eritrócito e sua lise por aumento de volume [JUMA, 1999]. Em meio com baixa concentração de NaCl, as moléculas de água entram facilmente no eritrócito, o qual aumenta de volume até o chamado ‘volume crítico de hemólise’, antes de ser lisado [JAIN, 1973].

Entretanto, a elevação da temperatura de 20 a 50 °C (**Figura 2.12**) promoveu uma discreta, porém significativa, diminuição nos valores de H_{50} (**Tabela 2.3**). Esse deslocamento poderia significar um aumento na estabilidade de eritrócitos contra lise por estresse hipotônico. A constatação de que o aumento da temperatura não provocou alteração significativa no valor de A_1 (**Tabela 2.4**), que é proporcional à concentração de hemoglobina liberada na lise dos eritrócitos, poderia significar que essa diminuição em H_{50} não seria decorrente de alteração no comportamento espectral da hemoglobina em 540 nm. De fato, na região definida por A_1 , onde se tem as mais baixas concentrações salinas, a absorvância em 540 nm da hemoglobina parte de valor máximo, que declina com o aumento na concentração de NaCl (**Figura 2.15**). A subtração das percentagens de decréscimo na absorção da

hemoglobina com o aumento na concentração de NaCl (**Figura 2.15**) dos valores de A_{540} das curvas de lise hipotônica (**Figura 2.12**), permite o cálculo de H_{50} sem a interferência da concentração salina no espectro da hemoglobina. Com este procedimento, o valor de H_{50} a 35 °C tem uma elevação discreta e sem significado estatístico ($P > 0,05$) de $0,4735 \pm 0,0050$ (**Tabela 2.3**) para $0,4753 \pm 0,0052$ g/dL NaCl. A inserção desse valor recalculado de H_{50} na análise da dependência entre H_{50} e a temperatura certamente enfraquece o ajuste sigmoidal (**Figura 2.14**) e fortalece o ajuste linear (**Figura 2.13**), mas não tira a significância da dependência entre aqueles parâmetros. Isso quer dizer que o aumento na temperatura provoca um aumento real na estabilidade de eritrócitos em relação à hipotonicidade.

A origem dessa estabilização com o aumento da temperatura está certamente relacionada com o aumento da pressão osmótica, que tem uma reconhecida ação estabilizadora sobre os eritrócitos [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008]. Apesar de o calor aumentar a intensidade e frequência das vibrações de grupos químicos dos componentes da membrana, o que configura uma ação caotrópica, ele também aumenta a pressão osmótica do meio, o que configura uma ação estabilizadora. Essa estabilização ocorreria por uma compactação de grupos químicos, gerando o que foi chamado de estado T [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008], o que tornaria a entrada de água no eritrócito menos favorecida mesmo com o abaixamento da concentração de NaCl na solução.

CONCLUSÕES

A lise de eritrócitos humanos por hidrocloreto de guanidina, em solução de NaCl a 0,9 g/dL, foi potencializada pelo aumento da temperatura no intervalo térmico de 20 a 50 °C, configurando um sinergismo de ação caotrópica que foi mais intenso no limite superior desse intervalo térmico.

A incorporação de 0 a 0,6 M de hidrocloreto de guanidina potencializou o efeito caotrópico do etanol na lise de eritrócitos humanos a 35 °C. Esse sinergismo de ação também se manifestou sobre a hemoglobina liberada na hemólise.

O hidrocloreto de guanidina protegeu os eritrócitos humanos contra lise hipotônica em concentrações entre 0,1 e 0,6 M, mas promoveu hemólise total quando presente em 1 M.

Aumento de 20 a 50 °C na temperatura do meio foi associado a uma ligeira proteção dos eritrócitos contra lise hipotônica.

REFERÊNCIAS

- AKKER, E. V. D.; SATCHWELL, T. J.; WILLIAMSON, R. C.; TOYE, A. M. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane of mice and men. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. 2010. [Epub ahead of print], doi:10.1016/j.bcmd.2010.02.019.
- 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.
- BENAIM, G.; CERVINO, V.; LOPEZ-ESTRANO, C.; WEITZMAN, C. Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1195, p.141-48, 1994.
- BENNION, B.J., DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, p.5142, 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).
- BOLEN, D.W.; BASKAKOV, I.V. Review: the osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, p. 955-963, 2001.
- BOROWITZA, L.J.; BROWN, A.D. The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 96, p. 37-52, 1974.
- BOWLUS R.D.; SOMERO, G.N. Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 208, p. 137-151, 1979.

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

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 REIS, F.G. **Influência de glicerol e sorbitol sobre a dependência térmica da estabilização e desestabilização in vitro de eritrócitos humanos**. Uberlândia, 2007, 74f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Nilson Penha-Silva (Orientador).

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.

DODGE, J.T.; MITCHELL, C.; HANAHAN, D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. **Archives biochemistry biophysics**, v.100, p.119-130, 1963.

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

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

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

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

JUMAA, M.; MULLER, 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.

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.

MALHEIROS, S.V.P.; MEIRELLES, N.C.; DE PAULA, E. Pathways involved in Trifluoperazine-, Dibucaine- and Praziquantel-induced hemolysis. **Biophysical Chemistry**, v. 83, p. 89-100, 2000.

MASON, P. E.; NEILSON, G. N.; ENDERBY, J. E.; SABOUNGI, M.-L.; DEMPSEY, C. E.; MACKERELL JR., A. D.; BRADY, J. W.. The structure of aqueous guanidinium chloride solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v.126, p. 11462-11470, 2004

MATURU, P.; VADDI, D. R.; PANNURU, P.; NALLANCHAKRAVARTHULA, V. Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na⁺/K⁺-ATPase activity in chronic alcoholics. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 2010 [Epub ahead of print], DOI 10.1007/s11010-009-0367-z.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J.A.; SHOHET, S.B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. **Seminars Hematologic**, v. 20, p. 225-42, 1983.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol. 29, p. 168-178, 2007.

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

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

PARMAHAMSA, M.; REDDY, K. R.; VARADACHARYULU, N. Changes in composition and properties of erythrocyte membrane in chronic alcoholics. **Alcohol & Alcoholism**, v. 39, p. 110–112, 2004.

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.

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

RAY, S.; BHATTACHARYYA, M.; CHAKRABARTI, A. Conformational Study of Spectrin in Presence of Submolar Concentrations of Denaturants. **Journal of Fluorescence**, v. 15, p. 61-70, 2005.

RUBIN, E.; ROTTENBERG, H. Ethanol-induced injury and adaptation in biological membranes. **Fed Proc.**, v.41, p. 2465-2471, 1982

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

SUN, G.Y.; SUN, A.Y. Ethanol and membrane lipids. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 9, p. 164-80. 1985.

SWANN, A.C. Ethanol and membrane lipids. **Reviews in Clinical & Basic Pharmacology**, v. 6, p. 213- 248, 1987.

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

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

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

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

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.

WARING, A.J.; ROTTENBERG, H.; OHNISHI, T.; RUBIN, E. Membranes and phospholipids of liver mitochondria from chronic alcoholic rats are resistant to membrane disordering by alcohol. **The Proceedings of the National Academy of Sciences Online. US**, v. 78, p. 2582-2586, 1981.

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

YANCEY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 21, p. 1214-1222, 1982.

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