

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

ORIGEM DA ESTABILIZAÇÃO DE ERITRÓCITOS POR SORBITOL

Estudante: Morun Bernardino Neto

UBERLÂNDIA, MG

2006

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

ORIGEM DA ESTABILIZAÇÃO DE ERITRÓCITOS POR SORBITOL

Estudante: **Morun Bernardino Neto**

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

UBERLÂNDIA, MG

2006

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

ORIGEM DA ESTABILIZAÇÃO DE ERITRÓCITOS POR SORBITOL

Estudante: **Morun Bernardino Neto**

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

2006

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

ORIGEM DA ESTABILIZAÇÃO DE ERITRÓCITOS POR SORBITOL

Estudante: **Morun Bernardino Neto**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente: Professor Dr. **Nilson Penha-Silva** (Orientador)
Examinadores: Professor Dr. **Adriano César de Moraes Baroni**
Professor Dr. **Eloísio Júlio Ribeiro**

Data de defesa: 21/02/2006

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

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

DEDICATÓRIA

**À minha esposa,
Sandra Martins Santos Bernardino.**

**Aos meus filhos,
Breno Morun Santos Bernardino
e Camila Santos Bernardino.**

**Aos meus pais
Roberto Bernardino
e Maria Aparecida dos Anjos Bernardino.**

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

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Nilson Penha Silva, pelo crédito confiado a mim, pelos ensinamentos que ultrapassaram os limites da ciência e pesquisa e pelo exemplo de competência e humildade, que fazem traço característico de sua personalidade de grande sábio;

Aos colegas de laboratório Letícia Ramos de Arvelos, Cleine Chagas da Cunha e Mário da Silva Garrote Filho, pelo inestimável companheirismo e colaboração em diversas fases do trabalho;

Aos meus filhos Breno Morun Santos Bernardino e Camila Santos Bernardino, que apesar da tão tenra idade souberam conviver com minha ausência nesses últimos anos. Sei que não fui o pai presente que eu gostaria de ser, mas ainda não terminei... há tempo!

Aos meus pais Roberto Bernardino e Maria Aparecida dos Anjos Bernardino sempre me apoiando nas barreiras que tive que transpor. Que tenham a certeza que fazem parte dessa história.

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.....	vii
Osmoestabilização de complexos organizacionais biológicos.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	4
Introdução.....	6
A desestabilização de complexos organizacionais biológicos.....	6
A estabilização de complexos organizacionais biológicos.....	7
Classificação dos osmólitos.....	7
Origem da estabilização de proteínas por osmólitos.....	8
As membranas biológicas.....	9
Estrutura das membranas celulares.....	10
A natureza fluídica das membranas biológicas.....	10
Os eritrócitos como modelo de estudo das membranas.....	11
Comportamento das membranas em ambiente aquoso.....	12
Estabilização de membranas biológicas por osmólitos.....	13
Importância biotecnológica da estabilização de membranas.....	13
Origem da estabilização de membranas por osmólitos.....	14
Considerações finais.....	15
Referências bibliográficas.....	15
Efeito do sorbitol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos contra etanol.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	24
Introdução.....	26
Material e métodos.....	28
Resultados.....	31
Discussão.....	41
Conclusão.....	55
Referências bibliográficas.....	56

ABREVIATURAS

D	Desnaturante
T	Temperatura absoluta, dada em Kelvin
a_1	% de hemólise antes da transição de desnaturação dos eritrócitos
a_2	% de hemólise depois da transição de desnaturação dos eritrócitos
D_{50}	Concentração do desnaturante que produz 50% de hemólise
dD	Amplitude da transição de desnaturação
Π	Pressão osmótica
M	Concentração molar do soluto
R	Constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)
R	Estado expandido dos eritrócitos
T	Estado contraído dos eritrócitos

REVISÃO DA LITERATURA

**OSMOESTABILIZAÇÃO DE COMPLEXOS
ORGANIZACIONAIS BIOLÓGICOS**

RESUMO

OSMOESTABILIZAÇÃO DE COMPLEXOS ORGANIZACIONAIS BIOLÓGICOS

Estudante: Morun Bernardino Neto

Orientador: Nilson Penha-Silva

Na tentativa de garantir a estabilidade dos complexos organizacionais biológicos, a natureza emprega vários mecanismos, como o controle do pH, da temperatura e da concentração de solutos no meio interno. O controle da concentração de solutos contribui para o que podemos chamar de osmoestabilização. Esse trabalho procura aplicar teorias conhecidas para a estabilização de proteínas agora sobre as membranas biológicas. Os solutos osmoestabilizadores, também chamados de osmólitos, aumentam a energia livre do estado nativo (**N**), mas aumentam muito mais a energia livre do estado desenovelado (**D**) de uma proteína, de tal forma que os osmólitos estabilizam o estado **N** de uma proteína pelo aumento da barreira de energia livre entre eles, o que torna menos provável o desenovelamento e a perda de função da proteína. A razão dessa diferença estaria na interação preferencial da água com a proteína. A proteína prefere ligar-se à água do que ao osmólito, que é então excluído da esfera de hidratação mais próxima à superfície da proteína, segundo um efeito que foi denominado de solvofóbico ou de osmofóbico. A maior superfície de contato do estado **D** exige um maior investimento de energia livre para sua hidratação, além de uma maior organização das moléculas de água em torno de sua superfície externa, de tal forma que a entropia conformacional do solvente é menor em torno do estado **D** do que do estado **N**. Isso significa que o osmólito estabiliza o estado nativo em relação ao estado desnaturado de uma proteína. As membranas biológicas têm um aspecto importante de sua estrutura em comum com as proteínas solúveis em água. Elas também escondem seus grupos hidrofóbicos em um interior anidro, constituído por uma bicamada de fosfolipídios, em que as cabeças polares desses lipídios fazem contato com o meio externo e

interno da estrutura biológica circundada pela membrana. Os eritrócitos constituem um modelo muito válido para estudo do comportamento de suas membranas. A utilização de osmólitos aumenta a estabilidade de soluções de eritrócitos e permite inclusive sua criopreservação. Na presença de osmólitos os eritrócitos sofrem alterações morfológicas reversíveis com a diminuição de volume. Assim, os eritrócitos existem numa situação de equilíbrio entre dois estados, um estado expandido (**R**) e um estado condensado (**T**), onde **T** é o estado de maior estabilidade. Neste trabalho nós explicamos tentativamente essa maior estabilidade do estado **T** dos eritrócitos com base na teoria da hidratação preferencial de Timasheff.

DESCRITORES: eritrócitos, estabilidade, mecanismo, membranas, osmólitos.

ABSTRACT

OSMOSTABILIZATION OF BIOLOGIC ORGANIZATION COMPLEXES

Student: Morun Bernardino Neto

Advisor: Nilson Penha-Silva

With the aim of guarantee the stability of the biological organization complexes, nature uses several mechanisms, as the control of pH, temperature and concentration of solutes in the internal medium. The control of the solute concentration contributes to what we can call as osmostabilization. This paper tries to apply the known theories about the stabilization of proteins now on the biological membranes. The osmostabilizing solutes, also called as osmolytes, increase the free energy of the native state (N), but increase much more the free energy of the unfolded state (D) of a protein, in such a way that the osmolytes stabilize the N state of a protein by the increase in free energy barrier between the states, which makes less probable the unfolding and the loss of the protein function. The reason of this difference would be in the preferential interaction of the protein with the water. The protein prefers binds to water than to the osmolyte, which is then excluded from the inner hydration shell of the protein surface, according an effect that was designated as solvophobic or osmophobic effect. The larger contact surface of the **D** state requires a higher investment of free energy for its hydration, beyond a better organization of the water molecules around the external surface, in such a way that the conformational entropy of the solvent is lower around the **D** state than it is around the **N** state. This means that the osmolytes stabilize the native state in relation to the unfolded state of the protein. The biological membranes have an important aspect of their structures in common with water soluble proteins. They also hide their hydrophobic groups in their anhydrous interior, constituted by a phospholipids bilayer, in which the polar heads of these lipids make contact with the aqueous surrounding in the external and internal media of the biological structure encompassed by the membrane. The erythrocytes constitute a very valid model to study the behavior of the membranes.

The utilization of osmolytes increases the stability of erythrocytes preparations and permits even their cryopreservation. In the presence of osmolytes the erythrocytes suffer reversible morphological alterations with volume decrease. Thus, the erythrocytes will exist in an equilibrium process between two states, an expanded (**R**) and a compact one (**T**), where **T** is the more stable state. In this study, we tentatively explained this larger stability of the **T** state of the erythrocytes with basis in the preferential hydration theory of Timasheff.

KEY WORDS: erythrocytes, stability, mechanism, membranes, osmolytes.

Introdução

Os complexos organizacionais biológicos compreendem tecidos, células, organelas, cromossomos, proteínas e membranas. A sua organização e estabilização é uma tarefa importante da natureza, uma vez que todas as funções específicas desses complexos organizacionais dependem de sua integridade estrutural. Esta revisão bibliográfica descreve a ação de agentes desnaturantes e estabilizantes sobre as membranas biológicas. Como toda teoria a respeito do assunto foi gerada a partir da interação de desnaturantes e estabilizantes sobre proteínas, nós abordamos também a ação de desnaturantes e estabilizantes sobre esses importantes complexos biológicos, no intuito de ajudar a dirigir o estudo sobre a estabilização de membranas biológicas, que é o nosso objetivo.

A desestabilização de complexos organizacionais biológicos

Os complexos organizacionais biológicos, como tecidos, células, organelas, cromossomos, proteínas e membranas, são muito vulneráveis à ação de agentes desnaturantes, como temperatura, extremos de acidez e alcalinidade (Cribier, Morrot e Zachowski, 1993), e a uma série de solutos, como a uréia, a guanidina e o etanol. Estes agentes são capazes de destruir a estrutura organizacional daqueles complexos.

Uma elevação na temperatura é capaz de aumentar a energia vibracional de grupos associados naquelas estruturas, enfraquecendo as forças atrativas que estabilizam proteínas, membranas e cromossomos.

Os extremos de acidez e alcalinidade alteram o estado de ionização de grupos ácido-básicos de proteínas, membranas e cromossomos, desfazendo pares iônicos que são elementos importantes de estabilização daquelas estruturas.

A introdução de uréia, guanidina (Bennion e Dagget, 2003; Wang e Bolen, 1997; Taylor et al., 1995; Pace e Shaw, 2000; Schellman, 2002; Breslow e Guo, 1990; Tanford, 1963) ou etanol (Castronuovo et al., 1999) em uma solução aquosa aumenta a afinidade do meio pelo estado desnaturado daqueles

complexos organizacionais. Com certeza, esses solutos enfraquecem a força hidrofóbica, que dirige a formação e participa na manutenção da estabilidade de proteínas, membranas e cromossomos.

A estabilização de complexos organizacionais biológicos

Para manter viáveis proteínas, membranas, cromossomos, células e tecidos, é preciso exercer um controle sobre a ação dos agentes caotrópicos. Baixas temperaturas, controle do pH e da composição química do meio são medidas importantes para manter os complexos organizacionais biológicos estruturalmente íntegros e funcionalmente ativos.

Muitos organismos desenvolveram outros mecanismos diferentes de estabilização de suas estruturas. Um deles é a produção e concentração de solutos que têm sido coletivamente designados de osmólitos. Os osmólitos são capazes de estabilizar estruturas de complexos organizacionais biológicos *in vitro* e assim garantir sua função biológica, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Borowitz e Brown, 1974; Bowlus e Somero, 1979; Pollard e Wyn Jones, 1979; Yancey, 1985; Nikolopoulos e Manetas, 1991).

Classificação dos osmólitos

Os osmólitos são compostos estruturalmente diferentes que podem ser classificados em três grupos: (1) álcoois poliídrolícos; (2) aminoácidos e derivados; e (3) açúcares (Yancey et al., 1982). Os álcoois poliídrolícos incluem o glicerol (1,2,3-propanotriol) e o sorbitol (1,2,3,4,5,6-hexanoexol). Os aminoácidos e derivados incluem a trimetilglicina (ou betaína), a dimetilglicina, a metilglicina (ou sarcosina) e a glicina. Esses aminoácidos, nessa sequência, são produzidos numa rota alternativa de biossíntese de glicina a partir de colina (Murray et al., 1996). Já os açúcares incluem a sacarose e a trealose.

Os osmólitos também são classificados quanto à função, em solutos compatíveis, que apresentam apenas pequenos efeitos sobre a função das

proteínas, e em solutos neutralizantes, que combatem os efeitos prejudiciais que alguns solutos celulares têm sobre a célula (Borowitz e Brown, 1974; Yancey et al., 1982). Os solutos compatíveis incluem aminoácidos, como a glicina, carboidratos, como a sacarose, e poliidroxiálcoois, como o glicerol e o sorbitol. Eles podem estar presentes em grandes concentrações intracelulares, sem alterar as propriedades dos complexos organizacionais das células (Yancey et al., 1985). Os solutos neutralizantes incluem a glicerofosforilcolina e a betaína (Lien, Pacelli e Brawn, 1993; Peterson et al., 1992; Yancey e Burg, 1990), que nas células renais combatem o efeito desnaturante da uréia (Bagnasco et al., 1986; Garcia-Perez e Burg, 1990; Somero, 1986; Yancey et al., 1982).

Origem da estabilização de proteínas por osmólitos

Os osmólitos aumentam a energia livre do estado nativo (N), mas aumentam muito mais a energia livre do estado desenovelado (D) de uma proteína. A explicação mais aceita para este fenômeno termodinâmico é fundamentada na interação preferencial da água com a proteína (Timasheff, 1998). A proteína prefere ligar-se à água do que ao osmólito, que é então preferencialmente excluído da superfície da proteína, segundo um efeito que foi denominado de solvofóbico (Timasheff e Arakawa, 1989) ou de osmofóbico (Bolen e Baskakov, 2001). Este efeito pode ser explicado pela maior afinidade pela água do que pela mistura osmólito-água dos grupos apolares (Gekko e Timasheff, 1981a; Gekko e Timasheff, 1981b) e do esqueleto peptídico (Liu e Bolen, 1995) da proteína. A competição gerada entre o osmólito e a água pela proteína eleva a energia de hidratação tanto do estado N quanto do estado D da proteína. Como os grupos apolares e o esqueleto peptídico são mais expostos ao solvente no estado desnaturado do que no estado nativo, o estado desnaturado é mais desestabilizado do que o estado nativo da proteína. O estado D exige uma maior organização de moléculas de água em torno de sua superfície externa, que é maior, do que o estado N, de tal forma que a entropia conformacional do solvente é maior em torno do estado N do que do estado D. Isso significa que o osmólito estabiliza o estado nativo de uma proteína em relação ao estado

desnaturado (Timasheff e Arakawa, 1989; Gekko e Timasheff, 1981a; Gekko e Timasheff, 1981b; Lee e Timasheff, 1981; Timasheff, 1993; Liu e Bolen, 1995).

É possível que essa estabilização osmofóbica de uma proteína esteja também associada a outros fatores, como a exclusão espacial do osmólito e alterações na constante dielétrica e na viscosidade da solução (Taylor et al., 1995; Wang e Bolen, 1997; Wang, Robertson e Bolen, 1995; Yancey, 2001; Fields, 2001; Saunders et al., 2000; Qu, Bolen e Bolen, 1998).

As membranas biológicas

Outros complexos organizacionais biológicos, como as membranas, que constituem a preocupação principal deste trabalho são também estabilizados pelos osmólitos. Será que os mesmos mecanismos termodinâmicos válidos para a estabilização de proteínas são também válidos para explicar a estabilização de membranas? Para endereçar corretamente esta questão, precisamos entender um pouco a respeito da organização estrutural das membranas biológicas.

As membranas biológicas são elementos de delimitação das células e também das unidades intracelulares (Nägeli e Cramer, 1855). Nos organismos eucarióticos, elas dividem a célula em compartimentos com diferentes especializações funcionais. Além disso, elas contêm proteínas especializadas no transporte e no controle do transporte de solutos tanto para dentro quanto para fora do ambiente delimitado. Algumas dessas proteínas também captam sinais químicos de origem hormonal e os transferem para o interior da célula, caracterizando o que a literatura chama de transmissão de sinais hormonais, os quais vão regular por mecanismos bioquímicos a fisiologia da célula. Outras proteínas, na membrana mitocondrial interna constituem a cadeia de transporte de elétrons, que gera as condições bioquímicas para que uma outra proteína de membrana, a ATP-sintase, converta a energia metabólica numa fonte corrente de energia para o organismo, o ATP. Assim, as membranas celulares são elementos essenciais na determinação da estrutura e também na função de células, tecidos e órgãos.

Estrutura das membranas celulares

As membranas são essencialmente constituídas de lipídios e de polímeros de aminoácidos, muitas vezes conjugados com carboidratos (Danielli e Davson, 1935). A proporção entre lipídios e proteínas varia conforme as funções mais específicas da membrana. A membrana plasmática de um eritrócito possui cerca de 20 tipos de proteínas proeminentes e várias outras com diferentes funções, como o transporte de diferentes tipos de solutos (Storry, 2004).

Todas as membranas apresentam estruturas gerais semelhantes (Robertson, 1957; Robertson, 1960). Elas são trilaminares quando observadas transversalmente ao microscópio eletrônico de transmissão. Fosfolipídios e esteróis formam uma bicamada de lipídios cujas porções hidrofóbicas se mantêm internamente à estrutura, deixando as porções polares expostas ao meio interno e externo. Nessa malha lipídica, que se mantêm por interações hidrofóbicas, proteínas aparecem irregularmente incrustadas e mantidas unidas aos lipídios por meio de interações hidrofóbicas (Singer e Nicholson, 1972; Cribier, Morrot e Zachowski, 1993). Algumas dessas proteínas encontram-se projetadas para um ou ambos os lados da membrana (Cribier, Morrot e Zachowski, 1993)

A natureza fluídica das membranas biológicas

Como os lipídios das membranas acham-se unidos entre si e com as proteínas por ligações de van der Waals, de natureza mais fraca do que as ligações covalentes, a membrana apresenta uma estrutura de natureza fluídica, de acordo com o chamado modelo do mosaico fluido (Singer e Nicholson, 1972).

Este estado de fluidez da membrana é ainda maior quanto maior é a temperatura do meio, uma vez que o aumento da temperatura promove fusão de seus lipídeos. A fluidez da membrana também aumenta com o aumento de seu teor em fosfolipídios com ácidos graxos insaturados em sua estrutura, uma vez que a presença dos dobramentos característicos das configurações espaciais cis, presentes nas insaturações de ocorrência natural, minimiza o número de interações intermoleculares de van der Waals e, por conseguinte a temperatura

de fusão da membrana. Assim, as membranas mais ricas em fosfolipídios com grupos acila saturados terão uma maior temperatura de transição e uma menor fluidez a uma dada temperatura em relação à membrana mais rica em fosfolipídios com grupos acila insaturados (Singer e Nicholson, 1972; Cribier, Morrot e Zachowski, 1993).

A fluidez de uma membrana também é afetada pelo seu teor de esteróis. O núcleo rígido do anel esteróide diminui a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono, elevando assim a temperatura de transição de fusão, o que diminui a fluidez da membrana.

Devido a essa fluidez da membrana, é possível haver movimentação ativa dos fosfolipídios dentro de sua monocamada, mas muito dificilmente o fosfolipídio vai-se deslocar para a outra monocamada (Cribier, Morrot e Zachowski, 1993). As proteínas estruturais da membrana, que formam agregados ou estão ancoradas a estruturas internas da célula, podem ser consideradas imóveis em relação aos lipídios. Mas algumas proteínas de membrana são também livres para se difundirem como os lipídios, especialmente aquelas presentes apenas em um dos lados da membrana (Cribier, Morrot e Zachowski, 1993).

A fluidez de uma membrana é essencial para a manutenção de funções da célula metabolicamente ativa. Mas quando uma célula é congelada, para preservação, o abaixamento da temperatura vai congelar também os fosfolipídios da membrana, que assim perde sua fluidez. Desde que nesse processo não haja danos estruturais à membrana e também à célula como um todo, esse processo pode ser revertido pela elevação da temperatura. Entretanto, é preciso condições especiais para garantir um congelamento reversível da célula.

Os eritrócitos como modelo de estudo das membranas

Os eritrócitos constituem um bom modelo para o estudo das membranas biológicas, especialmente de sua estabilidade, uma vez que a hemólise provocada por qualquer fator de estresse ambiental libera hemoglobina, que pode ser quantificada pela leitura espectrofotométrica da absorvância da luz visível em 540 nm ($A_{540 \text{ nm}}$). A absorvância a $A_{540 \text{ nm}}$ é proporcional à extensão da lise dos

eritrócitos (hemólise). Outros componentes solúveis do eritrócito, como enzimas, podem também ser quantificados na solução. Esses procedimentos exigem a separação dos elementos figurados íntegros do sangue e dos debris celulares, o que pode ser convenientemente executado por centrifugação (Nelson e Cox, 2000; Moeckel et al. 2002).

Comportamento das membranas em ambiente aquoso

O que acontece com os lipídios provenientes de uma membrana quando ela se desagrega em ambiente aquoso? A bicamada lipídica das membranas biológicas é um mosaico de várias espécies de moléculas em que o fosfolipídio é sua unidade básica (Cribier, Morrot e Zachowski, 1993). Os lipídios que constituem o elemento estrutural básico das membranas são essencialmente insolúveis em água. A razão dessa insolubilidade é a natureza apolar e, portanto, hidrofóbica, dos grupamentos acilas dos fosfolipídios. Entretanto, em ambiente aquoso os fosfolipídios podem formar estruturas microscópicas, chamadas de micelas, as quais constituem uma fase separada da água, mas homogeneamente dispersa nesse solvente. A micela é constituída de uma monocamada esferoidal de fosfolipídios, tridimensionalmente organizada de tal forma a esconder seus grupos hidrofóbicos no interior da microestrutura e a simultaneamente expor seus grupos hidrofílicos ao meio aquoso externo. Assim, a micela é estabilizada termodinamicamente pelas forças atrativas hidrofóbicas de van der Waals entre os grupos apolares dos fosfolipídios. Por outro lado, por minimizar o contato dos grupos apolares de seus fosfolipídios com o solvente aquoso, a micela minimiza a quantidade de moléculas de água organizadas em torno dos fosfolipídios. Isso permite que as moléculas de água possam estar em um estado mais livre, com maior entropia conformacional. Assim, a diminuição da entropia intrínseca à organização dos fosfolipídios na micela é compensada pelo aumento da entropia conformacional da água na fase aquosa externa à micela.

Estabilização de membranas biológicas por osmólitos

Muitas células animais e vegetais podem-se adaptar a condições de hipotonicidade ou hipertonicidade pela produção e acumulação de osmólitos da classe dos solutos compatíveis. Em resposta a um aumento na concentração de sal no meio externo, as cianobactérias, por exemplo, aumentam a concentração interna de sacarose. Plantas transgênicas que expressam genes bacterianos para sintetizar esse soluto mostraram tolerância aumentada contra concentrações elevadas de solutos caotrópicos e desidratantes e a variações na temperatura. Uma possível explicação pode ser uma habilidade desses solutos em estabilizar membranas sob condições de estresse. De fato, a presença de sorbitol protege as membranas de lipossomos contra o vazamento de um marcador colorido solúvel (Hincha e Hagemann, 2004).

Em mamíferos, os osmólitos compatíveis compreendem polióis, como inositol e sorbitol, e aminoácidos, como taurina e betaína (Moeckel et al. 2002). A maioria dos mamíferos, inclusive os humanos, usa pequenos solutos orgânicos no interior de suas células para atingir o equilíbrio osmótico com as elevadas concentrações de NaCl geralmente presentes no meio extracelular.

Importância biotecnológica da estabilização de membranas

O advento das novas abordagens industriais, terapêuticas e cirúrgicas exige o aprimoramento dos métodos de preservação de vacinas, tecidos, embriões, células e particularmente de elementos figurados do sangue. A biopreservação da integridade de eritrócitos é altamente significativa para atender à demanda clínica de pacientes com anemia, hemorragia por trauma ou cirurgia, e baixa produção de elementos sanguíneos pela medula óssea. Nesse sentido, os osmólitos naturais aparecem como alternativas viáveis de biopreservação, inclusive no sentido de não permitir os efeitos deletérios da criopreservação sobre os complexos organizacionais biológicos (Storey et al., 1996; Scott, Lecak, e Acker, 2005).

Origem da estabilização de membranas por osmólitos

Os osmólitos têm sido usados para criopreservação de células e de elementos figurados do sangue. O congelamento de células vivas na ausência de condições especiais de preservação causa danos irreversíveis a elas. Mas o congelamento na presença de osmólitos permite às células recuperarem suas funções após criopreservação por extensos períodos de tempo. Isso indica que estamos diante de eventos termodinamicamente reversíveis. Os estudos sobre a preservação de eritrócitos na presença de osmólitos afirmam que esses elementos figurados do sangue sofrem uma contração de volume que é revertida após a remoção do excesso de soluto. Isso nos indica que estamos então diante de uma situação de equilíbrio entre dois estados morfológicos diferentes do eritrócito, um estado expandido (**R**), presente nas condições naturais do sangue, e um estado condensado (**T**) presente na presença de altas concentrações de osmólitos.

Esse equilíbrio em que os dois estados podem se interconverter, reversivelmente, $R \rightleftharpoons T$, por alterações na pressão osmótica do solvente nos pareceu muito semelhante com o que ocorre nas proteínas, em que o aumento da pressão osmótica desloca o equilíbrio de estabilização do estado **D**, desenovelado, de maior superfície de contato com o solvente, para o estado **N**, nativo, de menor superfície de contato, $D \rightleftharpoons N$.

Essa coincidência sugere que a mesma origem termodinâmica da estabilização de proteínas por osmólitos seria também válida para explicar a estabilização dos eritrócitos. Tanto as proteínas quanto as membranas dos eritrócitos têm um interior anidro hidrofóbico, mantido pelo mesmo tipo de forças, que são as forças atrativas de van der Waals.

Assim, acreditamos que a explicação originalmente feita por Timasheff para justificar a estabilização de proteínas por osmólitos seja também válida para explicar a estabilização dos eritrócitos na presença desse tipo de soluto. Assim, o menor volume do estado **R** dos eritrócitos exigiria uma maior quantidade de energia livre para sua hidratação e uma menor entropia conformacional na estrutura da água em torno de sua esfera de hidratação em relação ao estado **T**. Por outro lado, a contração de volume do eritrócito deve significar a aproximação

dos grupos hidrofóbicos da membrana, com uma exacerbação da força hidrofóbica. A diminuição da entropia associada à diminuição da liberdade de movimentação dos fosfolipídios da membrana seria compensada pelo aumento da entropia conformacional do solvente em torno do estado **T** do eritrócito.

Considerações finais

Esse modelo de estabilização de eritrócitos por osmólitos, fundamentado no equilíbrio entre os estados **R** e **T**, embora pareça bastante racional e fundamentado em várias observações da literatura, carece de validação termodinâmica.

É possível que a estabilização desse estado **T**, gerada em meio de alta pressão osmótica, seja a explicação para a estabilização de eritrócitos observada por Aversi-Ferreira (2004) na presença de concentrações elevadas de etanol, que embora seja um agente caotrópico, também afeta a pressão osmótica do solvente onde ele é adicionado.

Referências bibliográficas

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

Bagnasco, S.; Balaban, R.; Fales H.M.; Yang Y.; Burg, M. Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 5872-5877, 1986.

Bennion, B.J.; Daggett, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D.C., v. 100, n. 9, p. 5142-5147, 2003.

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; n.5, p. 955-963; 2001.

Borowitzka, L.J.; Brown, A.D. The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. **Archiv fur Mikrobiologie**, v. 96, n. 1, 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, n. 2, p. 137-151, 1979.

Breslow, R.; Guo, T. Surface tension measurements show that chaotropic salting denaturants are not just water-structures breakers. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D.C., v. 87, n. 1, p. 167-169, 1990.

Castronuovo, G.; Elia, V.; Postiglione, C.; Velleca, F. interactions of aminoacids in concentrated aqueous solutions of urea or ethanol. implications for the mechanism of protein denaturation. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, The Netherlands, v. 339, p. 11-19, 1999.

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

Danielli J.F., Davson H. A contribution to the theory of permeability of thin films. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 5, p. 495-508, 1935.

Fields, P.A. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, New York, N.Y., v.129, p.417-431, 2001.

Garcia-Perez, A.; Burg, M.B. Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells. **Hypertension**, v.16, p. 595-602, 1990.

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

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

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

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

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

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

Murray, R.K.; Granner D.K.; Mayes, P.K.; Rodwell, V.W. **Harper's Biochemistry**. 24rd ed., New Jersey, Prentice-Hall, 1996. 806 pp.

Nägeli C., Cramer C. Pflanzenphysiologische Untersuchungen. Zürich, Schulthess, 1855.

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

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

Pace, C.N.; Shaw, K.L.; Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. **Proteins**, v. 41, p. 1-7, 2000.

Peterson, D.P.; Murphy, K.M.; Ursino, R.; Streeter, K.; & Yancey, P.H. Effects of dietary proteins and salt on rat renal osmolytes: covariation in urea and GPC contents. **The Journal of Physiology**, v. 263, F594-F600, 1992.

Pollard A.; Wyn-Jones, R.G. Enzyme activities in concentrated solution of glycinebetaine and other solutes. **Planta Berl**, v. 144, p. 291-298, 1979.

Qu, Y.; Bolen, C.L.; Bolen D.W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D.C. v. 95, n. 16, p. 9268-9273, 1998.

Robertson J.D. The cell membrane concept. **The Journal of Physiology**, v. 140, p. 58-59, 1957.

Robertson J.D. The molecular structure and contact relationships of cell membranes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 10, p. 344-418, 1960.

Saunders, A.J.; Davis-Searles, P.R.; Allen, D.L.; Pielak, G.J.; Erie, D.A. Osmolyte induced changes in protein conformational equilibria. **Biopolymers**, New York, N.Y., v. 53, p. 293-307, 2000.

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

Scott, K.L.; Lecak, J.; Acker J.P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 19, n. 2, p. 127-142, 2005.

Singer S.J., Nicholson G.L. The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

Somero, G.N. From dogfish to dog: trimethylamines protect proteins from urea. **New Physiological Sciences**, v. 1, p. 9-12, 1986.

Storey, K.B.; Mosser, D.D.; Douglas, D.N.; Grundy, J.E.; Storey, J.M. Biochemistry below 0 degrees C: nature's frozen vertebrates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 3, p. 283-307, 1996.

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

Tanford, C. Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solution. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, D.C., v. 86, n. 10, p. 2050-2059, 1963.

Taylor, L.S.; York, P.; Williams, A.C.; Edwards, H.G.M.; Mehta, C.; Jackson, G.S.; Badcoe, I.G.; Clarke, A.R. Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, The Netherlands, v. 1253, n. 1, p. 39-46, 1995.

Timasheff, S.N. In disperse solution, "osmotic stress" in a restricted case of preferential interactions. **Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 7363-7367, 1998.

Timasheff, S.N. The control of proteins stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 22, p. 67-97, 1993

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

Wang, A.; Bolen, D.W. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. **Biochemistry**, Washington, D.C., v. 36, n. 30, p. 9101-9108, 1997.

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

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

Yancey, P.H. Water stress, osmolytes and proteins. **American Zoologist**, Utica N.Y., v. 41, n. 4, p. 699-709, 2001.

Yancey, P.H.; Burg, M.B. Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. **The American Journal of Physiology**, v.258, R198-204, 1990.

Yancey, P.H.; Clark M.E.; Hand S.C.; Bowlus R.D.; Somero G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v.21, p. 1214-1222, 1982.

TRABALHO EXPERIMENTAL**EFEITO DO SORBITOL SOBRE A DEPENDÊNCIA
TÉRMICA DA ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS
HUMANOS CONTRA ETANOL**

RESUMO

EFEITO DO SORBITOL SOBRE A DEPENDÊNCIA TÉRMICA DA ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS CONTRA ETANOL

Estudante: **Morun Bernardino Neto**

Orientador: **Nilson Penha-Silva**

O eritrócito constitui um modelo muito adequado para estudo da estabilidade de membranas, uma vez que a ruptura de sua membrana promove liberação de hemoglobina, cuja absorção de luz na região do visível permite a monitoração da desnaturação da membrana. Neste trabalho nós estudamos o efeito da presença de sorbitol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos contra a ação desnaturante do etanol em NaCl 0,9%. A desnaturação da membrana foi monitorada pela medida da absorvância em 540 nm ($A_{540 \text{ nm}}$). A dependência de $A_{540 \text{ nm}}$ com a concentração de etanol em solução de NaCl a 0,9%, na ausência e na presença de sorbitol a 1 mol.L^{-1} , foi estudada a 27, 32, 37 e 42 °C. Após desnaturação completa dos eritrócitos, os valores de $A_{540 \text{ nm}}$ foram convertidos em percentagem de hemólise. Todas as dependências da % de hemólise com a concentração de etanol seguiram linhas de transição sigmoidal, que foram ajustadas à equação de Boltzman, para determinação da concentração de etanol capaz de promover 50% de hemólise (D_{50}). A incorporação de sorbitol a 1 mol.L^{-1} promoveu declínios estatisticamente significantes ($P < 0,01$) nos valores de D_{50} , em todas as temperaturas consideradas. O aumento da temperatura promoveu declínios também estatisticamente significantes ($P < 0,01$) nos valores de D_{50} tanto na ausência quanto na presença de sorbitol. Os valores de D_{50} apresentaram uma dependência linear com a temperatura. A inclinação da reta de dependência térmica de D_{50} na presença de sorbitol foi significativamente menor ($P < 0,01$) do que na ausência do osmólito. Isso significa que o sorbitol a 1 mol.L^{-1} aumenta o efeito caotrópico do etanol, ao mesmo tempo em que apresenta uma ação estabilizadora que é tanto maior quanto maior é a temperatura. Assumindo

linearidade além do intervalo de temperatura de 27 a 42 °C, as duas linhas de regressão devem sofrer uma intersecção em torno de 68,8 °C, ponto em que a ação estabilizadora do sorbitol neutralizaria seu sinergismo com a ação caotrópica do etanol. Esses efeitos foram explicados de acordo com um modelo de equilíbrio em dois estados para o eritrócito, um estado expandido de menor estabilidade e um estado contraído de maior estabilidade. Independentemente da explicação adotada, nossos resultados permitem concluir que, a 1 mol.L⁻¹ e na presença de NaCl a 0,9%, o sorbitol acentua a ação caotrópica do etanol e da temperatura, entre 27 e 42 °C, sobre a membrana do eritrócito, embora ele não tenha ação caotrópica entre 0 e 1,5 mol.L⁻¹, ao mesmo tempo em que também promove estabilização da membrana, numa intensidade que aumenta com o aumento da temperatura.

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

ABSTRACT

EFFECT OF SORBITOL ON THE THERMAL DEPENDENCE OF THE STABILITY OF HUMAN ERYTHROCYTES AGAINST ETHANOL

Student: **Morun Bernardino Neto**

Advisor: **Nilson Penha-Silva**

The erythrocyte constitutes a very adequate model to study the stability of biological membranes, since the rupture of its membrane promotes release of hemoglobin, which capacity to adsorb light in the visible region of the spectra permits the monitoration of the membrane denaturation. In this work, we studied the effect of the presence of sorbitol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes against the denaturant action of ethanol in 0,9% NaCl. The membrane denaturation was monitored by the measurement of the absorbance at 540 nm ($A_{540 \text{ nm}}$). The dependence of $A_{540 \text{ nm}}$ with the ethanol concentration in 0.9% NaCl, in the absence and presence of 1 mol.L⁻¹ sorbitol, was studied at 27, 32, 37 and 42 °C. After complete denaturation of the erythrocytes, the $A_{540 \text{ nm}}$ values were converted in percentage of hemolysis. All the dependencies of the % of hemolysis with the concentration of ethanol followed sigmoidal transition lines, which were adjusted to the Boltzman equation, in order to determine the concentration of ethanol able to promote 50% of hemolysis (D_{50}). The incorporation of 1 mol.L⁻¹ sorbitol promoted statistically significant decreases ($P < 0.01$) in the D_{50} values, for all considered temperatures. The increase in the temperature also promoted statistically significant decreases ($P < 0.01$) in the D_{50} values in the absence and in the presence of sorbitol. The values of D_{50} presented a linear dependence with the temperature. The slope of that line in the presence of sorbitol was significantly smaller ($P < 0.01$) than it was in absence of that solute. This means that the presence of 1 mol.L⁻¹ sorbitol increases the chaotropic action of ethanol, at the same time that it presents a stabilizing action, which increase with an increase in the temperature. If we assume linearity beyond the interval of 27 and 42 °C, those regression lines will intercept around 68.8 °C, where the stabilizing effect of sorbitol would neutralize its synergism with the chaotropic

action of ethanol. These effects were explained with basis in a two state equilibrium model for the erythrocyte, a less stable expanded state and a more stable contracted state. The rationality of the model is discussed. Whatever is the adopted explanation, our results permit conclude that 1 mol.L⁻¹ sorbitol, in the presence of 0.9% NaCl, increases the chaotropic action of ethanol and temperature on the erythrocyte membrane, although it does not present any chaotropic action itself between 0 and 1.5 mol.L⁻¹, by the same time that it also presents a stabilizing action on the membrane that increases with the increase in the temperature.

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

INTRODUÇÃO

Os osmólitos cosmotrópicos, também conhecidos como solutos compatíveis, são compostos orgânicos de baixo peso molecular, que podem aumentar a estabilidade do estado nativo de uma proteína, permitindo assim que essas macromoléculas continuem funcionais mesmo sob determinadas condições adversas, como temperaturas elevadas e altas pressões (Yancey et. al. 1982; Yancey, 2004).

Devido ao efeito protetor sobre proteínas exercido pelo sorbitol, poliol classificado como soluto compatível (Yancey et. al., 1982), o efeito protetor desse e de outros osmólitos, como o glicerol, tem sido explicado por diversos pesquisadores e ainda é um assunto que não foi totalmente esclarecido.

Alguns estudos têm mostrado que os osmólitos são excluídos preferencialmente da superfície de proteínas. Essa exclusão é mais intensa no caso da interação do osmólito com cadeias laterais apolares de aminoácidos hidrofóbicos (Gekko e Timasheff, 1981-a; Gekko e Timasheff, 1981-b; Timasheff e Arakawa, 1989). Tais aminoácidos estão presentes em maior quantidade no núcleo hidrofóbico de uma proteína (Nosoh e Sekiguchi, 1990).

Entretanto, pesquisas envolvendo energia livre de transferência revelaram que a interação de osmólitos com aminoácidos tanto polares como apolares é favorável e que a fonte de energia livre necessária para superar a entropia conformacional inerente a uma proteína seria decorrente das interações entre osmólito e esqueleto peptídico (Liu, Bolen, 1995; Wang, Robertson, Bolen, 1995; Bolen, Baskakov, 2001; Bolen, 2004).

Ao ser excluído da superfície da proteína, o osmólito deixa para trás uma camada enriquecida com água, denominada de camada de hidratação. As moléculas de água dessa camada são mais organizadas do que aquelas que constituem a fase volumosa do solvente e que apresentam maior liberdade de movimentação. Assim, a formação da camada de hidratação implica em um aumento de energia livre de modo a se compensar a perda de entropia decorrente do aumento da organização das moléculas de água que constituem essa camada (Gekko e Timasheff, 1981-a; Gekko e Timasheff, 1981-b; Timasheff e Arakawa, 1989).

Essa exclusão ocorreria porque, na presença de osmólitos, a interação entre a água e as cadeias laterais apolares seria ainda mais desfavorável termodinamicamente do que já é em sua ausência, pois envolveria um maior aumento de energia livre. Esse efeito foi chamado de efeito solvofóbico, pois envolve uma interação desfavorável entre água e osmólito, que são dois componentes do solvente (Gekko e Timasheff, 1981-a; Gekko e Timasheff, 1981-b; Timasheff e Arakawa, 1989). A palavra solvofóbico para se referir ao efeito do osmólito não é inapropriada porque, devido às altas concentrações geralmente utilizadas, o osmólito é mais propriamente um co-solvente do que um soluto (Timasheff e Arakawa, 1989). Esse efeito também foi chamado efeito osmofóbico, para enfatizar a importância dos osmólitos nessa ação (Bolen e Baskakov, 2001).

Assim, a origem do efeito dos osmólitos sobre proteínas tem sido apreciavelmente bem estudada na literatura. Entretanto, os osmólitos também são capazes de estabilizar outros complexos organizacionais biológicos, como cromossomos, membranas, células e tecidos.

Embora os osmólitos venham sendo descritos como agentes estabilizadores de membranas, particularmente de eritrócitos (Pellerin-Mendes et al., 1997; Moeckel et al., 2002; Wagner et al., 2002; de Loecker et al., 1993; Bakaltcheva, Odeyale e Spargo, 1996), que constituem um modelo conveniente para esse tipo de estudo, a origem desse efeito estabilizador sobre membranas ainda não foi devidamente apreciada na literatura.

Nesse trabalho, nós desenvolvemos um método para determinação da estabilidade de eritrócitos contra a concentração de um caotrópico (etanol), titulando a solução de eritrócitos em meio isotônico com o sangue contra concentrações crescentes do etanol, no intuito de investigar o efeito de um osmólito cosmotrópico, o sorbitol, sobre a estabilidade do eritrócito. Este efeito é estudado a 27, 32, 37 e 42 °C.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Uberlândia, após aprovação prévia do plano de pesquisa pela Comissão de Ética da instituição. Os doadores voluntários das amostras de sangue foram informados do projeto de pesquisa e assinaram um termo de consentimento esclarecido em sinal de sua concordância com a participação no projeto. Os doadores eram todos jovens universitários saudáveis pertencentes ao programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Reagentes

O etanol absoluto (PA) utilizado foi adquirido da Quimex com grau de pureza de 99,3% e utilizado sem purificação prévia. O sorbitol PA utilizado tinha um grau de pureza de 99,9% e foi adquirido da Nuclear.

Equipamento

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

Amostras de sangue

Amostras de sangue (4 mL) foram colhidas em vacutainer, contendo 50 μL de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 1g.dL^{-1} como anticoagulante, da veia antecubital de voluntários humanos saudáveis após jejum de 8 a 12 horas.

Efeito da concentração de sorbitol sobre a estabilidade de eritrócitos humanos

A uma bateria de tubos do tipo eppendorf contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,9% e uma concentração de sorbitol entre 0 e 1,5 mol.L⁻¹, pré-incubada a 37 °C por 10 minutos, eram adicionadas alíquotas de 25 µL de sangue. Após homogeneização, os tubos eram incubados por 30 minutos a 37 °C e centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. As absorvâncias dos sobrenadantes eram lidas em 540 nm contra um tubo controle contendo apenas NaCl a 0,9%.

Curvas de estabilidade dos eritrócitos humanos contra etanol na ausência de sorbitol

A uma série de baterias de tubos do tipo eppendorf contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,9% e de etanol entre 0 e 22%, pré-incubadas a 27, 32, 37 e 42 °C por 10 minutos, eram adicionadas alíquotas de 25 µL de sangue. Após homogeneização, os tubos eram incubados por 30 minutos em cada temperatura e depois centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. Durante as incubações os tubos permaneciam fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes eram lidas em 540 nm contra um tubo controle contendo apenas NaCl a 0,9%.

Curvas de estabilidade dos eritrócitos humanos contra etanol na presença de sorbitol a 1 mol.L⁻¹

A uma série de baterias de tubos do tipo eppendorff contendo 1 mL de solução de NaCl a 0,9%, sorbitol a 1 mol.L⁻¹ e uma concentração de etanol entre 0 e 22% (v/v), pré-incubadas a 27, 32, 37 e 42 °C, por 10 minutos, eram adicionadas alíquotas de 25 µL de sangue. Após homogeneização, os tubos eram incubados por 30 minutos em cada temperatura e depois centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. Durante as incubações os tubos permaneciam fechados. As absorvâncias dos sobrenadantes eram lidas em 540 nm contra um tubo controle contendo apenas sorbitol a 1 mol.L⁻¹ e NaCl a 0,9%.

Cálculos, edição dos dados e análises estatísticas

Os cálculos, as edições dos dados e as análises estatísticas foram executados com a utilização do aplicativo Origin 6.0 Professional (Microcal Inc.). A percentagem de hemólise em cada tubo era calculada com emprego da equação:

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{A_{540 \text{ nm}}}{A_{\text{máxima em } 540 \text{ nm}}} \times 100\%$$

As dependências da % de hemólise com a concentração de etanol foram ajustadas a linhas de regressão sigmoidal, dadas pela equação de Boltzman:

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

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

A existência de diferenças estatisticamente significantes entre os valores de D_{50} para as diferentes temperaturas e concentrações de sorbitol foi verificada por análise de variância (ANOVA).

A dependência de D_{50} com a temperatura, em graus centígrados, foi analisada por regressão linear.

A inclinação da linhas de regressão da dependência térmica de D_{50} na presença de sorbitol a 1 mol.L^{-1} foi comparada com a inclinação da linha na ausência de sorbitol por análise de variância (ANOVA) entre os valores individuais de D_{50} /temperatura.

O nível de significância (P) considerado nas análises estatísticas foi de 0,01.

RESULTADOS

Efeito da concentração do sorbitol sobre a estabilidade de membranas

O sorbitol, na faixa de concentração entre 0 e $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$, em meio com NaCl a 0,9% (figura 1), não produziu hemólise de eritrócitos humanos, o que indica que ele não apresenta ação caotrópica e que a ação caotrópica de outros solutos nesta faixa de concentração não deve ser decorrente da pressão osmótica do meio, nas condições utilizadas neste trabalho.

Titulação de eritrócitos humanos com etanol

O aumento da concentração de etanol, que é um conhecido agente caotrópico, provoca lise de eritrócitos humanos segundo um padrão sigmoidal (figura 2). Todas as dependências da percentagem de hemólise com a concentração de etanol, obtidas neste trabalho, foram ajustadas a curvas sigmoidais, de acordo com a equação de Boltzman, para determinação do parâmetro D_{50} , que representa a concentração de etanol capaz de provocar 50% de hemólise nas condições de cada ensaio. Em outras palavras, podemos dizer que D_{50} representa a estabilidade dos eritrócitos. Os valores de a_1 e a_2 representam as percentagens de hemólise obtidas no ajuste nas regiões de concentração não desnaturante e desnaturante, respectivamente, das membranas dos eritrócitos.

Efeito da temperatura e da presença de sorbitol a 1 mol.L^{-1} , em NaCl a 0,9%, sobre a estabilidade de eritrócitos humanos

As figuras 3, 4, 5 e 6 apresentam as dependências da percentagem de hemólise com a concentração de etanol nas temperaturas de 27, 32, 37 e 42°C , respectivamente, na ausência e presença de sorbitol a 1 mol.L^{-1} , sempre em

solução de NaCl a 0,9%. Essas dependências foram utilizadas para determinação dos valores de D_{50} mostrados na tabela 1. Os valores de D_{50} diminuem com o aumento da temperatura, o que significa que o aumento da temperatura diminui a estabilidade dos eritrócitos humanos.

Efeito do sorbitol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos

As duas retas da figura 7 representam as linhas de regressão linear da dependência dos valores de D_{50} com a temperatura na ausência e presença de sorbitol a 1 mol.L^{-1} . As duas retas apresentam inclinações estatisticamente diferentes ($P < 0,01$). O sorbitol diminui a dependência térmica da estabilidade dos eritrócitos, desde que a inclinação da reta para o sorbitol é menor do que em sua ausência, o que significa que o sorbitol apresenta um efeito estabilizador real sobre a membrana que se acentua com o aumento da temperatura.

Se nós considerarmos que a linearidade vai-se estender para além do limite de temperatura de 27 a 42 °C, é possível determinar a interseção das duas retas. A interseção ocorre em 68,8 °C. Essa temperatura tem um significado especial. Ela especifica o ponto em que o efeito protetor de membrana, apresentado pelo sorbitol, apresenta equivalência com seu efeito potencializador da lise de eritrócitos.

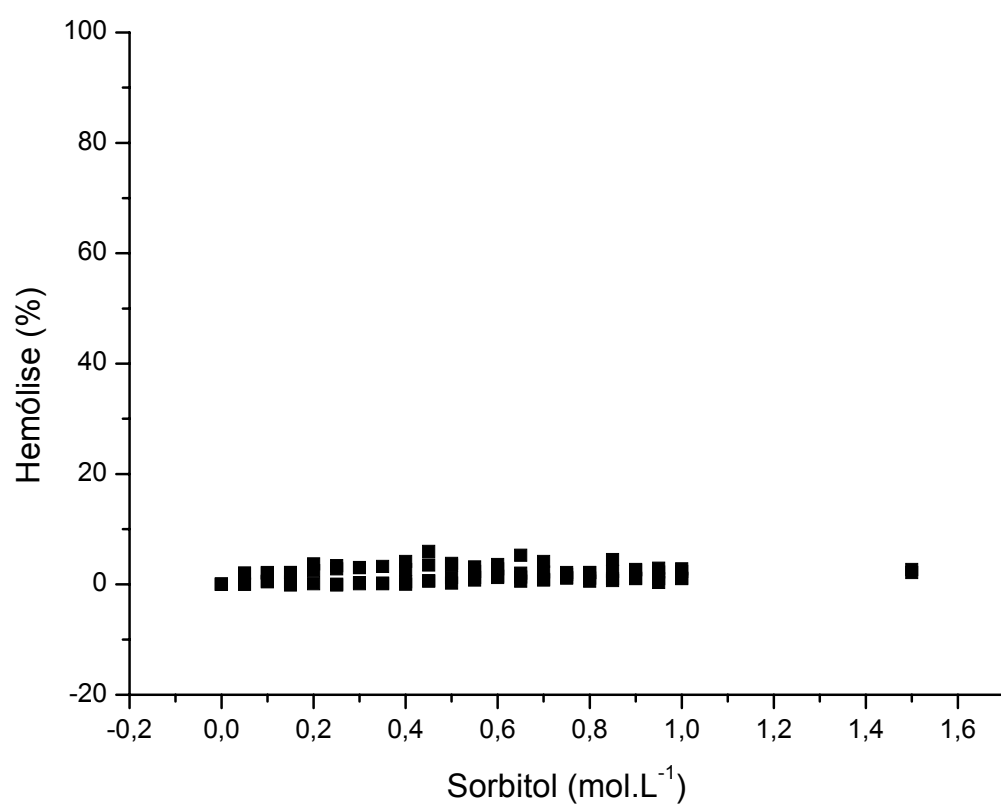


Figura 1 - Efeito da concentração de sorbitol sobre a hemólise de eritrócitos humanos em NaCl a 0,9% e 37 °C.

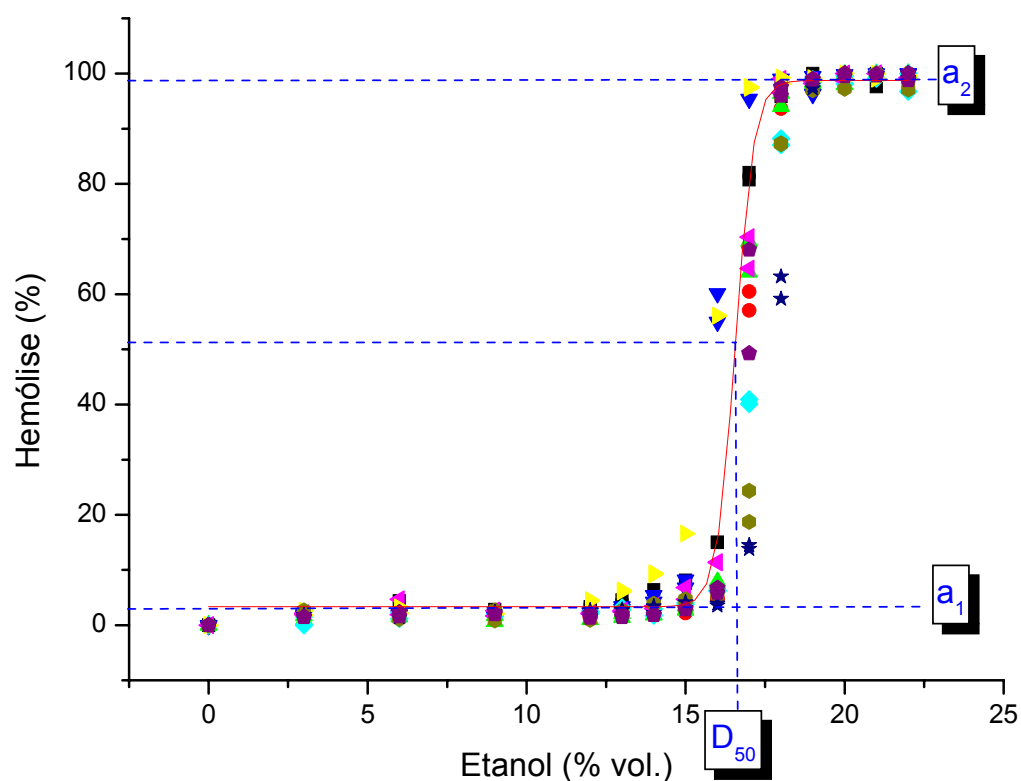


Figura 2 - Dependência da percentagem de hemólise com a concentração de etanol. Os dados foram ajustados à uma linha de regressão sigmoideal de acordo com a equação de Boltzman para determinação da concentração de etanol que promove 50% de hemólise (D_{50}). Os parâmetros a_1 e a_2 representam, respectivamente, os percentuais de hemólise antes (a_1) e depois (a_2) da transição de desnaturação dos eritrócitos, e D_{50} representa a concentração do desnaturante que produz 50% de hemólise.

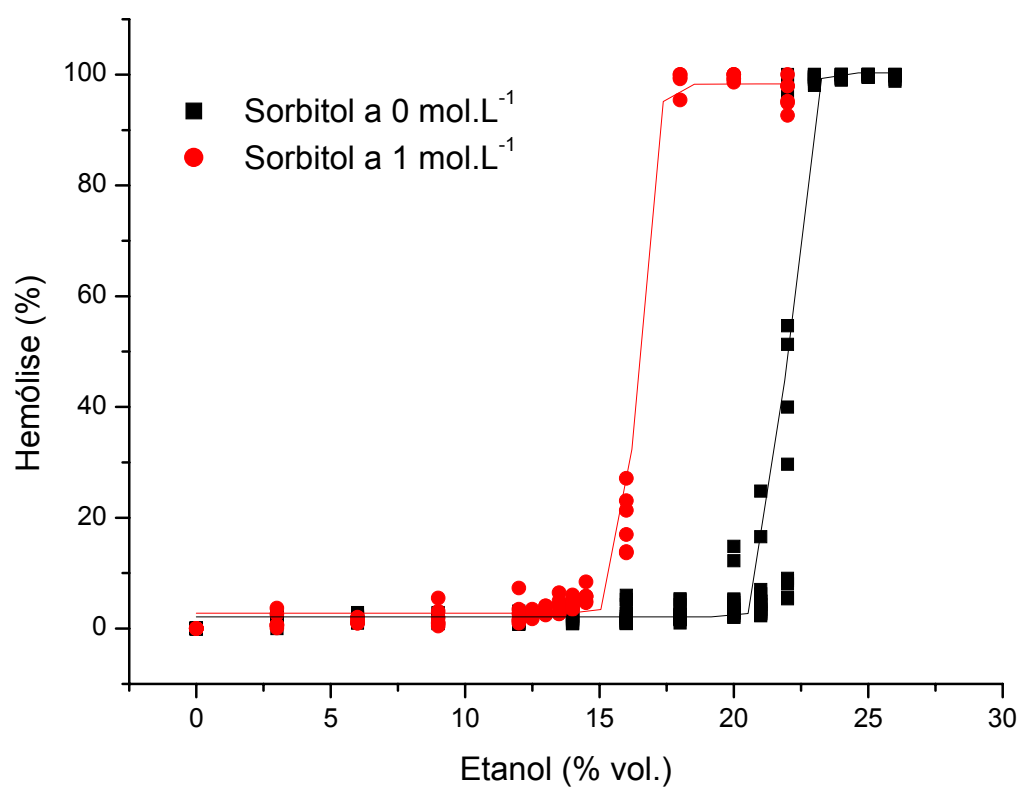


Figura 3 - Efeito da concentração de sorbitol sobre a estabilidade de eritrócitos humanos contra a desnaturação por etanol a 27 °C e em 0,9% NaCl.

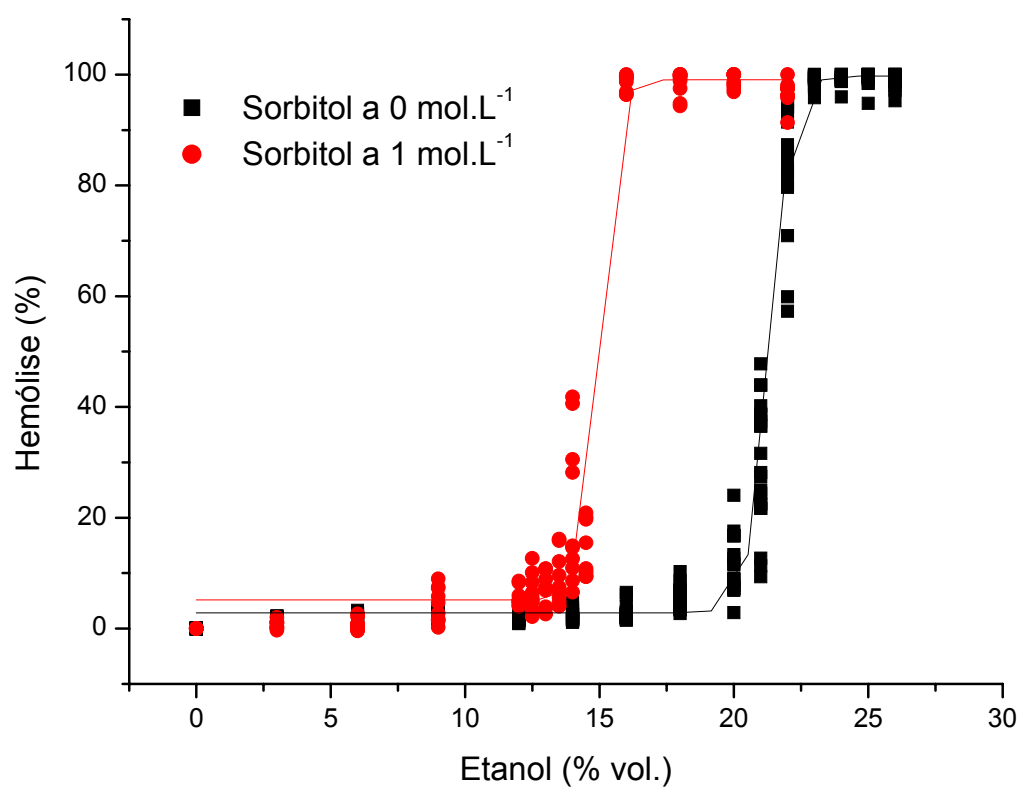


Figura 4 - Efeito da concentração de sorbitol sobre a estabilidade de eritócitos humanos contra a desnaturação por etanol a 32 °C e em 0,9% NaCl.

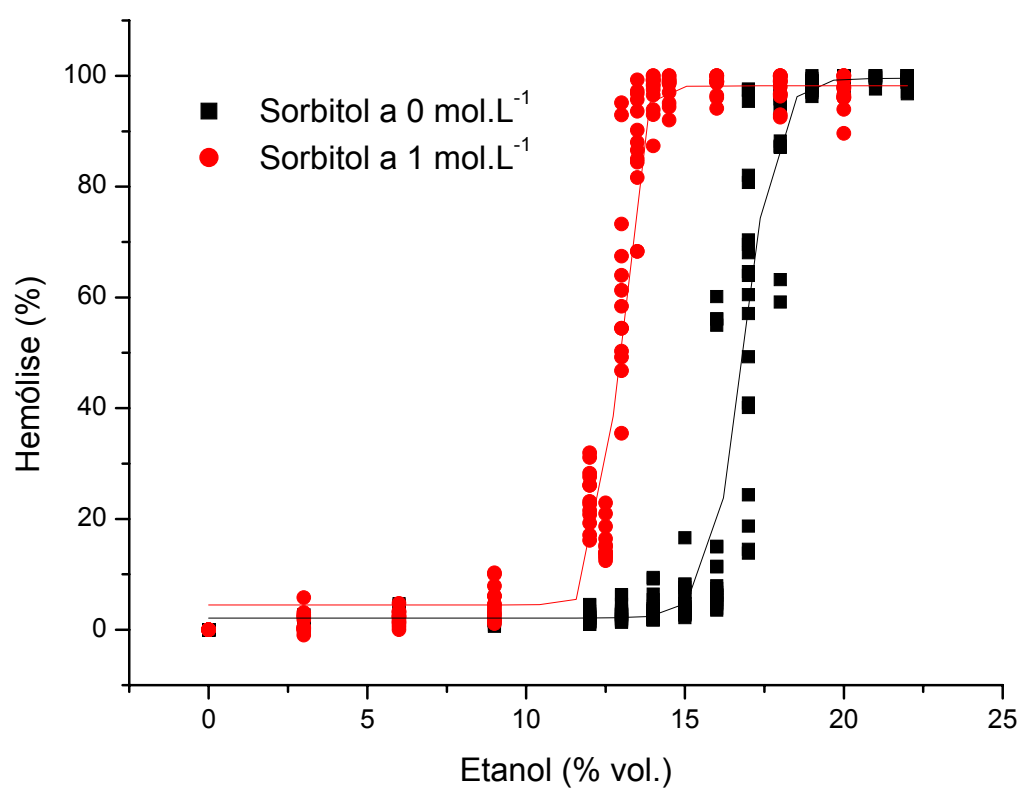


Figura 5 - Efeito da concentração de sorbitol sobre a estabilidade de eritócitos humanos contra a desnaturação por etanol a 37 °C e em 0,9% NaCl.

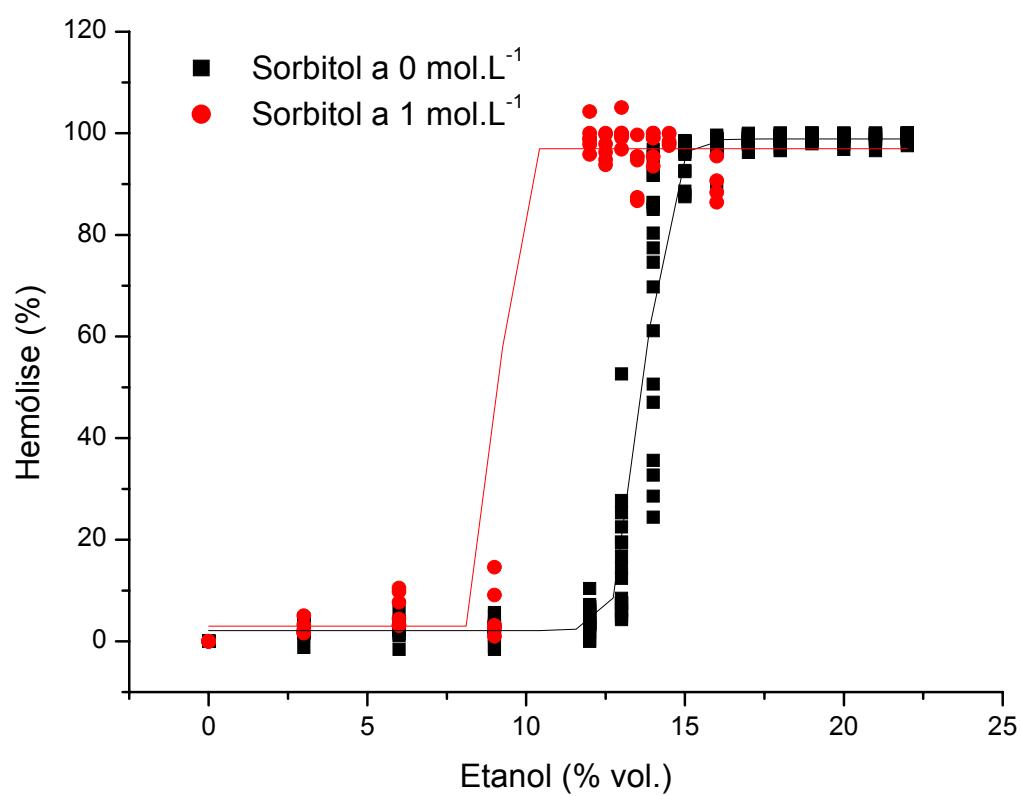


Figura 6 - Efeito da concentração de sorbitol sobre a estabilidade de eritócitos humanos contra a desnaturação por etanol a 42 °C e em 0,9% NaCl.

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

Temperatura (°C)	Sorbitol (mol.L ⁻¹)		P
	0	1	
27	21,91 $\pm$ 0,40	16,58 $\pm$ 0,41	*
32	21,36 $\pm$ 0,23	15,00 $\pm$ 0,11	*
37	16,81 $\pm$ 0,60	12,92 $\pm$ 0,14	*
42	13,74 $\pm$ 0,39	9,65 $\pm$ 0,48	*

* Os valores de P foram sempre menores do que 0,01, indicando diferenças estatisticamente significantes entre as temperaturas e as concentrações de sorbitol (ANOVA).

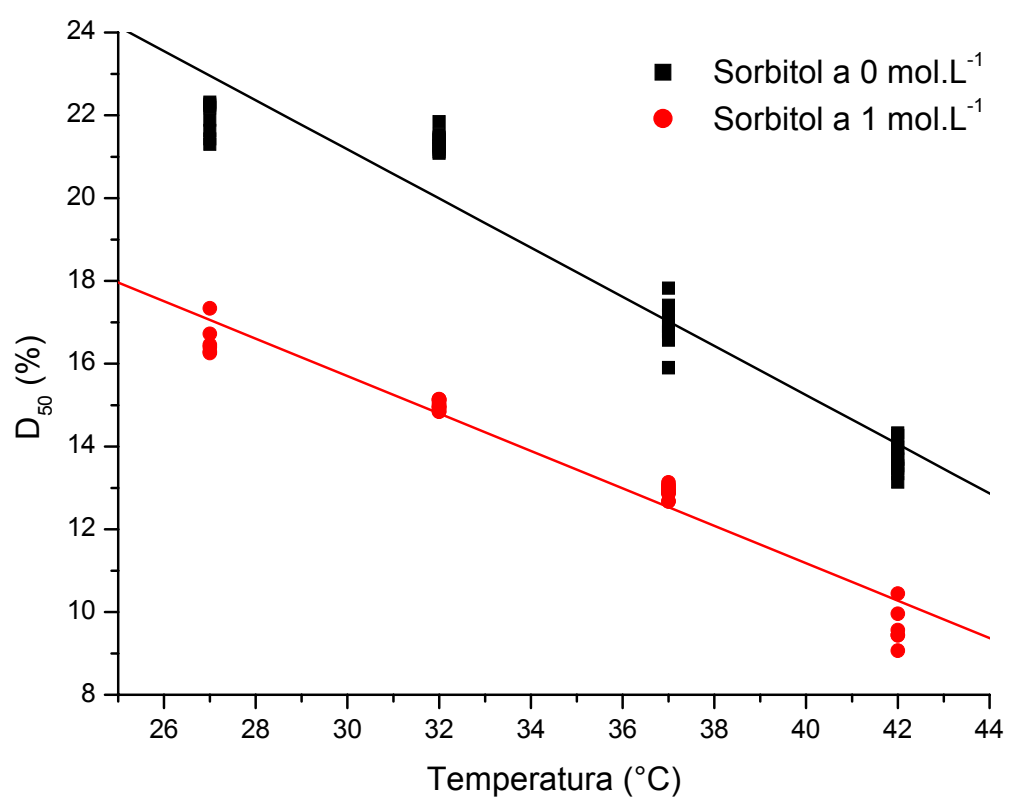


Figura 7 - Efeito da concentração de sorbitol sobre a dependência térmica, entre 27 e 42 $^{\circ}\text{C}$, de $D_{50\%}$ de eritrócitos humanos contra etanol em 0,9% NaCl.

DISCUSSÃO

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

O significado desse experimento é muito importante, porque demonstra que o sorbitol não apresenta efeito caotrópico sobre a membrana dos eritrócitos (**figura 1**), entre os limites de 0 e 1,5 mol.L⁻¹ de concentração. Isto faz sentido em relação à sua ação como um agente estabilizador de complexos organizacionais biológicos, pertencente à classe dos solutos compatíveis ou cosmotrópicos.

O sorbitol e outros agentes cosmotrópicos podem aumentar a eficiência da criopreservação de eritrócitos (de Loecker et. al., 1993; Wagner et. al., 2002; Moeckel et. al., 2002; Pellerin-Mendes et. al., 1997; Eroglu et. al., 2000; Bakaltcheva, Odeyale e Spargo, 1996; Bogner et. al., 2002). Solução de glicerol a 40% (4,35 mol.L⁻¹) é utilizada para criopreservação de eritrócitos a -80 °C por até 10 anos (Walker, 1996; Krijnen, Kuivenhoven e Wit, 1968; Rowe, Eyster e Kellner, 1968) e após remoção do osmólito, esse tratamento não causa prejuízo à sua resistência contra choque hipotônico, dada pelo índice de fragilidade (**H₅₀**), que é a concentração salina capaz de promover 50% de hemólise (Wagner et. al., 2002).

Entretanto, quando usamos o sorbitol na presença de etanol, o sorbitol potencializou a ação caotrópica do etanol a 27, 32, 37 e 42 °C (**figuras 3, 4, 5 e 6**), embora essa ação potencializadora tenha declinado com o aumento da temperatura, uma vez o declínio dos valores de **D₅₀** foi menos intenso na presença do que na ausência de sorbitol (**figura 7**). Para entender a ação do sorbitol sobre os eritrócitos humanos, é preciso que analisemos passo a passo nosso sistema.

A natureza sigmoidal da transição de hemólise dos eritrócitos pela ação do etanol em NaCl a 0,9%

O aumento da concentração de etanol promove uma transição com uma amplitude (**dD**) curta entre o estado íntegro (0% de hemólise) e o estado

completamente hemolisado do sangue (100% de hemólise). Essa transição é descrita por curva matemática chamada sigmóide, que é típica de processos cooperativos como o desenovelamento de proteínas por agentes desnaturantes e a dependência da cinética das enzimas alostéricas com a concentração de seus substratos específicos. A lise de eritrócitos promovida pelo etanol constitui também um processo cooperativo. A remoção das primeiras moléculas de fosfolípidios da membrana pelo caotrópico logo é seguida exponencialmente pela liberação de hemoglobina até se atingir um platô, onde o aumento da concentração de etanol não eleva mais a liberação de hemoglobina (**figura 2**).

A natureza sigmoidal da transição permite que ela seja facilmente ajustada a uma linha de regressão sigmoidal de Boltzman, em que o ponto de meia transição (D_{50}) é um elemento importante na definição da transição. D_{50} representa a concentração de etanol necessária para promover 50% de hemólise. Esse parâmetro tem equivalência com outros parâmetros usados na literatura, como a temperatura de fusão (T_M) de proteínas e ácidos nucleicos e a meia dose letal (DL_{50}) usada na caracterização de drogas em ensaios biológicos. Como naqueles outros sistemas, a aplicação de regressão sigmoidal gera um resultado com um significado físico definido e uma significância estatística facilmente detectada pela análise, o que permite que D_{50} possa ser usado na caracterização da estabilidade de eritrócitos em condições padronizadas.

A utilização deste parâmetro permitiu nosso estudo sobre o efeito do sorbitol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos contra a desnaturação, que estimulou a construção do modelo de equilíbrio que apresentamos abaixo a título de dirigir toda a discussão que fazemos depois.

Equilíbrio de estabilização de eritrócitos

A **figura 8** apresenta um modelo construído a partir da análise da ação do etanol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos na ausência e presença de sorbitol. Esse modelo foi criado coletivamente no Laboratório de Enzimologia, para interpretar resultados observados por Aversí-Ferreira (2004), e é também descrito nas dissertações de Finotti (2006) e de Gouvêa-e-Silva (2006).

Ele torna simples e esclarece todos os eventos associados ao nosso sistema. Ele considera que os eritrócitos apresentariam um equilíbrio entre dois estados principais, um estado expandido (**R**) de menor estabilidade e um estado contraído (**T**) de maior estabilidade. Esse equilíbrio seria perturbado pela pressão osmótica, temperatura e ação de solutos caotrópicos. O estado **R** existiria em meio de menor pressão osmótica e o estado **T** existiria em meio de maior pressão osmótica, formado a partir da retirada de água do interior do eritrócito no estado **R**. A maior estabilidade do estado **T** seria decorrente do fortalecimento das ligações de van der Waals no interior da malha lipídica da dupla camada da membrana, em decorrência da compactação do eritrócito. Ambos os estados estariam também sujeitos à lise pela ação do etanol como solvente, da temperatura e da pressão osmótica. A racionalidade usada na construção deste modelo é discutida nas seções seguintes.

Efeito da adição de etanol sobre eritrócitos humanos em NaCl a 0,9% e na ausência de sorbitol

Quando os eritrócitos, em meio contendo NaCl a 0,9%, são titulados com etanol devem ocorrer mudanças nas fases externa e interna da solução de eritrócitos.

A mudança na fase externa deve envolver dois eventos: 1) remoção de água da superfície do eritrócito, por ação da pressão osmótica determinada pela incorporação de etanol ao meio; e 2) diminuição da força hidrofóbica, decorrente de mudanças promovidas pelo etanol em propriedades do solvente, como a constante dielétrica. Esses dois eventos devem contribuir para a promoção do **primeiro efeito do etanol**, a lise do estado expandido do eritrócito em função do aumento na concentração de etanol, que é representada pela **rota 1** do modelo apresentado na **figura 8**. A ação da pressão osmótica deve ter um significado bem menor, praticamente insignificante, neste caso, uma vez que concentrações muito baixas de etanol são capazes de promover 50% de lise dos eritrócitos humanos (**figura 3**), mas concentrações muito mais altas de sorbitol (até $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$) não promovem lise rápida dos eritrócitos nas condições do ensaio (figura

1). Evidentemente, então, o efeito caotrópico do etanol sobre os eritrócitos, em seu estado expandido, não resulta em grande escala do aumento da pressão osmótica determinado pela adição de etanol ao meio.

O etanol, que é um agente caotrópico de proteínas, tem sua ação fundamentada na atenuação da força hidrofóbica e em sua capacidade de acomodar melhor no solvente as cadeias laterais apolares dos aminoácidos (Nozaki e Tanford, 1971; Castronuovo, 1999; Wang, Robertson e Bolen, 1995). Uma membrana biológica, com as caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídios dispostas lado a lado no interior anidro de uma estrutura em bicamada, tem a força hidrofóbica não somente como um fator diretor de sua formação como também de sua estabilização (**figura 9**). Com certeza, a lise do estado expandido do eritrócito, promovida pela ação do etanol, (**figura 2**) se deve à desnaturação da membrana. O etanol deve atenuar a força hidrofóbica, que é importante na formação e manutenção da bicamada lipídica (**figura 9**), promovendo fuga de fosfolipídios da membrana e sua solubilização no solvente (**figura 10**).

A mudança na fase interna do eritrócito deve envolver a remoção de água de seu interior, em decorrência do aumento da pressão osmótica provocado pela adição de etanol, o que levaria a uma contração de volume do eritrócito, que seria tanto mais intensa quanto maior for a concentração de etanol. Assim, o eritrócito passaria do estado **R** para o estado **T**. A contração do eritrócito promoveria aproximação dos lipídios de membrana e intensificação das forças atrativas de van der Waals no interior da membrana, levando ao **segundo efeito do etanol**, a estabilização dos eritrócitos. Esta idéia é condizente com relatos da literatura. Na presença de concentrações elevadas de agentes cosmotrópicos, que elevam substancialmente a pressão osmótica, os eritrócitos são mantidos estáveis por longos períodos, mas com um menor volume (Bakaltcheva, Odeyale e Spargo, 1996; Pellerin-Mendes et al., 1997). Além da concentração de etanol capaz de promover 100% de lise dos eritrócitos, a curva de dependência de **D₅₀** com a concentração de etanol apresenta um poço de estabilização em que os eritrócitos foram encontrados num estado contraído por microscopia de luz (Aversí-Ferreira, 2004). É por isso que, nessa faixa de concentração do etanol, o deslocamento do equilíbrio do estado **R** para o estado **T**, de maior estabilidade, iria neutralizar os

efeitos caotrópicos resultantes da mudança na fase externa, com a adição de etanol, prevalecendo a estabilização dos eritrócitos em detrimento da hemólise.

Entretanto, com a adição de mais etanol, a pressão no meio externo vai aumentar até a promoção do **terceiro efeito do etanol**, a lise do estado contraído de eritrócitos, promovida pela alta pressão osmótica e a ação caotrópica do etanol (**figura 11**). Como o eritrócito perdeu água e ficou mais contraído, o aumento na concentração de etanol aumenta externamente o efeito da pressão osmótica sobre o eritrócito e a lise ocorreria pelo somatório dos efeitos da desestabilização de origem externa com a ação caotrópica do etanol como solvente.

Efeito da adição de etanol sobre os eritrócitos humanos em NaCl 0,9% e na presença de sorbitol a 1 mol.L⁻¹

Quando o sistema anterior ganha um novo componente, sorbitol a uma concentração de 1 mol.L⁻¹, o aumento proporcionado na pressão osmótica deve gerar uma instabilidade na malha de lipídios da membrana e potencializar os efeitos descritos para o etanol (**figura 12**), de tal forma que os valores de **D₅₀** do etanol são menores na presença do que na ausência do sorbitol (**figuras 3, 4, 5 e 6**). Realmente, as diminuições observadas em **D₅₀** foram todas estatisticamente significantes (**tabela 1**). Se o glicerol a 1 mol.L⁻¹ é usado como soluto, em vez de sorbitol, o efeito sobre **D₅₀** é menos pronunciado (Finotti, 2006). A explicação para a diferença na intensidade do comportamento do glicerol em relação ao sorbitol é que o glicerol pode entrar no eritrócito, diferentemente do sorbitol (Wagner et al., 2002), de tal forma a atenuar o aumento da pressão osmótica externa com o aumento da concentração de etanol. Embora a incubação de eritrócitos em solução de sorbitol a 1 mol.L⁻¹ e na presença de NaCl a 0,9% nos intervalos de tempo usados neste trabalho não cause hemólise, a preservação mais longa de eritrócitos em trealose a 1 mol.L⁻¹, que também não entra no eritrócito, também promove alguma hemólise (Pellerin-Mendes et al., 1997).

Um dos eventos descritos para a mudança na fase externa, a remoção de água da superfície do eritrócito, é intensificado na presença do sorbitol, por causa do aumento que a presença desse soluto causa na pressão osmótica do solvente.

A presença de um soluto (sorbitol) que é ainda mais capaz de ligar água do que o etanol deve perturbar a força hidrofóbica, mas independentemente disso, a ação caotrópica do etanol dada pela sua capacidade de atrair e dissolver os lipídios de membrana continua presente e é fortalecida pelo sinergismo com a pressão osmótica. É por isso que os valores de D_{50} do etanol caíram na presença de sorbitol em toda faixa de temperatura empregada (**primeiro efeito do etanol**).

Por outro lado, o aumento da pressão osmótica causado pela presença de sorbitol afeta também a fase interna do eritrócito, intensificando a remoção de água e diminuindo a concentração de etanol necessária para promover a contração de volume e estabilização do eritrócito (**segundo efeito do etanol**). A baixa permeabilidade da membrana dos eritrócitos ao sorbitol (de Loecker et al., 1993; Wagner et al., 2002), deve favorecer o aumento da pressão osmótica e a desidratação e contração dos eritrócitos.

Realmente, na presença de sorbitol a região em que os eritrócitos sofrem diminuição de volume e estabilização ocorre sob menor concentração de etanol (Gouvêa-e-Silva, 2006). Da mesma forma que o aumento de pressão determinado pela presença do sorbitol antecipa a diminuição de volume e estabilização do eritrócito, ela também antecipa o **terceiro efeito do etanol**, que é a lise do estado contraído (**T**) de eritrócitos, promovida pela alta pressão osmótica e a ação caotrópica do etanol (Gouvêa-e-Silva, 2006).

Efeito da temperatura sobre a adição de etanol a eritrócitos humanos em NaCl a 0,9%

Uma vez que a pressão tem uma relação de dependência direta com a temperatura, o aumento na temperatura deve promover uma intensificação dos efeitos determinados pela pressão osmótica, de tal maneira a exacerbar todos os três efeitos sugeridos para o etanol. De fato, houve declínio em D_{50} com a temperatura (**tabela 1**) e antecipação do poço de estabilização do etanol nas curvas de dependência de D_{50} com a concentração de etanol (Gouvêa-e-Silva, 2006).

Mas uma parte dos efeitos observados deve ser decorrente da ação clássica do calor como agente desnaturante. Ele aumenta a energia vibracional térmica de grupamentos químicos, o que enfraquece as ligações não covalentes entre eles, sejam elas iônicas, de hidrogênio ou de van der Waals. A diminuição observada nos valores de D_{50} com o aumento na temperatura (**figuras 3, 4, 5 e 6**) é também uma manifestação lógica deste efeito, uma vez que a estabilidade da membrana é tanto menor quanto menor é o valor de D_{50} . Assim, é perfeitamente razoável admitir que o aumento da temperatura está enfraquecendo as ligações estabilizantes não covalentes da membrana e favorecendo a hemólise pela ação do etanol, embora a própria capacidade do etanol de atrair e ligar os fosfolipídios de membrana esteja também diminuindo com o aumento da temperatura.

Efeito da temperatura sobre a adição de etanol a eritrócitos humanos em NaCl a 0,9% e na presença de sorbitol a 1 mol.L⁻¹

Na presença de sorbitol a 1 mol.L⁻¹, o maior aumento da pressão osmótica promovido pelo aumento de temperatura pode justificar a ocorrência de lise de eritrócitos em menores valores de concentração de etanol (**tabela 1**). Como as ações 2 e 3 têm natureza osmótica, ela também deveria ocorrer na presença de menores concentrações de etanol, o que de fato foi observado, uma vez que o poço de estabilização dos gráficos de D_{50} contra a concentração de etanol migra para a esquerda na presença de sorbitol (Gouvêa-e-Silva, 2006).

A diminuição da inclinação determinada pela presença de sorbitol na dependência térmica dos valores de D_{50} do etanol (**figura 7**) tem um significado muito importante. O sorbitol está protegendo o eritrócito contra a incrementação térmica da ação desnaturante do etanol. Em outras palavras, poderíamos dizer que o sorbitol apresenta uma ação protetora dos eritrócitos que está aumentando com o aumento da temperatura. Qual seria a origem desse efeito de estabilização?

O modelo apresentado na **figura 8** pode explicar também essa observação. A presença de sorbitol desloca o equilíbrio do estado **R** para o estado **T**, que por ser mais estável é menos vulnerável ao efeito da temperatura,

de tal maneira os valores de D_{50} diminuiriam menos com o aumento da temperatura na presença de sorbitol, o que de fato ocorre (**tabela 1**). O próprio aumento da temperatura aumenta a pressão osmótica, uma vez que a pressão osmótica (Π) é dada pela expressão:

$$\Pi = MRT,$$

onde M é a concentração molar dos solutos, R é a constante universal dos gases ($1,984 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta, dada em Kelvin. Assim, a elevação na temperatura desloca o equilíbrio do estado R para o estado T dos eritrócitos, promovendo sua estabilização.

Como na ausência do sorbitol a pressão osmótica é baixa, o aumento da temperatura se manifesta mais no enfraquecimento das forças estabilizadoras da membrana, ativando a **rota 1 (figura 8)** em detrimento da **rota 2**. Mas na presença do sorbitol, a pressão osmótica é alta, e um aumento progressivo da temperatura favorece progressivamente a **rota 2**, gerando uma população maior de eritrócitos no estado mais estável T . É claro que isto é válido até um certo valor de pressão osmótica, uma vez que na presença de sorbitol e glicerol o poço de estabilização dos eritrócitos nos gráficos de D_{50} contra a concentração de etanol também encontra-se deslocado para a esquerda, de tal forma que tanto a **rota 2** quanto a **rota 3** teriam sido ativadas na presença daqueles solutos.

Se nós admitirmos linearidade além do intervalo de temperatura entre 27 e 42 °C (**figura 7**), as linhas de dependência térmica dos valores de D_{50} do etanol vão se interceptar em 68,6 °C. Qual seria o significado desse valor de temperatura? A temperatura de 68,6 °C representa um ponto de equivalência entre a ação potencializadora da hemólise de eritrócitos pelo etanol e a ação estabilizadora determinada pela presença do sorbitol. Nesse ponto, a ação estabilizadora do sorbitol neutralizaria a sua ação potencializadora da hemólise por etanol, o que estaria ocorrendo em decorrência da estabilização do estado T dos eritrócitos. Isso sugere que temperatura afeta mais intensamente a pressão osmótica do que as forças estabilizadoras da membrana, particularmente a força atrativa de van der Waals, que é enfraquecida pelo etanol. Uma possível explicação para esta observação poderia estar no número de ligações de hidrogênio formadas com a água. O sorbitol forma muito mais ligações de hidrogênio com a água do que o etanol, sem causar a diminuição da constante

dielétrica própria da incorporação desse soluto na água, de tal forma que a estrutura da água ficaria fortalecida na presença de sorbitol e o efeito entrópico do calor sobre o solvente seria minimizado.

A maior estabilidade do estado **T** em relação ao estado **R** dos eritrócitos pode ter uma outra explicação, fundamentada agora na teoria da exclusão diferencial de Timasheff, usada para explicar o efeito estabilizador dos osmólitos sobre as proteínas (Gekko e Timasheff, 1981-a; Gekko e Timasheff, 1981-b; Timasheff e Arakawa, 1989; Timasheff, 1998). A exclusão do sorbitol da esfera de hidratação mais próxima da superfície do eritrócito, assim como ocorre com as proteínas, exigiria o envolvimento de uma quantidade maior de energia livre para sua hidratação. Entretanto, como o estado **T** ocupa um menor volume do que o estado **R**, a menor energia livre requerida para hidratação do estado **T** tornaria ele mais estável em relação ao estado **R**. Essa mesma explicação, originalmente utilizada para justificar o efeito de polióis sobre proteínas, já foi também tentativamente usada para explicar o efeito de osmólitos sobre cromossomos (Gilles et al., 1999). O fato da natureza ter utilizado os mesmos compostos para garantir a estabilidade de diferentes sistemas organizacionais biológicos (proteínas, cromossomos e membranas), sugere que uma mesma explicação possa ser válida para o efeito observado, especialmente quando temos em mente que todas estas estruturas têm na força hidrofóbica um elemento importante na sua geração e estabilização. Entretanto, é preciso mencionar que essa explicação ainda carece de verificação experimental. Uma forma interessante de começar a validação deste mecanismo de ação seria a determinação da quantidade de moléculas de sorbitol ligadas à cabeça polar e à região hidrofílica das proteínas da membrana do eritrócito.

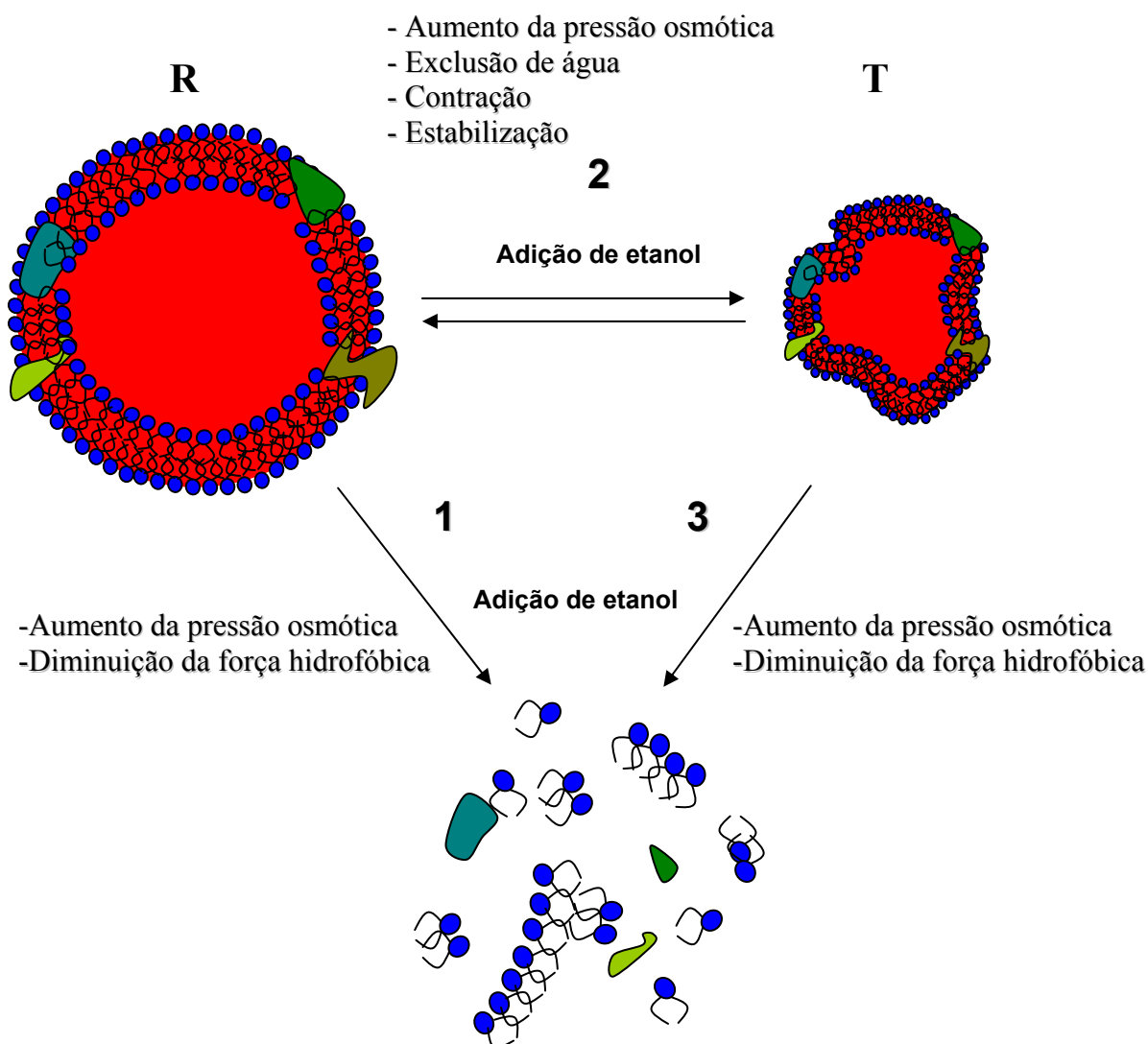


Figura 8 – Modelo explicativo das ações do etanol sobre eritrócitos em NaCl a 0,9%. A adição de etanol à solução de eritrócitos seria capaz de promover: 1) lise do estado **R** dos eritrócitos, em função do aumento da pressão osmótica e principalmente da diminuição da força hidrofóbica; 2) conversão do estado **R** em **T**, com estabilização dos eritrócitos, por causa da desidratação, seguida de contração de volume e aumento das forças atrativas de van der Waals na dupla camada lipídica, decorrente de aumento da pressão para saída de água no interior do eritrócito; e 3) lise dos eritrócitos que sofreram contração de volume, pela elevação da pressão osmótica e diminuição da força hidrofóbica. As rotas **1** e **3** são ativadas pelo aumento da pressão osmótica, que instabiliza o estado **R** (rota 1) pela pressão para saída de água do eritrócito e o estado **T** (rota 3) pela pressão do solvente sobre a superfície externa do eritrócito.

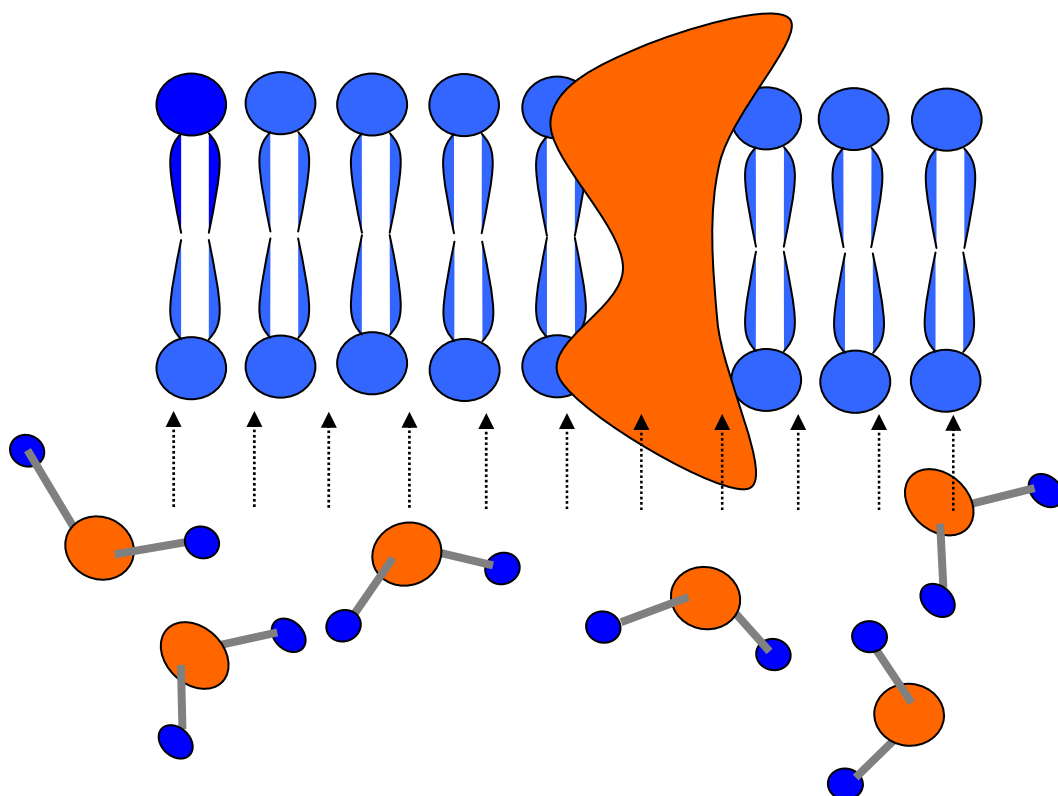


Figura 9 – Representação esquemática da interação de um segmento de membrana biológica com as moléculas de água. A força hidrofóbica (setas) dirige e mantém os fosfolípidios de membrana agrupados na típica estrutura de bicamada.

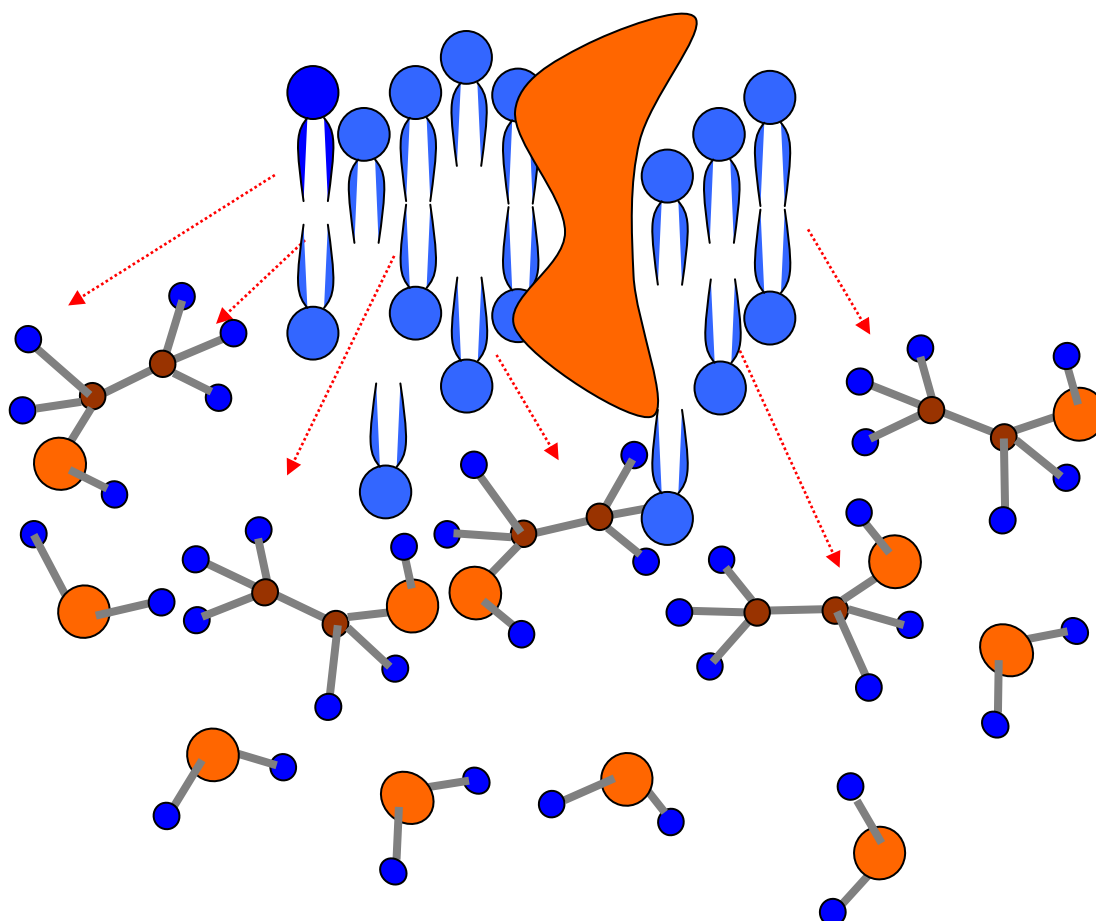


Figura 10 – Representação esquemática da ação do etanol sobre os fosfolipídios de um segmento de membrana biológica. A incorporação do etanol à água diminui a intensidade da força hidrofóbica e favorece a dispersão dos fosfolipídios no solvente.

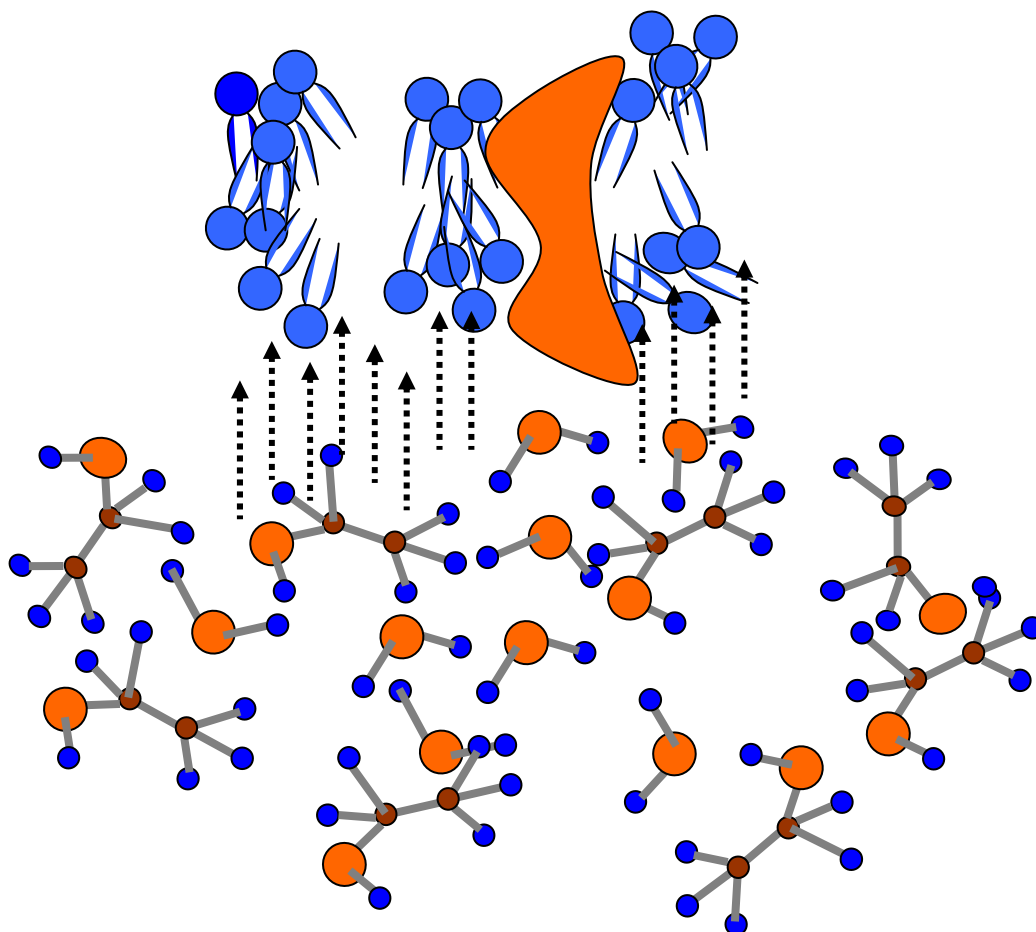


Figura 11 – Representação esquemática de uma possível explicação para a ação caotrópica do etanol sobre o estado contraído dos eritrócitos. O aumento da pressão osmótica determinado por concentrações mais elevadas de etanol estimularia a ruptura da membrana, permitindo ao etanol exercer sua ação solvente caotrópica sobre a membrana. Esta ação é intensificada pela adição de sorbitol e pelo aumento da temperatura.

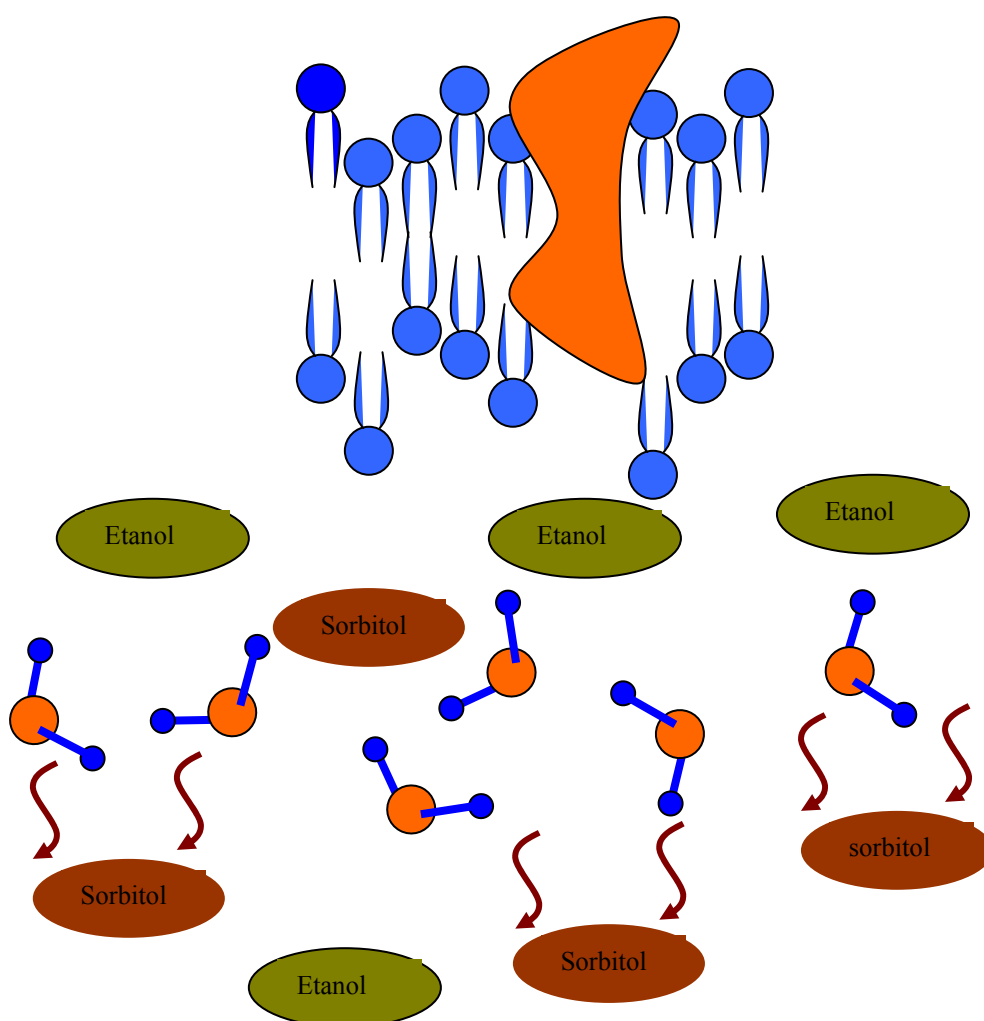


Figura 12 – Representação esquemática da possível ação sinérgica do sorbitol sobre a desnaturação de um segmento de membrana pela ação do etanol. O aumento da pressão hidrostática pelo sorbitol desestabilizaria a membrana e permitiria ao etanol remover os fosfolípidios com maior eficiência.

CONCLUSÃO

A 1 mol.L^{-1} e na presença de NaCl a 0,9%, o sorbitol acentua a ação caotrópica do etanol e da temperatura sobre a membrana do eritrócito, embora ele não tenha ação caotrópica entre 0 e $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$, ao mesmo tempo que também estabiliza a membrana, numa intensidade que aumenta com o aumento da temperatura. Assumindo uma dependência linear, além do intervalo de 27 a 42 °C, em 68,8 °C a ação estabilizadora do sorbitol deve neutralizar completamente seu efeito sinérgico sobre a ação caotrópica do etanol.

Nossos estudos estão de acordo com a ocorrência de um equilíbrio em dois estados nos eritrócitos, um estado expandido (**R**) de menor estabilidade e um estado contraído (**T**) de maior estabilidade. Cada um desses dois estados, que deve ser considerado como um macro-estado, é formado por um conjunto de um número muito grande de micro-estados. Esse equilíbrio é perturbado pela pressão osmótica, temperatura e ação de solutos caotrópicos. O estado **R** predomina em meio de menor pressão osmótica e o estado **T** em meio de maior pressão osmótica. O aumento da pressão osmótica desloca o equilíbrio, por exclusão de água do interior do eritrócito, do estado **R** para o estado **T** e vice-versa. A maior estabilidade do estado **T** seria decorrente do fortalecimento das ligações de van der Waals no interior da malha lipídica da dupla camada da membrana, em decorrência da compactação do eritrócito. Ambos os estados estão sujeitos à lise pela ação do etanol, da temperatura e da pressão osmótica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aversi-Ferreira, T.L. Efeitos pós-natais do etanol sobre o desenvolvimento do neocórtex de ratos wistar. Uberlândia, 2004, 70 p. 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, n. 1, p. 73-80, 1996.

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

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. Review: The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. **Journal of Molecular Biology**, v. 310; n.5, p. 955-963; 2001.

Castronuovo, G.; Elia, V.; Postiglione, C.; Velleca, F. Interactions of aminoacids in concentrated aqueous solutions of urea or ethanol. Implications for the mechanism of protein denaturation. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, The Netherlands, v. 339, p. 11-19, 1999.

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

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

Finotti C.J. Dependência térmica da osmoestabilização de eritrócitos por glicerol. Uberlândia, 2006, p. 50, Tese (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

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

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

Gilles R., Bourdouxhe-Housiaux C., Colson P., Houssier C. Effect of compensatory organic osmolytes on resistance to freeze-drying of I929 cell and of their isolated chromatin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 122, p. 145-155, 1999.

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

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

Lien, Y.H.; Pacelli, M.M.; Brawn, E.J. Characterization of organic osmolytes in avian renal medulla: a nonurea osmotic gradient system. **The American Journal of Physiology**, v. 264, R1045-R1049, 1993.

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

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

Nosoh Y.; Sekigushi T. Protein engineering for the thermostability. **Trends in Biotechnology**, v. 8; n. 1; p. 16-20; 1990

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

Pellerin-Mendes, C.; Million L.; Marchand-Arvier, M.; Labrude, P. e Vigneron C. In vitro study of the protective effect of the trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 35, p. 173-186, 1997

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

Somero, G.N. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. **The American Journal of Physiology**, v. 251, n. 2, p. R 197-213, 1986.

Timasheff, S.N. In disperse solution, "osmotic stress" in a restricted case of preferential interations. **Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 7363-7367, 1998.

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

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

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

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

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.

Yancey, P.H.; Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the dead sea to the deep sea. **Science Progress**, v. 87, Pt. 1, p. 1-24, 2004.

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

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

Yancey, P.H. Water stress, osmolytes and proteins. **American Zoologist**, Utica N.Y., v. 41, n. 4, p. 699-709, 2001.

Yancey, P.H.; Burg, M.B. Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. **American Journal of Physiology**, v. 258, R198-204, 1990.

Yancey, P.H.; Clark M.E.; Hand S.C.; Bowlus R.D.; Somero G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v.21, p. 1214-1222, 1982.

Yancey, P.H.; Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. **Science Progress**, v. 87, Pt. 1, p. 1-24, 2004.