



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

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIZAÇÃO DE ERITRÓCITOS  
POR ETANOL**

**Estudante: Luiz Fernando Gouvêa e Silva**

**UBERLÂNDIA, MG**

**2006**



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

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIZAÇÃO DE ERITRÓCITOS  
POR ETANOL**

**Estudante: Luiz Fernando Gouvêa e Silva**  
**Orientador: Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

**UBERLÂNDIA, MG**

**2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586c Silva, Luiz Fernando Gouvêa e, 1978-  
Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol / Luiz  
Fernando Gouvêa e Silva - 2006.  
53 f.: il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Células - Membranas - Teses. 2. Eritrócitos - Teses. 3. Álcool -  
Teses. I. Penha-Silva, Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 576.314

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

Palavras-chaves: Caotrópicos, estabilidade de membranas, eritrócitos, etanol, osmólitos.



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

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIZAÇÃO DE ERITRÓCITOS**  
**POR ETANOL**

**Estudante: Luiz Fernando Gouvêa e Silva**  
**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**

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIZAÇÃO DE ERITRÓCITOS**  
**POR ETANOL**

**ESTUDANTE:** **Luiz Fernando Gouvêa e Silva**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

**Examinador:** Professora Dra. **Ana Maria de Oliveira**

**Examinador:** Professor Dr. **Sérgio Akira Uyemura**

**DATA DA DEFESA:** 10/09/2006

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

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

“A construção mais importante que um acadêmico deve realizar, através da sua formação profissional, é a de seu caráter, que se dá com responsabilidade, honestidade e simplicidade.”

(Luiz Fernando Gouvêa-e-Silva)

## DEDICATÓRIA

Dedico esta obra a todas as pessoas que através do esforço e da persistência conseguem alcançar seus ideais.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe, Sandra Regina, e ao meu pai, Pedro Alencar, pelos ensinamentos e oportunidades oferecidas durante a minha formação.

Depois, à minha esposa, Daniele Gouvêa, que nunca me desamparou nos vários momentos de dificuldade que encontrei por esse caminho que percorri.

Não posso me esquecer de agradecer aos meus grandes amigos Tales Alexandre Aversi-Ferreira, Lúbia Cristina Fonseca e Letícia Ramos de Arvelos, pela paciência, pela sinceridade e pelos ensinamentos trocados durante os momentos em que compartilhamos dentro e fora do Laboratório de Enzimologia.

Por fim, à pessoa que acreditou nas minhas idéias e me deu credibilidade ao seu lado como pesquisador, Professor Nilson Penha Silva.

# ÍNDICE

|                                                                                       | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Abreviaturas.....                                                                     | viii   |
| Revisão da literatura: Estrutura e estabilidade de membranas biológicas.....          | 1      |
| Resumo.....                                                                           | 2      |
| Abstract.....                                                                         | 3      |
| Introdução.....                                                                       | 4      |
| A estrutura das membranas biológicas.....                                             | 4      |
| As funções das membranas biológicas.....                                              | 5      |
| A natureza fluídica das membranas biológicas.....                                     | 5      |
| As proteínas de membrana.....                                                         | 6      |
| Proteínas de membrana em eritrócitos.....                                             | 7      |
| A estabilidade das membranas biológicas.....                                          | 8      |
| Efeito de processos degenerativos sobre a estabilidade das membranas biológicas.....  | 10     |
| Efeito da alimentação e da atividade física sobre a estabilidade de membranas.....    | 11     |
| Efeito da ingestão e metabolismo do etanol sobre a estabilidade das membranas.....    | 11     |
| Estabilidade das membranas contra a desnaturação por etanol.....                      | 13     |
| A estabilização hiperosmolar de complexos biológicos.....                             | 13     |
| Considerações finais.....                                                             | 15     |
| Referências.....                                                                      | 16     |
| Análise das ações caotrópica e estabilizante do etanol sobre eritrócitos humanos..... | 22     |
| Resumo.....                                                                           | 23     |
| Abstract.....                                                                         | 24     |
| Introdução.....                                                                       | 25     |
| Material e métodos.....                                                               | 27     |
| Resultados.....                                                                       | 30     |
| Discussão.....                                                                        | 39     |
| Conclusões.....                                                                       | 45     |
| Referências.....                                                                      | 46     |

**ABREVIATURAS**

|          |                                                                 |
|----------|-----------------------------------------------------------------|
| $dD$     | Amplitude da transição de desnaturação                          |
| $D_{50}$ | Concentração do desnaturante que produz 50% de hemólise         |
| $D$      | Desnaturante                                                    |
| $T$      | Estado compactado dos eritrócitos                               |
| $R$      | Estado expandido dos eritrócitos                                |
| $A_1$    | Absorvância antes da transição de desnaturação dos eritrócitos  |
| $A_2$    | Absorvância depois da transição de desnaturação dos eritrócitos |
| $T$      | Temperatura absoluta, dada em Kelvin                            |

## **REVISÃO DA LITERATURA**

# **ESTRUTURA E ESTABILIDADE DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

## RESUMO

### ESTRUTURA E ESTABILIDADE DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Estudante: **Luiz Fernando Gouvêa e Silva**

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

A estabilidade de uma membrana biológica depende de sua composição bioquímica. As membranas são formadas por uma bicamada lipídica, onde algumas proteínas estão integralmente ou perifericamente inseridas. As estabilidades intrínsecas da bicamada lipídica e das proteínas de membrana vão determinar a estabilidade da membrana como um todo. Nessa revisão da literatura, nós discutimos alguns fatores que podem afetar a estabilidade de membrana, como a natureza dos ácidos graxos presentes nos lipídeos de membrana e o efeito de solutos caotrópicos e estabilizantes. Uma ênfase é dada à ação do etanol sobre as membranas biológicas.

**Descritores:** caotrópicos; eritrócitos; estabilidade de membranas; etanol; osmólitos

## **ABSTRACT**

### **STRUCTURE AND STABILITY OF BIOLOGICAL MEMBRANES**

Student: **Luiz Fernando Gouvêa-e-Silva**

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

The stability of a biological membrane depends on its biochemical composition. The membranes are formed by a lipid bilayer where proteins are integrally or peripherically embedded. The intrinsic stabilities of the lipid bilayer and membrane proteins will determine the overall stability of the membrane. In this literature review, we discuss some factors that can affect the membrane stability, as the nature of the fatty acids present in the membrane lipids and the effect of chaotropic and stabilizing solutes. An emphasis is given to the action of ethanol on the biological membranes.

**Keywords:** chaotropics; erythrocytes; ethanol; membrane stability; osmolytes

## INTRODUÇÃO

O comportamento e a capacidade de preservação de uma membrana biológica são intrinsecamente dependentes de sua estrutura química. Nesta revisão da literatura, procuramos mostrar quais são os constituintes das membranas biológicas e como eles se encontram organizados no sentido de garantir a estabilidade da membrana. Tanto as proteínas quanto os lipídeos das membranas podem ser alvos da ação de solutos caotrópicos e estabilizantes. Uma ênfase maior é dada ao efeito de solutos, particularmente o etanol, sobre a estabilidade da membrana do eritrócito.

## A ESTRUTURA DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Todas as células possuem uma membrana plasmática, mas as células eucarióticas têm o núcleo e organelas intracelulares também delimitadas por membranas (CAMPBELL, 2000). As membranas constituem uma barreira seletiva que possibilita a ocorrência dentro da célula de reações químicas que não seriam possíveis no meio extracelular (ALBERTS et al., 1997; VIEIRA, GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996; NELSON; COX, 2005; LODISH et al., 2003).

As membranas biológicas são formadas principalmente por proteínas e lipídeos. A porção protéica pode variar de 20 a 80% do peso total da membrana. O conhecimento da estrutura da membrana exige a compreensão das interações entre seus componentes lipídicos e protéicos (ALBERTS et al., 1997; CAMPBELL, 2000; DE WEER, 2000).

Há cerca de  $10^9$  moléculas de lipídeos na membrana plasmática de uma pequena célula animal (ALBERTS et al., 1997). Dentre os principais lipídeos constituintes de membranas podemos citar os fosfoacilgliceróis, os esfingolipídeos e os esteróis (LODISH et al., 2003). Esses lipídeos têm uma natureza anfifílica em comum. Nas membranas biológicas eles estão dispostos numa estrutura em bicamada, onde as cabeças polares ficam em contato com a água e as caudas apolares voltam-se para a parte interna da dupla camada. Esse arranjo em bicamada é dirigido principalmente pela força hidrofóbica e mantido pelas forças

atrativas de van der Waals (CAMPBELL, 2000; NELSON; COX, 2005; ALBERTS et al., 1997; LODISH et al., 2003).

O interior da bicamada é essencialmente hidrofóbico, formado por cadeias laterais saturadas e insaturadas de ácidos graxos, bem como pelo sistema anular do colesterol. Já a superfície polar contém grupos simplesmente polares, como a hidroxila do colesterol, ou polares com carga, como o grupo fosfocolina da fosfatidilcolina, dentre outros (CAMPBELL, 2000; LODISH et al., 2003).

A bicamada lipídica tem uma natureza necessariamente curva, para contornar a estrutura tridimensional da célula ou organela, de tal forma que a monocamada interna fica mais compactada e não é comum observamos moléculas grandes, como os cerebrosídeos, mas sim lipídeos de menor tamanho em relação à camada externa; essa diferença é usada para diferenciação das camadas (CAMPBELL, 2000; LODISH et al., 2003). Além disso, há uma maior distribuição de fosfatidilcolina e esfingomielina na camada externa e de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol na camada interna da bicamada (LODISH et al., 2003).

## **AS FUNÇÕES DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

Além da função de compartimentação de tecidos e células, as membranas biológicas desempenham funções de transporte, catálise e recepção de sinais. Sua natureza semipermeável permite fluxos seletivos de substâncias para dentro e para fora da célula e organelas. A presença de enzimas inseridas na membrana mitocondrial interna permite a catálise do fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Algumas proteínas de membrana funcionam com receptores de sinais químicos trazidos por hormônios; elas permitem a entrada do sinal hormonal e o disparo de várias respostas bioquímicas no interior da célula (CAMPBELL, 2000; ALBERTS et al., 1997).

## **A NATUREZA FLUÍDICA DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

Para exercer apropriadamente suas funções, as membranas biológicas não podem ser sólidas nem líquidas e sim fluidas. A composição da bicamada lipídica

é que determinará a sua fluidez. Quanto maior a quantidade de ácidos graxos saturados maior será a rigidez da membrana, pois o arranjo linear das cadeias alifáticas leva a um empacotamento das moléculas, deixando-as mais próximas e mais intensamente unidas entre si por uma maior quantidade de ligações de van der Waals. Contudo uma maior proporção de ácidos graxos insaturados diminui a rigidez da membrana ou, em outras palavras, eleva sua fluidez, pois a dobra determinada pela configuração *cis* da dupla ligação gera uma desordem no empacotamento das cadeias e o estabelecimento de uma menor extensão de forças atrativas de van der Waals entre as cadeias (CAMPBELL, 2000; NELSON; COX, 2005; VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996).

O colesterol, devido à rigidez de seu sistema anular, aumenta a ordem do empacotamento e, com isso, a rigidez da membrana. A estrutura formada pelo colesterol é bastante rígida e a sua presença estabiliza o arranjo linear dos ácidos graxos saturados por interações de van der Waals (CAMPBELL, 2000; NELSON; COX, 2005; ALBERTS et al., 1997; VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996).

Desta forma a temperatura de transição é maior para as membranas rígidas e ordenadas, ricas em ácidos graxos saturados e colesterol, que para as membranas fluidas e desordenadas, ricas em ácidos graxos insaturados (CAMPBELL, 2000; ALBERTS et al., 1997; VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996).

Há pouca tendência dos lipídeos migrarem de uma camada para a outra, evento denominado de “flip-flop”, mas o movimento lateral dentro de uma mesma camada acontece com bastante frequência, especialmente em bicamadas mais fluidas (CAMPBELL, 2000; NELSON; COX, 2005; ALBERTS et al., 1997; VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996; LODISH et al., 2003).

## **AS PROTEÍNAS DE MEMBRANA**

Como já descrito anteriormente, além dos lipídeos, as membranas biológicas possuem proteínas associadas à bicamada lipídica. Estas proteínas podem ser periféricas, quando ligadas na superfície da membrana, ou integrais, quando estão dentro da bicamada lipídica (CAMPBELL, 2000; NELSON; COX, 2005; ALBERTS et al., 1997; VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996). Além

destas classificações, Lodish et al. (2003) acrescentam as proteínas ancoradas nos lipídeos (“lipid-anchored proteins”), as quais são ligadas covalentemente a uma ou mais moléculas de lipídeos. As proteínas periféricas estão normalmente ligadas às proteínas integrais ou às cabeças polares da bicamada lipídica por interações polares, eletrostáticas ou ambas (CAMPBELL, 2000; LODISH et al., 2003).

## **PROTEÍNAS DE MEMBRANA EM ERITRÓCITOS**

Das proteínas que formam as membranas, em especial do eritrócito humano, 60% delas são constituídas pela espectrina, glicoforina e uma proteína chamada de proteína da banda 3 (STORRY, 2004). A espectrina é a mais abundante delas, apresenta uma forma cilíndrica longa, fina e flexível. Essa proteína é o principal componente do lado citoplasmático do arcabouço protéico da membrana do eritrócito, mantendo sua integridade estrutural e a forma bicôncava do eritrócito (ALBERTS et al., 1997). Além disso, An et al. (2004) demonstraram suas implicações e interação com a fostatidilserina na bicamada lipídica de eritrócitos. Podemos desta forma, considerar que o esqueleto protéico tem um importante papel na determinação das propriedades biofísicas da membrana dos eritrócitos (CHASIS; MOHANDAS, 1986).

Já Nash e Gratzer (1993) relataram que a densidade da espectrina está diretamente correlacionada com a rigidez da membrana. Embora as ligações cruzadas aumentem a rigidez do esqueleto, a interrupção da continuidade desta rede pela dissociação dos tetrâmeros de espectrina em dímeros não reduziu a rigidez do esqueleto, como esperado. Desta forma parece que a elasticidade pode ser regulada não somente pela estrutura da espectrina, mas também pelas interações com a bicamada lipídica.

A glicoforina é uma proteína transmembrânica, com sua maior parte localizada na superfície externa do eritrócito (ALBERTS et al., 1997), onde localiza-se o seu domínio aminoterminal. O domínio carboxilterminal está projetado para o interior da célula. Os dois domínios possuem muitos resíduos de aminoácidos polares ou carregados, os quais são muito hidrofílicos (NELSON; COX, 2005). Já a proteína da banda 3 é uma proteína multipasso da membrana

que catalisa o transporte acoplado de ânions. A principal função dos eritrócitos é transportar o oxigênio dos pulmões para os tecidos e auxiliar no transporte do dióxido de carbono dos tecidos para os alvéolos pulmonares, para tanto o dióxido de carbono tem que se difundir para o interior do eritrócito; isso é facilitado pela proteína da banda 3, que possibilita a entrada do dióxido de carbono em processo de troca com o cloreto (ALBERTS et al., 1997).

Anormalidades na função e/ou estrutura da proteína da banda 3 elevam a produção de anticorpos anti-proteína da banda 3, o que têm sido associado a várias desordens neurodegenerativas, embora os anticorpos anti-proteína da banda 3 seja fisiologicamente produzidos para reconhecer os eritrócitos envelhecidos e promover sua remoção da circulação pelos macrófagos (De FRANCESCHI; OLIVIERI; CORROCHER, 2004).

Outra proteína relacionada com a estabilidade de membrana é a proteína 4.1, cuja deficiência diminui a estabilidade da membrana. De fato, a reconstituição da proteína resulta em recuperação da estabilidade da membrana (TAKAKUWA; ISHIBASHI; MOHANDAS, 1990).

## **A ESTABILIDADE DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS**

Para funcionar adequadamente, as membranas celulares devem agregar fluidez e estabilidade. Nós entendemos por estabilidade de uma membrana a sua capacidade de manter sua estrutura contra os agentes que contribuem para sua desagregação. A maior estabilidade de uma membrana não significa necessariamente uma melhor preservação de sua atividade biológica. Um maior teor em ácidos graxos saturados nos fosfolípidos da membrana confere a ela uma maior estabilidade, em detrimento de sua fluidez, que é essencial para o exercício de suas funções. É por isso que uma membrana deve congrega o grau certo de estabilidade com seu grau necessário de fluidez.

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

A estabilidade de uma membrana biológica pode também ser aumentada por condições como a isotonicidade, o pH ótimo, a temperatura ótima e uma série de solutos estabilizantes, que podem ter diferentes mecanismos de ação, dentre os quais podemos citar o controle da osmolaridade da solução.

A natureza e a concentração dos ácidos graxos livres (FFA) presentes no meio podem afetar a estabilidade de eritrócitos (CSORDAS; RYBCZYNSKA, 1988; ZAVODNIK et al., 1996). A presença de ácido palmítico, a 400 mmol.l<sup>-1</sup>, aumenta a estabilidade de eritrócitos contra a hemólise por estresse hipotônico. Ele aumenta a diferença de potencial na membrana. Esse efeito foi atribuído a uma possível ação ionófora do ácido palmítico (ZAVODNIK et al., 1996), apesar de que a alteração do equilíbrio de translocação de eletrólitos de carga positiva pela simples presença do ânion palmitato no meio externo da membrana seria um fator determinante de alteração na diferença de potencial da membrana.

A estabilização de eritrócitos contra hemólise hipotônica não é uma prerrogativa de ânions, pois cátions divalentes também são capazes de proteger eritrócitos contra lise hipotônica (TOMOV; TSONEVA; DONCHEVA, 1988). Esse efeito pode ser atribuído à ligação e estabilização de grupos iônicos negativos da superfície da membrana, como sugeriram seus autores, mas também à normalização da tonicidade do meio, que se torna isotônico com a presença dos eletrólitos divalentes. Há com certeza um limite na densidade de cargas do meio para estabilização do eritrócito. O aumento excessivo da densidade de cargas do meio com certeza vai afetar a estabilização eletrostática do eritrócito. Realmente, a fragilidade osmótica de eritrócitos aumenta com o aumento na concentração de tris-acetil-acetil-acetonato entre 0,034 e 0,340 mmol.l<sup>-1</sup> (ZATTA; PERAZZOLO; CORAIN, 1989).

A ação estabilizadora dos ácidos graxos sobre os eritrócitos é sem dúvida dependente da ionicidade do ânion do ácido graxo, porque os ésteres derivados de ácidos graxos não apresentam ação protetora contra a hemólise promovida pela hipotonicidade (CSORDAS; RYBCZYNSKA, 1988; ZAVODNIK et al., 1996). Mas essa estabilização deve também ser dependente da concentração. Realmente, com o aumento na concentração do ácido graxo, seu efeito sobre o eritrócito passa de estabilizador para potencializador da hemólise induzida pela hipotonicidade (CSORDAS; RYBCZYNSKA, 1988).

A ação do ácido graxo sobre o eritrócito deve também depender da natureza da cadeia lateral. Na presença de ácido láurico, a estabilização de eritrócitos contra a hemólise por hipotonicidade ocorre entre 0 e 30 °C, mas na presença de ácido oléico esse efeito protetor ocorre somente entre 0 e 15 °C (CSORDAS; RYBCZYNSKA, 1988). Isso indica que a ação do ácido graxo sobre a susceptibilidade do eritrócito à hemólise não depende exclusivamente da ionicidade do ânion, mas também da natureza de sua cadeia lateral.

Dada à natureza lipídica e protéica das membranas biológicas naturais, é difícil dizer que componente da membrana é mais afetado pelo soluto. Mas essa tarefa é muito importante para o biotecnologista, porque ela permite conhecer a origem das condições que estabilizam uma membrana e, assim, fornecer subsídio para o desenvolvimento de novas tecnologias para estabilização de membranas.

Sem dúvida, as proteínas são afetadas por agentes caotrópicos. A desnaturação da espectrina, que ocorre acima de 49 °C, diminui a estabilidade da membrana do eritrócito (ZAVODNIK; PILETSKAIA; STEPURO, 1991).

## **EFEITO DE PROCESSOS DEGENERATIVOS SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANAS**

A estabilidade de uma membrana biológica pode ser afetada pelo estresse oxidativo metabólico. Os ácidos graxos polinsaturados presentes nos fosfolípidos das membranas biológicas são alvos da ação oxidativa dos metabólitos reativos do oxigênio (ROM), que incluem radicais livres como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ). Esse processo é designado na literatura como peroxidação de ácidos graxos polinsaturados de membranas ou simplesmente de lipoperoxidação de membranas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; SMITH et al., 2004). A lipoperoxidação das membranas seria capaz de diminuir seu teor em ácidos graxos polinsaturados, afetando sua estabilidade. Processos como o envelhecimento e várias doenças crônicas degenerativas, como o diabetes do tipo 2 e a aterosclerose seriam determinados pela lipoperoxidação de membranas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; DE FRANCESCHI; OLIVIERI; CORROCHER, 2004; SMITH et al., 2004).

O processo de lipoperoxidação produz derivados, como o malondialdeído, que podem ser quantificados. O malondialdeído reage com ácido tiobarbitúrico e produz um produto colorido que pode ser quantificado por colorimetria (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; RUMLEY; PATERSON, 1998; SMITH et al., 2004). De fato, os níveis de malondialdeído são elevados no diabetes do tipo 2 e em outros processos crônicos degenerativos (BRYSEWSKA et al., 1995).

## **EFEITO DA ALIMENTAÇÃO E DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANAS**

Os humanos e vários outros animais apresentam uma deficiência de origem evolucionária das dessaturases responsáveis pela produção de ácido linolêico e de ácido  $\alpha$ -linolênico (MURRAY et al.; 2003; NELSON; COX, 2005). Isso limita a oferta de ácidos graxos polinsaturados para seus estoques de gordura corporal e também para seus fosfolipídeos de membrana. Por essa razão, somos altamente dependentes da oferta desses ácidos graxos na alimentação.

Numa alimentação essencialmente constituída de carboidratos, como ocorre em nossa dieta padrão, o excesso de calorias estimula a lipogênese e causa aumento da oferta de gordura saturada (MURRAY et al.; 2003). Se esse aumento não é compensado com um aumento na ingestão dos ácidos graxos insaturados essenciais, o resultado líquido disso será o aumento na proporção de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídeos de nossas membranas biológicas.

A atividade física aumenta a demanda energética e o consumo dos ácidos graxos saturados provenientes da alimentação e da lipogênese endógena, de tal forma que diminui a oferta de ácidos graxos saturados para a formação das membranas biológicas.

Isso significa que a limitação da ingestão calórica e a atividade física devem ser mecanismos importantes de controle da composição de nossas membranas e, por extensão, de sua função e estabilidade.

## **EFEITO DA INGESTÃO E METABOLISMO DO ETANOL SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANAS**

O espectro de toxicidade do etanol é bastante amplo. O abuso crônico de etanol durante a gravidez determina um quadro chamado de síndrome alcoólica fetal (MILLER, 1986a; MILLER, 1986b; MILLER, 1992; MILLER, 1993; STRÖMLAND; PINAZO-DURÁN, 2002). Dependendo da data da ingestão durante a gravidez, mesmo a ingestão aguda de etanol pode produzir alterações no padrão de migração neuronal no processo da neurogênese (FERREIRA et al.; 2004; AVERSI-FERREIRA et al., 2005). Essas alterações podem ser devidas a alterações promovidas pelo etanol no comportamento elétrico das membranas das células neurais, o que afetaria as forças físico-químicas que dirigem a migração neuronal (FERREIRA et al.; 2004).

O metabolismo do etanol exacerba a geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROM), promovendo peroxidação de ácidos graxos polinsaturados dos lipídeos das membranas biológicas (KOSKA et al., 2000; SENTHILKUMAR; SENGOTTUVELAN; NALINI, 2004), o que altera a fluidez e, portanto, a estabilidade das membranas dos eritrócitos e hepatócitos (ARAKI; RIFKINDI, 1981; CHAN; GODIN; SUTTER, 1983; LINDI; MONTORFANO; MARCIANI, 1998; TYULINA et al., 2000; MAROTTA et al., 2001). Os ROM podem também peroxidar o colesterol, produzindo derivados (ADACHI et al., 2003) que aumentam a taxa de apoptose nas células musculares lisas de humanos e ratos (LIZARD et al., 1999). Essas alterações na estabilidade das membranas biológicas promovidas pelos ROM, estão associadas a vários processos crônicos degenerativos, como o envelhecimento e o diabetes mellitus do tipo 2 (PARAMAHANSA; APARNA; VARADACHARYULU, 2002).

As alterações na composição da membrana promovida pelos ROM pode também afetar a estabilidade do eritrócito contra fatores caotrópicos endógenos, como aumentos na pressão arterial, temperatura (LEPOCK et al., 1989), acidez e atrito contra a parede dos vasos sanguíneos, como ocorre na atividade física (MCNEIL; STEINHARDT, 1997).

Em portadores de falência hepática, o etanol aumenta a taxa de hemólise. Esse comportamento foi atribuído a alterações na fluidez da membrana do eritrócitos e na atividade da enzima piruvato-quinase da glicólise anaeróbica nos eritrócitos (GOEBEL; SCHNEIDER, 1981). É possível que essa alteração **in vivo**

da estabilidade dos eritrócitos seja resultado de alterações físico-químicas produzidas pela elevação dos níveis de etanol circulantes no sangue.

## **ESTABILIDADE DE MEMBRANAS CONTRA A DESNATURAÇÃO POR ETANOL**

O efeito do etanol sobre as membranas de diferentes células do organismo pode ser estudado *in vitro* a partir do estudo do comportamento dos eritrócitos em contato com o etanol.

A incubação de eritrócitos normais de coelhos com etanol favorece tanto a hemólise ácida quanto a hemólise oxidativa. A aceleração da hemólise oxidativa foi atribuída à inativação da atividade peroxidásica dos eritrócitos (TYULINA et al., 2000a).

A exacerbação da hemólise ácida produzida pela pré-incubação com etanol foi atribuída à formação de metabólitos do etanol (TYULINA et al., 2000b), mas a origem desse efeito pode ser bem diferente.

O etanol é um agente caotrópico típico que promove desnaturação de proteínas de membrana dos eritrócitos humanos, com abertura de poros por onde haveria saída da hemoglobina (ZAVODNIK; PILETSKAIA; STEPURO, 1994). A própria membrana seria instabilizada em função do aumento de sua permeabilidade.

Em meio aquoso, o etanol compete com a água pela formação de ligações de hidrogênio com lipídeos e proteínas da superfície da membrana. Como o etanol também é capaz de formar ligações de van der Waals com grupos apolares tanto de proteínas quanto dos lipídeos de membrana, ele contribuiria para a remoção de água da superfície da membrana, o que induziria alterações na conformação de proteínas de membrana e da própria membrana (KLEMM, 1998).

## **A ESTABILIZAÇÃO HIPEROSMOLAR DE COMPLEXOS BIOLÓGICOS**

A sacarose é um típico agente capaz de estabilizar complexos biológicos por hiperosmolaridade. Ela se insere num conjunto mais amplo de compostos que são coletivamente chamados de osmólitos na literatura (YANCEY et al., 1982).

Os osmólitos podem ser classificados, quanto à estrutura, em álcoois poliidroxílicos (como o glicerol e o sorbitol), aminoácidos e derivados (como a glicina, a metilglicina, a dimetilglicina e a trimetilglicina), açúcares (como a sacarose), dentre outros (YANCEY et al., 1982).

Quanto à função eles são classificados 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 (BOROWITZA; BROWN, 1974; YANCEY et al., 1982). Glicina, sacarose, glicerol e sorbitol são exemplos de solutos compatíveis, pois podem estar presentes em grandes concentrações intracelulares sem alterar as propriedades dos complexos organizacionais das células (YANCEY et al., 1982).

A presença de  $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$  de sacarose diminui a lise de eritrócitos induzida por concentrações elevadas de ácido palmítico. Como essa estabilização hiperosmolar do eritrócito está associada a uma alteração de forma e contração de volume do eritrócito (ZAVODNIK; PILETSKAIA; STEPURO, 1991), esse efeito deve resultar da interação dos componentes lipídicos e protéicos do complexo biológico. Entretanto, essa questão precisa ser aprofundada.

A  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  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 as membranas de eritrócitos humanos, embora ele isoladamente não tenha ação caotrópica entre 0 e  $1,5 \text{ mol.l}^{-1}$ . Entretanto, o aumento da temperatura diminui a ação sinérgica de sorbitol sobre a lise de eritrócitos induzida por etanol (BERNARDINO NETO, 2006).

A  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  e na presença de NaCl a 0,9%, o glicerol também acentua a ação caotrópica do etanol sobre a membrana de eritrócitos humanos, dentre os limites de 24,7 e 45,9 °C. Além desses limites de temperatura, o glicerol estabiliza os eritrócitos contra hemólise (FINOTTI, 2006). É esse efeito estabilizador que possibilita a criopreservação de eritrócitos humanos na presença de glicerol e outros solutos osmorreguladores (DE LOECKER et al., 1993; BAKALTCHEVA; ODEYALE; SPARGO, 1996; PELLERIN-MENDES et al., 1997; WAGNER et al., 2002).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O etanol é também um alanol, assim como o glicerol e o sorbitol, e pode também aumentar a osmolaridade da solução onde está presente. Para entender na dimensão exata os efeitos de osmólitos sobre a estabilidade de membranas de eritrócitos contra a ação desnaturante do etanol, é preciso avaliar primeiro quais são os efeitos de diferentes concentrações de etanol sobre a lise de eritrócitos.

Esse tipo de estudo tem grande importância não só na pesquisa da origem do efeito caotrópico do etanol sobre as membranas biológicas, mas também no aprimoramento das condições de preservação de complexos biológicos, como tecidos, células e macromoléculas.

## REFERÊNCIAS

- ADACHI, J.; ASANO, M.; UENO, Y.; NIEMELÄ, O.; OHLENDIECK, K.; PETERS, T.J.; PREEDY, V.R.J. Alcoholic muscle disease and biomembrane perturbations. **J. Nutr. Biochem.**, **14**, 616-625, 2003.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- AN, X.; GUO, X.; SUM, H.; MORROW, J.; GRATZER, W.; MOHANDAS, N. Phosphatidylserine binding sites in erythroid spectrin: location and implications for membrane stability. **Biochemistry**, **43**, 310-315, 2004.
- ARAKI, K.; RIFKIND, J.M. The rate of osmotic hemolysis: a relationship with membrane bilayer fluidity, **Biochim. Biophys. Acta.**, **645**, 81-91, 1981.
- AVERSI-FERREIRA, T.A.; CORRÊA, N.C.R.; MORAIS, J.O.R.; PENHA-SILVA, N. Efeitos pós-natais do etanol sobre a neurogênese neocortical em ratos Wistar. **Neurociências Brasil**, **22**, 304-310, 2004.
- BAKALTCHEVA, I.B.; ODEYALE, C.O.; SPARGO, B.J. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. **Biochim. Biophys. Acta**, **1280**, 73-80, 1996.
- BERNARDINO NETO, M. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2006. Nilson Penha-Silva (Orientador).
- 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. **Arch. Microbiol.**, **96**, 37-52, 1974.
- BRYSEWSKA, M.; ZAVODNIK, I.B.; NIEKURZAK, A.; SZOSLAND, K. Oxidative processes in red blood cells from normal and diabetic individuals. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, **37**, 345-354, 1995.
- CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CHAN, T.C.; GODIN, D.V.; SUTTER, M.C. Erythrocyte membrane properties of the chronic alcoholic rat, **Drug. Alcohol Depend.**, **12**, 249-257, 1983.

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

CSORDAS, A.; RYBCZYNSKA, M. Critical temperatures for the interaction of free fatty acids with the erythrocyte membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, **944**, 155-163, 1988.

DE FRANCESCHI, L.; OLIVIERI, O.; CORROCHER, R. Erythrocyte aging and neurodegenerative disorders. **Cell Mol. Biol.**, **50**, 179-185, 2004.

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**, **30**, 279-285, 1993.

DE WEER, P. A century of thinking about cell membranes. **Annu. Rev. Physiol.** **62**, 9191-926.

FERREIRA, T.A.A.; FERREIRA, N.R.; MORAIS, J.O.R.; PENHA-SILVA, N. Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in Wistar rats. **Braz. J. Morphol. Sci.**, **21**, 99-103, 2004.

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).

GOEBEL, K.M.; SCHNEIDER, J. Erythrocyte membrane fluidity, lipid peroxidation and lysis in alcoholic liver disease. **Acta Biol. Med. Ger.**, **40**, 571-576, 1981.

HALLIWELL, B.E.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: HALLIWELL, B.E. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Oxford University Press, 1989. p.188-218.

KLEMM, W.R. Biological water and its role in the effects of alcohol. **Alcohol**, **15**, 249-267, 1998.

KOSKA, J.; BLAZICEK, P.; MARKO, M.; GRNA, J.D.; KVETNANSKY, R.; VIGAS, M. Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans. **Physiol. Res.** **49**, S95-S100, 2000.

LEPOCK, J.R.; FREY, H.E.; BAYNE, H.; MARKUS, J. Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, **980**, 191-201, 1989.

LINDI, C.; MONTORFANO, G.; MARCIANI, P. Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake. **Alcohol**, **16**, 311-316, 1998.

LIZARD, G.; MONIER, S.; CORDELET, C.; GESQUIERE, L.; DECKERT, V.; GUELDRY, S.; LAGROST, L.; GAMBERT, P. Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7ketocholesterol in the cells of the vascular wall. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, **19**, 1190-1200, 1999.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, S.L.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. 5<sup>th</sup> ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2003.

MAROTTA, F.; SAFRAN, P.; TAJIRI, H.; PRINCESS, G.; ANZULOVIC, H.; IDEO, G.M.; ROUGE, A.; SEAL, M.G.; IDEO, G. Improvement of hemorheological abnormalities in alcoholics by an oral antioxidant. **Hepato-Gastroenterology**, **48**, 511-517, 2001.

MCNEIL, P.L.; STEINHARDT, R.A. Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity. **J. Cell Biol.**, **137**, 1-4, 1997.

MILLER, M.W. Effect of prenatal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex. I. Neuronal generation. **Alcohol Clin. Exp. Res.** **12**, 440-449, 1986b.

MILLER, M.W. Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. **Science**, **233**, 1308-1311, 1986a.

MILLER, M.W. Effects of prenatal exposure of ethanol on cell proliferation and neuronal migration. In: **Development of the Central Nervous System: Effects of Alcohol and Opiates** (Miller, M.W., ed). pp. 47-69. Wiley-Liss, Inc.: New York, 1992.

MILLER, M.W. Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. **Alcohol Clin. Exp. Res.** **17**, 304-314, 1993.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.K.; RODWELL, V.W. **Harper's biochemistry**. 26<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice-Hall, 2003.

NASH, G.B.; GRATZER, W.B. Structural determinants of the rigidity of the red cell membrane. **Biorheology**, **30**, 397-407, 1993.

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

PARAMAHAMSA, M.; APARNA, S.; VARADACHARYULU, N. Alcohol induced alterations in blood and erythrocyte membranes in diabetics. **Alcohol Alcohol.**, **37**, 49-51, 2002.

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**, **35**, 173-186, 1997.

PRZYBYLSKA, M.; BRYSEWSKA, M.; CHAPMAN, I.V. Thermal properties and fluidity of human erythrocyte membranes in diabetes mellitus. **Int. J. Radiat. Biol.**, **63**, 419-424, 1993.

RUMLEY, A.G.; PATERSON, J.R. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. **An. Clin. Biochem.**, **35**, 181-200, 1998.

SENTHILKUMAR, R.; SENGOTTUVELAN, M.; NALINI, N. Protective effect of glycine supplementation on the levels of lipid peroxidation and antioxidant

enzymes in the erythrocyte of rats with alcohol induced liver injury. **Cell Biochem. Funct.**, **22** 123-128, 2004.

SMITH, C.M.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M.A.; MARKS, D. B. **Basic Medical Biochemistry: a clinical approach**. 2<sup>nd</sup> edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2004.

STORRY, J.R. Review: the function of blood-specific RBC membrane components. **Immunohematology**, **20**, 206-216, 2004.

STRÖMLAND, K.; PINAZO-DURÁN, M.D. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. **Alcohol Alcohol.** **37**, 2-8, 2002.

TAKAKUWA, Y.; ISHIBASHI, T.; MOHANDAS, N. Regulation red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network. **Biorheology**, **27**, 357-365, 1990.

TOMOV, T.C.; TSONEVA, I.C.; DONCHEVA, J.C. Electrical stability of erythrocytes in the presence of divalent cations. **Biosci. Rep.**, **8**, 421-426, 1988.

TYULINA, O.V.; HUENTELMAN, M.J.; PROKOPIEVA, V.D.; BOLDYREV, A.A.; JOHNSON, P. Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis? **Biochim. Biophys. Acta**, **1535**, 69-77, 2000a.

TYULINA, O.V.; HUENTELMAN, M.J.; PROKOPIEVA, V.D.; JOHNSON, P.; BOLDYREV, A.A. Effect of ethanol on the hemolytic stability of erythrocytes. **Biochemistry**, **65**, 180-185, 2000b.

VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**. 2<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

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

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

ZATTA, P.; PERAZZOLO, M.; CORAIN, B. Tris acetylacetonate aluminium (III) induces osmotic fragility and acanthocyte formation in suspended erythrocytes. **Toxicol. Lett.**, **45**, 15-21, 1989.

ZAVODNIK, I.B.; LAPSHINA, E.A.; PALECZ, D.; BRYSZEWSKA, M. The effects of palmitate on human erythrocyte membrane potential and osmotic stability. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **56**, 401-407, 1996.

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

ZAVODNIK, I.B.; PILETSKAIA, T.P.; STEPURO, I.I. The effect of temperature on lysis of human erythrocytes by palmitic acid. **Biofizika**, **36**, 1056-1060, 1991.

## TRABALHO EXPERIMENTAL

### **ANÁLISE DAS AÇÕES CAOTRÓPICA E ESTABILIZANTE DO ETANOL SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS**

## RESUMO

### ANÁLISE DAS AÇÕES CAOTRÓPICA E ESTABILIZANTE DO ETANOL SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS

Estudante: **Luiz Fernando Gouvêa e Silva**

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

Amostras de sangue provenientes de 12 voluntários do gênero masculino (20-28 anos) foram incubadas com 0 a 34 g.dl<sup>-1</sup> de etanol e estudadas por espectrofotometria e microscopia de luz. Em 1.56 g.dl<sup>-1</sup> de etanol os eritrócitos foram visualizados em um estado intacto ou expandido (*R*), e em 25 g.dl<sup>-1</sup> de etanol, os eritrócitos apareceram em um estado contraído ou apertado (*T*), embora algumas estruturas sofreram ruptura nesta concentração de etanol. A dependência da percentagem de hemólise com a concentração de etanol mostrou três transições de natureza sigmoideal em toda extensão da concentração de etanol: uma desnaturação ( $D_{50R}$ ), uma estabilização ( $S_{50}$ ) e outra transição de desnaturação ( $D_{50T}$ ), com seus respectivos pontos médios em  $11,17 \pm 0,078$  ( $D_{50R}$ ),  $20,73 \pm 0,056$  ( $S_{50}$ ) e  $27,20 \pm 0,097$  g.dl<sup>-1</sup> ( $D_{50T}$ ) de etanol em 0.9% de NaCl. A incubação com 0.6% de NaCl alterou os valores de  $D_{50R}$ ,  $S_{50}$  e o  $D_{50T}$  para  $10,35 \pm 0,25$  ( $P < 0,001$ ),  $21,48 \pm 0,034$  ( $P < 0,001$ ) e  $31,27 \pm 1,490$  ( $P < 0,05$ ) g.dl<sup>-1</sup>, respectivamente. A diminuição do  $D_{50R}$  produzida pelo decréscimo da concentração de NaCl indica que esta transição de desnaturação é devida somente à ação caotrópica do etanol. O aumento produzido em  $S_{50}$  e  $D_{50T}$  indica que a estabilização e transição da desnaturação do estado *T* têm origem no aumento da pressão osmótica. A origem termodinâmica do efeito estabilizante do etanol sobre os eritrócitos foi explicada com base na teoria da hidratação preferencial.

**Unitermos:** caotrópicos; eritrócitos; estabilidade de membranas; etanol; osmólitos

## ABSTRACT

### ANALYSIS OF THE CHAOTROPIC AND STABILIZING ACTIONS OF THE ETHANOL ON HUMAN ERYTHROCYTES

Student: **Luiz Fernando Gouvêa-e-Silva**

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

Blood samples from 12 human male volunteers (20-28 years) were incubated with 0 to 34 g.dl<sup>-1</sup> ethanol and studied by visible spectrophotometry and light microscopy. In 1.56 g.dl<sup>-1</sup> ethanol, erythrocytes were seen in an intact and expanded state (*R*), and in 25 g.dl<sup>-1</sup> ethanol, the erythrocytes appeared in a contracted state (*T*), although some structures were disrupted at this ethanol concentration. The dependence of the percentage of hemolysis with the ethanol concentration showed three sigmoidal hemolysis transitions in the entire ethanol range: a denaturation, a stabilization and another denaturation transition, with their respective middle points at 11.17±0.078 ( $D_{50R}$ ), 20.73±0.056 ( $S_{50}$ ) and 27.20±0.097 g.dl<sup>-1</sup> ( $D_{50T}$ ) ethanol in 0.9% NaCl. Incubation with 0.6% NaCl changed the  $D_{50R}$ ,  $S_{50}$  and  $D_{50T}$  values to 10.35±0.25 ( $P<0.001$ ), 21.48±0.034 ( $P<0.001$ ) and 31.27±1.490 ( $P<0.05$ ) g.dl<sup>-1</sup>, respectively. The decrease in  $D_{50R}$  produced by the decrease in the NaCl concentration indicates that this denaturation transition is due only to the chaotropic action of ethanol. The increase produced in  $S_{50}$  and  $D_{50T}$  indicates that the stabilization and the denaturation transition of the *T* state are osmolarity based processes. The thermodynamical origin of that stabilizing effect of ethanol on the erythrocytes was tentatively explained with basis in the preferential hydration theory.

**Keywords:** chaotropics; erythrocytes; ethanol; membrane stability; osmolytes

## INTRODUÇÃO

Os complexos biológicos são muito vulneráveis aos agentes caotrópicos, os quais compreendem a pressão, extremos de pH, uréia, guanidina e etanol [1-6]. A natureza e também os biotecnologistas necessitam controlar a estabilidade dos complexos biológicos, e para isso eles usam um arsenal de procedimentos que engloba o aumento da osmolaridade do meio com solutos coletivamente chamados de osmólitos [7-44].

O etanol é um agente caotrópico de natureza anfifílica, com um segmento hidrofóbico ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ ) unido a um grupo hidrofílico ( $\text{-OH}$ ). O etanol pode-se misturar com a água e acomodar os grupos hidrofóbicos de uma proteína, atenuando a força hidrofóbica e desfavorecendo o estado nativo em relação ao estado desnaturado da proteína [30,45]. De fato, a transferência da cadeia lateral apolar do aminoácido para o etanol ocorre com valores negativos de energia livre de transferência ( $\delta g_{\text{tr}}$ ), o que indica a natureza favorável de sua transferência. Uma vez que os valores  $\delta g_{\text{tr}}$  para a transferência do esqueleto peptídico da água para o etanol são positivos, a desnaturação da proteína pelo etanol é governada pela grande afinidade do etanol pelas cadeias laterais hidrofóbicas da proteína. [45,46]. O efeito do etanol sobre a estabilidade protéica é sem dúvida manifestado sobre as proteínas de membrana e do citoesqueleto, o que deve estar envolvido na lise induzida por etanol e nas transições de formas do eritrócito descritas na literatura [47-52].

Os solutos caotrópicos, os quais desnaturam complexos biológicos, também aumentam a osmolaridade da solução e podem oferecer uma ação estabilizadora [53]. Este estudo investiga a natureza antagonista das ações do etanol como agente caotrópico e osmoestabilizador de eritrócitos humanos.

A osmoestabilização dos eritrócitos e de outras células é um procedimento conhecido por permitir sua criopreservação por longos períodos de tempo, tarefa esta que emprega pequenos solutos como glicerol, sorbitol, trealose e dextrana [54-58]. Uma vez que a osmoestabilização do eritrócito ocorre com contração de volume e alterações morfológicas que podem ser revertidas após diluição do excesso de soluto [55,56,59,60], isto indica a existência de um equilíbrio entre

dois (ou mais) estados morfológicos, um estado expandido ou relaxado ( $R$ ), presente nas condições naturais do sangue, e um estado condensado ou tenso ( $T$ ), presente em altas concentrações de osmólitos. Este trabalho também tenta analisar o mecanismo termodinâmico do efeito osmoestabilizador de eritrócitos à luz da teoria da hidratação preferencial [15,20,27,35,36,61].

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras de sangue

A execução deste estudo foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras de sangue (3 ml) foram coletadas com seringas contendo heparina, proveniente da veia antecubital de voluntários humanos do gênero masculino (n=12, 20-28 anos), após jejum noturno de 8 a 12 horas.

### Fragilidade osmótica de eritrócitos humanos

A cada unidade de uma série duplicada de frascos de Eppendorf contendo 1 ml de uma solução teste com 0 a 9 g.dl<sup>-1</sup> de NaCl, nós adicionamos 10 µl de sangue. Após homogeneização e incubação em 37 °C, os frascos foram centrifugados a 600xg por 10 minutos e seus sobrenadantes foram analisados por espectrofotometria visível em 540 nm, com uso de um espectrofotômetro Micronal B442 (São Paulo, SP, Brasil).

Para expressar a absorbância em 540 nm ( $A_{540}$ ) em percentagem de hemólise, nós primeiramente fitamos a dependência de  $A_{540}$  com a concentração de NaCl pela forma decrescente da equação de Boltzmann:

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

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

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{A_{540\text{ nm}}}{A_1} \times 100\% \quad (2),$$

e então as dependências da percentagem de hemólise com a concentração de etanol foram ajustadas a linhas de regressão sigmoidal de acordo com a forma decrescente da equação de Boltzmann.

### Dependência da estabilidade dos eritrócitos humanos contra o etanol

A estabilidade dos eritrócitos foi analisada em soluções com 0 a 34 g.dl<sup>-1</sup> de etanol na presença de 0.9 e 0.6% de NaCl. A cada unidade de uma série duplicada de frascos de eppendorf nós adicionamos 1 ml da solução teste e 10 µl de sangue. Após homogeneização e incubação a 37 °C, os frascos foram centrifugados a 600xg por 10 minutos e os sobrenadantes foram analisados por espectrofotometria visível em 540 nm, com uso de um espectrofotômetro Micronal B442 (São Paulo, SP, Brasil).

Para expressar a absorbância de 540 nm em percentagem de hemólise, nós primeiramente fitamos a dependência de  $A_{540}$  com a concentração de etanol pela forma crescente da equação de Boltzmann:

$$A_{540\text{ nm}} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(D - D_{50})/dD}} \quad (3),$$

em que  $A_1$  e  $A_2$  representam os valores mínimo e máximo de  $A_{540}$ ,  $D$  é a concentração do desnaturante,  $D_{50}$  representa a concentração do desnaturante que causa 50% de hemólise e  $dD$  é a amplitude da transição sigmoidal entre  $A_1$  e  $A_2$ . A percentagem de hemólise em cada tubo de análise foi calculada com o uso da equação:

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{A_{540\text{ nm}}}{A_2} \times 100\% \quad (4)$$

e então as dependências da percentagem de hemólise com a concentração de etanol foram ajustadas a linhas de regressão sigmoidal de acordo com a forma crescente da equação de Boltzmann.

### Análise do efeito do etanol sobre os eritrócitos humanos pela microscopia de luz

Alíquotas de 10 µl de sangue foram adicionados a soluções com 1.56 e 25.0 g.dl<sup>-1</sup> de etanol preparado com 0.9% de NaCl. Após homogeneização e incubação a 37 °C por 10 minutos, as misturas foram adicionadas ao corante May-Grünwald-Giemsa em lâminas histológicas. As lâminas foram analisadas em

um microscópio Olympus (modelo BX40-F4), acoplado a uma câmera Olympus (modelo Oly-200) que envia para o computador as imagens via um acessório acoplado Olympus (U-SPT). As imagens foram processadas com o uso do software HL image ++97.

### **Edição e análise estatística dos dados experimentais**

A edição e avaliação estatística dos dados foram realizadas com o software Origin 6.0 Professional (Microcal, Northampton, Massachusetts, USA). As curvas obtidas foram consideradas estatisticamente aceitáveis quando  $P$  foi menor que 0,05. A comparação dos dados foi realizada pelo teste t Student ou por ANOVA, com  $P < 0,05$  indicando diferença estatisticamente significativa entre as médias.

## RESULTADOS

Todas as amostras de sangue dos voluntários demonstraram um perfil homogêneo para a fragilidade osmótica de seus eritrócitos (Fig. 1).

As lises promovida nos eritrócitos por estresse hipotônico (fragilidade osmótica) e pela ação do etanol em 0,6 e 0,9% de NaCl produziram valores máximos de  $A_{540}$  de  $0,717 \pm 0,000418$ ,  $0,710 \pm 0,000844$  e  $0,696 \pm 0,00217$ , respectivamente. Esses valores não foram estatisticamente diferentes quando comparados por ANOVA ( $P=0,212$ ).

Na presença de 0,9% de NaCl, o aumento na concentração de etanol demonstrou um efeito duplo sobre a percentagem de hemólise do sangue humano (Fig. 2). Entre 9,8 e 12,6 g.dl<sup>-1</sup>, o etanol mostrou um efeito desnaturante sobre a membrana dos eritrócitos, com a liberação de hemoglobina livre na solução. Já entre 19,3 e 22,2 g.dl<sup>-1</sup>, o aumento na concentração de etanol produziu estabilização dos eritrócitos. Contudo, acima de 22,2 g.dl<sup>-1</sup>, o aumento na concentração de etanol promoveu outra transição caracterizada pela liberação de hemoglobina.

O efeito do etanol sobre a estrutura dos eritrócitos humanos foi diretamente observado por microscopia de luz (Fig. 3). Em uma concentração de etanol antes da primeira transição hemolítica da curva da Fig. 2 (1.56 g.dl<sup>-1</sup>), eritrócitos intactos foram detectados em um estado com um maior volume (Fig. 3A). Em torno do centro da região de estabilização da Fig. 2 (25 g.dl<sup>-1</sup>), eritrócitos intactos foram vistos em um estado de menor volume, juntamente com eritrócitos destruídos (Fig. 3B). Esta observação é consistente com um encolhimento osmótico do eritrócito [47,52,55,56,59,60].

Os estados morfológicos com maior e menor volume dos eritrócitos foram respectivamente designados de estados *R* e *T*, por analogia com a designação dos estados usada para as proteínas alostéricas.

As três transições da Fig. 2 foram estudadas na presença de 0,6 e 0,9% de NaCl e ajustadas a curvas sigmoidais (Figs. 4, 5 e 6). A concentração de etanol do ponto médio da primeira transição (Fig. 4), que representa a hemólise do

estado  $R$ , foi designada como  $D_{50R}$ . A concentração de etanol do ponto médio da segunda transição (Fig. 5), que representa a osmoestabilização dos eritrócitos, foi denominada de  $S_{50}$ . A concentração de etanol para o terceiro ponto médio da transição hemolítica (Fig. 6), que representa a hemólise do estado  $T$ , foi designada como  $D_{50T}$ . Os valores de  $D_{50R}$ ,  $S_{50}$  e  $D_{50T}$  na presença de 0,6 e 0,9% de NaCl estão demonstrados na Tabela 1.

Uma vez que o efeito osmoestabilizante do etanol foi descrito por uma sigmóide decrescente, logo seguida por sigmóide crescente, que representa a transição hemolítica do estado  $T$ , a combinação de ambas as sigmóides (decrecente e crescente) produz uma dependência com a forma de um bolso ou buraco (Fig. 2). Essa dependência foi ajustada por uma curva de Gauss invertida. A concentração de etanol no centro dessa curva de Gauss representa o ponto onde o efeito osmoestabilizador do etanol foi o maior possível. Este valor foi determinado em 0,6 e 0,9% de NaCl e também está mostrado na Tabela 1.

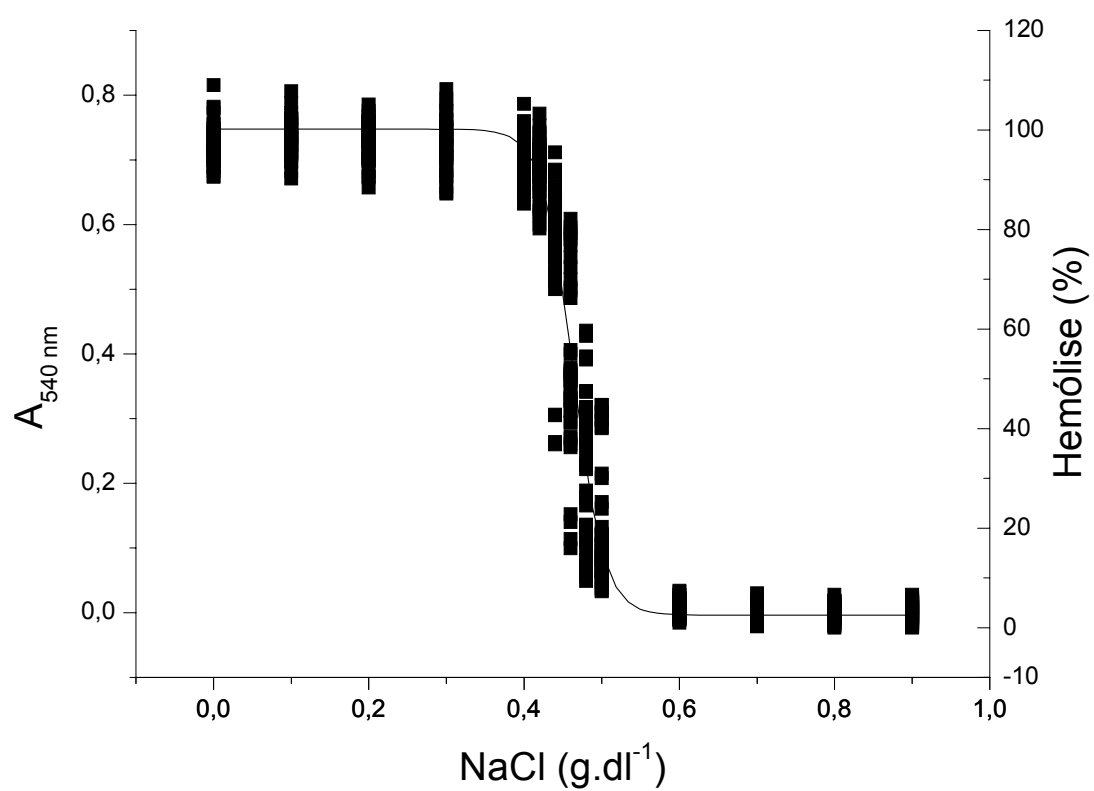


**Figura 1.** Curva representativa da fragilidade osmótica de todas as amostras de sangue usadas neste trabalho.

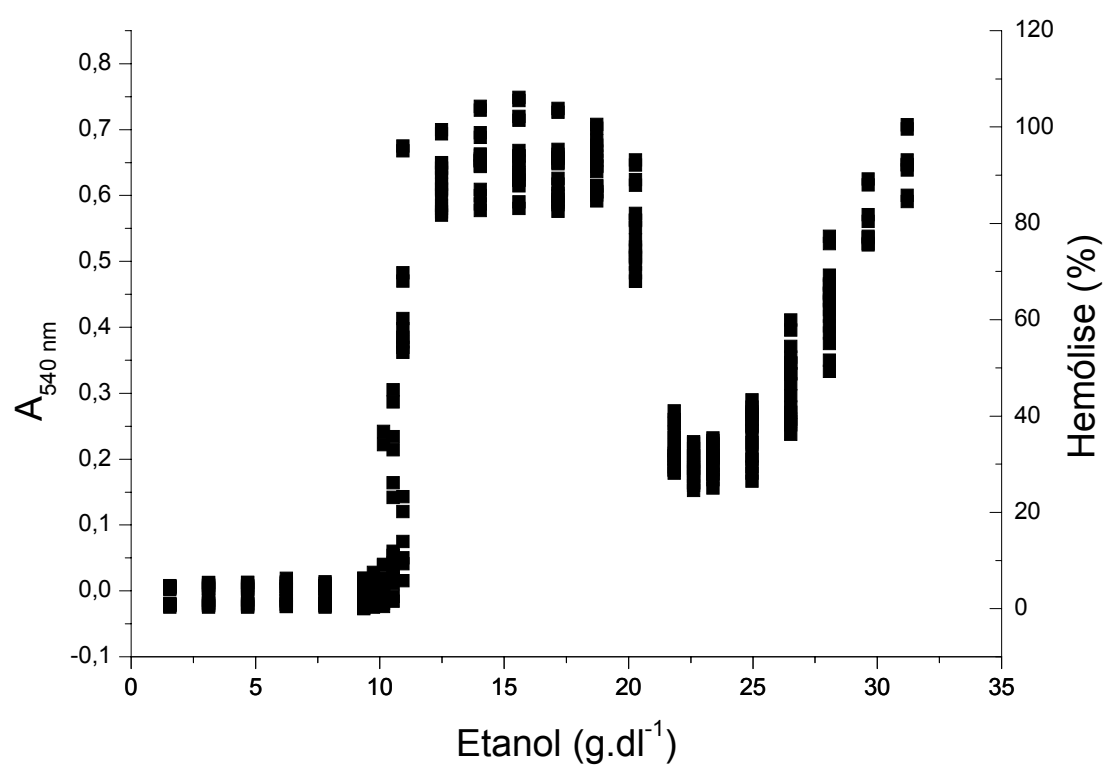


**Figura 2.** Dependência da percentagem de hemólise do sangue humano com a concentração de etanol em 0,9% de NaCl.

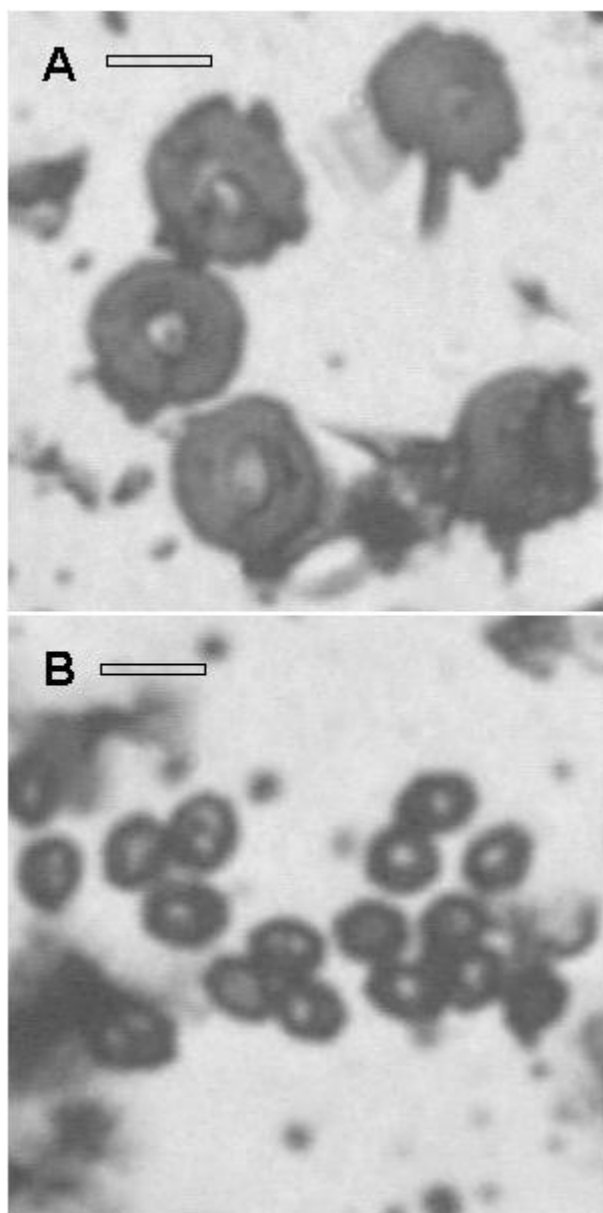


**Figura 3.** Imagens de microscopia de luz dos eritrócitos humanos em solução de 0,9% de NaCl com 1,56 g.dl<sup>-1</sup> (A) e 25,0 g.dl<sup>-1</sup> (B) de etanol. Eritrócitos humanos intactos podem ser vistos em 1.56 g.dl<sup>-1</sup> de etanol (A). Eritrócitos humanos intactos, mas desidratados, podem ser vistos em 25.0 g.dl<sup>-1</sup> de etanol, juntamente com alguns eritrócitos destruídos (B). A barra de magnificação em cada micrografia representa 8 μm.

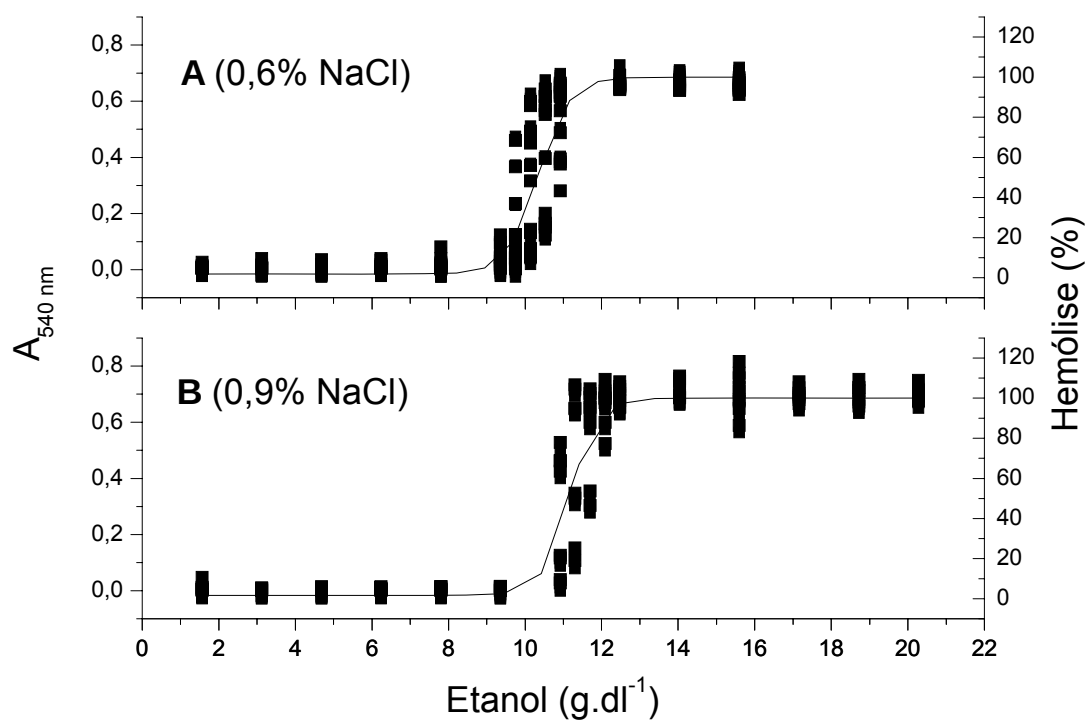


**Figura 4.** Hemólise do estado *R* dos eritrócitos humanos induzida pelo etanol em 0,6 (A) e 0,9% de NaCl (B).

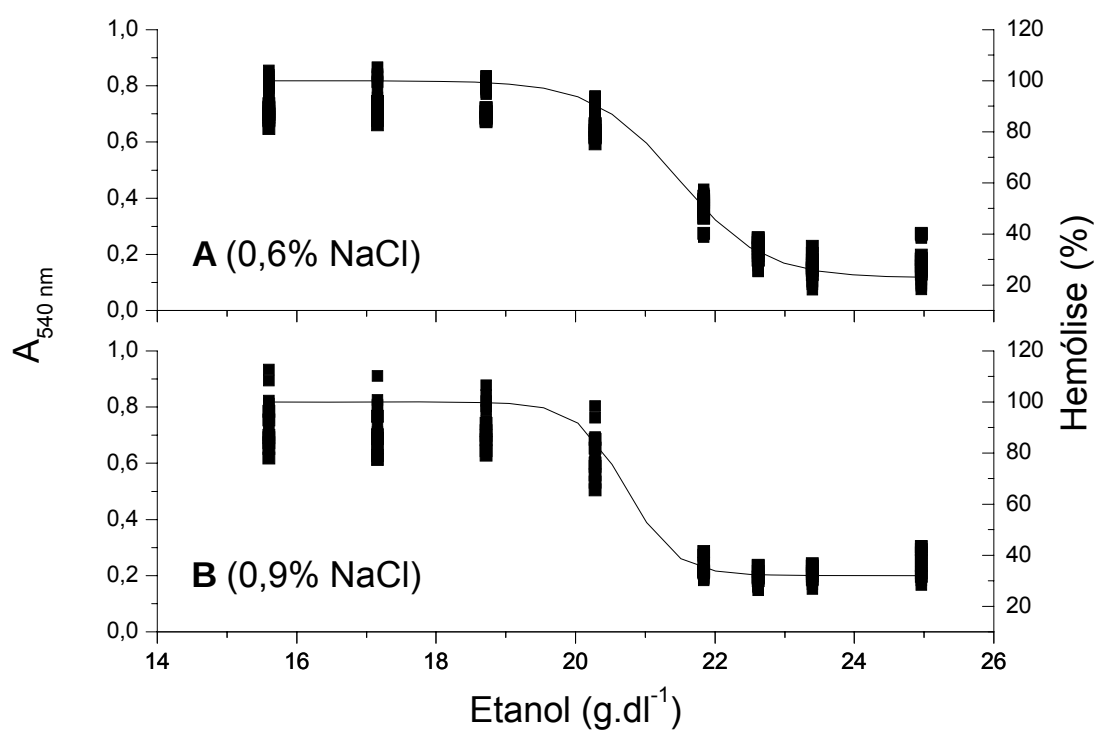


**Figura 5.** Transição de estabilização dos eritrócitos humanos pelo aumento da concentração de etanol em 0,6 (A) e 0,9% de NaCl (B).

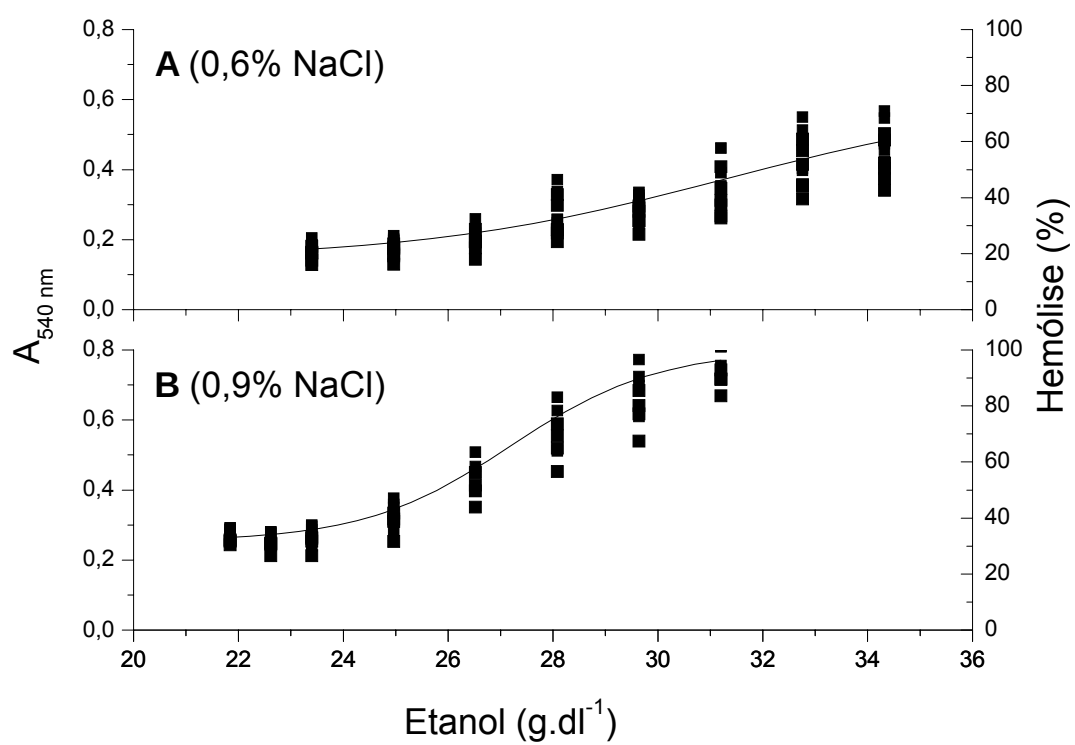


**Figura 6.** Hemólise do estado *T* dos eritrócitos humanos induzida pelo etanol em 0,6 (A) e 0,9% de NaCl (B).

**Tabela 1.** Caracterização dos efeitos desnaturante e osmoestabilizante do etanol sobre eritrócitos humanos.

| Parâmetros (g.dl <sup>-1</sup> )   | 0,9% NaCl   | 0,6% NaCl   | <i>P</i> |
|------------------------------------|-------------|-------------|----------|
| D <sub>50R</sub>                   | 11,17±0,078 | 10,35±0,250 | <0,001   |
| S <sub>50T</sub>                   | 20,73±0,056 | 21,48±0,034 | <0,001   |
| D <sub>50T</sub>                   | 27,20±0,097 | 31,27±1,490 | <0,050   |
| Centro da curva invertida de Gauss | 22,80±0,171 | 24,30±0,169 | <0,001   |

## DISCUSSÃO

A mistura de concentrações elevadas de etanol com solução salina aquosa é capaz de diminuir progressivamente a constante dielétrica do meio e aumentar a magnitude das forças atrativas entre as cargas opostas, mas também de diminuir a intensidade da força hidrofóbica, com atenuação das forças atrativas de van der Waals. Até certa concentração (Fig. 2), este efeito não perturba a estabilidade dos eritrócitos, uma vez que a percentagem de hemólise não mudou com o aumento na concentração de etanol. Em baixas concentrações o etanol é considerado um agente protetor dos eritrócitos contra a hemólise hipotônica [62]. Realmente, na presença de  $1,56 \text{ g.dl}^{-1}$  de etanol, os eritrócitos foram vistos completamente intactos, quando observados por microscopia de luz (Fig. 3A). O progressivo aumento na concentração de etanol determina mudanças progressivas nas propriedades da fase externa da solução mas também do interior das estruturas celulares onde estão incluídas proteínas de membrana e do citoesqueleto dos eritrócitos [49,50,60].

Já que o etanol tem um grupo hidrofílico (-OH), que pode estabelecer ligações de hidrogênio com a água, e um grupo hidrofóbico, (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) que realiza contatos de van der Waals com outros grupos hidrofóbicos, o aumento na concentração de etanol em uma solução aquosa gera uma competição entre o grupo hidrofóbico do etanol e outros grupos hidrofóbicos do interior do complexo biológico. Com o etanol no meio externo, os grupos hidrofóbicos do complexo biológico podem agora formar forças atrativas estáveis de van der Waals com o etanol na fase externa da solução. O aumento na concentração de etanol promoveu uma desnaturação de eritrócitos de natureza cooperativa e dependente da concentração de etanol, que foi monitorada pela liberação de hemoglobina na solução (Fig. 4A).

A preservação da integridade dos eritrócitos em  $0,9 \text{ g.dl}^{-1}$  de NaCl não é um fenômeno baseado somente na osmolaridade do meio, mas dos efeitos elétricos do soluto para manter íntegra a membrana celular. A hipotonicidade também pode desnaturar eritrócitos, promovendo liberação cooperativa de hemoglobina para o meio externo, como pode ser observado pela dependência da

curva sigmóide entre a hemólise e a concentração de sal (Fig. 1). A combinação da hipotonicidade com a presença do etanol possibilitou evidenciar a geração de um sinergismo caotrópico sobre o eritrócito, o que explica a diminuição estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) de 11,16 para 10,35 g.dl<sup>-1</sup> observada no ponto de meia transição ( $D_{50R}$ ) do etanol com a mudança na concentração salina de 0,9 (Fig. 4B) para 0,6% (Fig. 4A), respectivamente (Tabela 1). Já que a diminuição na concentração salina de 0,9 (Fig. 4B) para 0,6% (Fig. 4A) aumentou a ação caotrópica da mistura, este efeito não é um processo baseado na osmolaridade.

Acima de 19,3 g.dl<sup>-1</sup> de etanol, a percentagem de hemólise começou a diminuir com o aumento na concentração de etanol, dando origem à curva de dependência na forma de cavidade ou bolso da Figura 2. Esse efeito do etanol constitui uma proteção para a membrana, já que eritrócitos intactos foram vistos em solução de 25,0 g.dl<sup>-1</sup> de etanol por microscopia de luz, embora na presença de algumas células hemolisadas (Fig. 3B).

Há uma mudança morfológica evidente dos eritrócitos de 1,56 (Fig. 3A) para 25,0 g.dl<sup>-1</sup> de etanol (Fig. 3B). À menor concentração de etanol (Fig. 3A), os eritrócitos estão mais volumosos do que estão à concentração mais elevada deste soluto (Fig. 3B). Por analogia com o equilíbrio  $R$ - $T$  das proteínas, nós designamos aqueles estados morfológicos dos eritrócitos como  $R$  (de relaxado) e  $T$  (de contraído, no inglês), respectivamente. Há provavelmente muitas formas ou formatos em cada um destes dois estados morfológicos, mas nós iremos considerar os dois estados principais,  $R$  e  $T$ , para simplificar nossas considerações. A multiplicidade das formas em cada estágio existe em função da composição do meio. Realmente, a incubação de eritrócitos humanos com alcanóis, alcanodióis e glicerol produz muitas alterações de forma [62].

O efeito da concentração salina sobre o processo de estabilização é muito importante para caracterizar a origem do efeito estabilizador. Uma observação detalhada na parte esquerda da cavidade mostra que ela consiste de uma curva sigmoidal decrescente. A inclinação da parte linear desta curva diminui com o decréscimo da concentração salina de 0,9 (Fig. 5B) para 0,6% (Fig. 5A). Em outras palavras, nós podemos dizer que o aumento na concentração salina de 0,6

(Fig. 5A) para 0,9% (Fig. 5B) potencializa o efeito estabilizador. As concentrações de etanol no ponto médio da transição de estabilização ( $S_{50}$ ), representadas pelo lado esquerdo do bolso de estabilização, foram determinadas em 0,9 (Fig. 5B) e 0,6% NaCl (Fig. 5A). Realmente, o aumento em  $S_{50}$  produzido pelo decréscimo da concentração salina de 0,9 para 0,6% de NaCl (Tabela 1) foi estatisticamente significativo ( $P<0,05$ ). Isso significa que esse efeito estabilizador é um processo baseado na osmolaridade do meio.

Por outro lado, quando nós inspecionamos a parte direita do bolso de estabilização da curva de lise dos eritrócitos (Fig. 6), nós detectamos que o efeito caotrópico do etanol sobre o estado mais estável dos eritrócitos ( $T$ ) é enfraquecido e não fortalecido pela diminuição na concentração de NaCl de 0,9 (Fig. 6B) para 0,6% (Fig. 6A). Realmente, a diminuição na concentração de sal de 0,9 para 0,6% de NaCl produziu um aumento estatisticamente significativo ( $P<0,05$ ) no valor de  $D_{50}$  para o estado  $T$  dos eritrócitos (Tabela 1). Já que a lise deste estado  $T$  ocorreu em uma alta concentração de etanol quando a concentração de sal é baixa, diferentemente da lise do estado  $R$ , isto significa que a desnaturação do estado  $T$  dos eritrócitos é também um processo baseado na osmolaridade.

A dispersão de dados no lado direito do bolso de estabilização não é devida a diferenças nos níveis de hemoglobina e hematócrito dos voluntários, porque a conversão dos valores de absorvância em percentagem de hemólise normaliza qualquer discrepância existente entre os voluntários. Aquela dispersão pode ser consequência de algum tipo de heterogeneidade no estado  $T$  dos eritrócitos entre indivíduos, provavelmente relacionada com diferenças na composição da membrana.

Nós acreditamos que esse efeito de estabilização dos eritrócitos seja uma manifestação celular da estabilização produzida por osmólitos no equilíbrio de desenovelamento de proteínas. Os osmólitos aumentam a energia livre dos estados nativo ( $N$ ) e desenovelado ( $U$ ) de uma proteína, mas aumentam mais a energia livre do estado  $U$  do que do  $N$  da proteína. A explicação mais aceita para este fenômeno termodinâmico é baseada na interação preferencial da proteína com as moléculas de água do que com o osmólito [35], que é então

preferencialmente excluído da superfície da proteína, de acordo com um efeito que foi designado de solvofóbico [20] ou osmofóbico [39]. Os grupos hidrofóbicos [11,12] e o esqueleto peptídico da proteína [28] apresentam uma maior afinidade pela água do que pela mistura água-osmólito. Isso estabelece uma competição entre o osmólito e a proteína para com as moléculas de água, o que aumenta a energia livre de hidratação dos estados  $N$  e  $U$  da proteína. Uma vez que os grupos apolares e o esqueleto peptídeo da proteína estão mais expostos ao solvente no estado  $U$  que no  $N$ , o estado  $U$  é muito mais instabilizado do que o estado  $N$  da proteína. Há uma maior organização das moléculas de água ao redor da superfície do estado  $U$  do que no  $N$  da proteína, o que implica que a entropia conformacional do solvente é maior ao redor do estado  $N$  que do que do estado  $U$ .

Embora ambos os estados sejam desestabilizados pela presença do osmólito, a maior desestabilização do estado  $U$  torna o compacto estado  $N$  relativamente mais estável do que o expandido estado  $U$  da proteína [10-12,20,27,28].

Nós sugerimos que esta explicação, originalmente proposta para justificar a estabilidade de proteínas por osmólitos, possa também explicar a estabilização de eritrócitos por esses solutos. O expandido estado  $R$  dos eritrócitos deve requerer um maior conteúdo de energia livre para sua hidratação e uma menor entropia conformacional na estrutura da água ao redor de sua esfera de hidratação em relação ao condensado estado  $T$  daquelas células. A própria contração do eritrócito, dirigida por uma força baseada na osmolaridade, deve causar aproximação dos grupos hidrofóbicos no lado interno da membrana, com exacerbação das forças atrativas de van der Waals, o que estabiliza o estado  $T$ . O decréscimo da entropia associada com a diminuição da liberdade dos movimentos dos fosfolipídeos da membrana deve ser compensado pelo aumento da entropia conformacional do solvente ao redor do eritrócito no estado  $T$ .

Outros fatores, como a exclusão espacial do osmólito, alterações na constante dielétrica e na viscosidade da solução [29,30,32,34,38,40], considerados importantes na conservação da estabilidade das proteínas, podem

também estar envolvidos na estabilização dos eritrócitos por um osmólito, mesmo que o osmólito seja o etanol.

A situação *in vitro* apresentada em nosso trabalho é somente uma manifestação de um processo físico-químico. Embora proteção contra lise hipotônica de eritrócitos tenha sido reportada para baixas concentrações de etanol [62], nós observamos que a combinação *in vitro* de etanol com uma condição hipotônica diminui a estabilidade das células vermelhas sanguíneas.

Quando ingerido em excesso, o metabolismo do etanol aumenta a produção de metabólitos reativos do oxigênio (ROM), causando peroxidação dos grupos polinsaturados dos ácidos graxos [63,64] das membranas biológicas, o que altera a fluidez das membranas de eritrócitos e hepatócitos [65-69]. A peroxidação do colesterol produz derivados [70] que aumentam a taxa de apoptose nas células musculares lisas de humanos e ratos [71]. Os ROM, usualmente associados com o estresse e envelhecimento, também têm sido associados às mudanças na fluidez de membrana decorrentes do diabetes mellitus do tipo 2 e de outras desordens crônicas degenerativas [72]. A mudança na composição da membrana promovida pelo ROM pode também afetar a estabilidade do eritrócito contra fatores caotrópicos endógenos. Estes fatores endógenos incluem aumentos na pressão arterial, temperatura [47], acidez e atrito contra a parede dos vasos sanguíneos, como ocorre na atividade física [73].

Nós precisamos alertar que a estabilização *in vitro* de eritrócitos pelo etanol, aqui discutida, não pode ser aplicada *in vivo*, porque as concentrações de etanol que promovem o efeito estabilizante são mais de 600 vezes maiores do que as concentrações promotoras de vários danos em nossos complexos biológicos. Uma concentração de etanol entre 0.04 e 0.075% determina efeitos centrais que comprometem as habilidades motoras, a coordenação, o julgamento e o tempo de reposta. Durante a gravidez, o abuso crônico de etanol causa apoptose das células da crista neural do cérebro posterior e do mesênquima craniofacial [74], e mesmo o abuso agudo do etanol gera ectopia, heterotopia e despopulação celular no sistema neural [75].

Outro alerta importante é que o etanol pode ser capaz de preservar contaminantes microbianos se usado para preservar produtos biológicos na faixa de concentração que apresentou o efeito estabilizante descrito neste trabalho.

## CONCLUSÕES

Concluimos que eritrócitos foram vistos em um estado intacto e expandido (*R*) em 1,56 g.dl<sup>-1</sup> de etanol e em um estado contraído (*T*) em 25,0 g.dl<sup>-1</sup> de etanol, embora algumas estruturas tenham aparecido rompidas a esta concentração de etanol. Três transições sigmoidais foram observadas na faixa de 0 a 34 g.dl<sup>-1</sup> de etanol: uma desnaturação, uma estabilização e outra transição de desnaturação, com seus respectivos pontos médios em 11,17±0,078 (*D*<sub>50R</sub>), 20,73±0,056 (*S*<sub>50</sub>) e 27,20±0,097 g.dl<sup>-1</sup> (*D*<sub>50T</sub>) de etanol em 0,9% de NaCl. A incubação com 0,6% de NaCl alterou os valores de *D*<sub>50R</sub>, *S*<sub>50</sub> e o *D*<sub>50T</sub> para 10,35±0,25 (*P*<0,001), 21,48±0,034 (*P*<0,001) e 31,27±1,490 (*P*<0,05) g.dl<sup>-1</sup>, respectivamente. A significativa diminuição produzida no *D*<sub>50R</sub> pelo decréscimo da concentração de NaCl indica que esta transição de desnaturação é devida somente à ação caotrópica do etanol. O aumento significativo produzido em *S*<sub>50</sub> indica que a estabilização da transição é devida à ação osmoestabilizadora do etanol.

## REFERÊNCIAS

- [1] H. Neurath, J.P. Greenstein, F.W. Putnam, J.O. Erickson, The chemistry of protein denaturation, Chem. Rev. 34 (1944) 157-265.
- [2] Y. Nozaki, C. Tanford, The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions, J. Biol. Chem. 238 (1963) 4074-4081.
- [3] C. Tanford, Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solution, J. Am. Chem. Soc., 86 (1963) 2050-2059.
- [4] C. Tanford, Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation, Adv. Protein Chem. 24 (1970) 1-95.
- [5] J.A. Schellman, Fifty years of solvent denaturation, Biophys. Chem. 96 (2002) 91-101.
- [6] B.J. Bennion, V. Daggett, The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 5142-5147.
- [7] A.D. Brown, J.R. Simpson, Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols, J. Gen. Microbiol. 72 (1972) 589-591.
- [8] L.J. Borowitzka, A.D. Brown, The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga, *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute, Arch. Microbiol. 96 (1974) 37-52.
- [9] R.D. Bowlus, G.N. Somero, Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates, J. Exp. Zool. 208 (1979) 137-151.
- [10] J.C. Lee, S.N. Timasheff, The stabilization of protein by sucrose, J Biol Chem 256 (1981) 7193-7201.

- [11] K. Gekko, S.N. Timasheff, Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures, *Biochemistry* 20 (1981) 4667-4676.
- [12] K. Gekko, S.N. Timasheff, Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol, *Biochemistry* 20 (1981) 4677-4686.
- [13] P.H. Yancey, M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus, G. Somero, Living with water stress: evolution of osmolyte systems, *Science* 21 (1982) 1214-1222.
- [14] K. Gekko, S. Koga, The stability of protein structure in aqueous propylene glycol. Amino acid solubility and preferential solvation of protein, *Biochim. Biophys. Acta* 786 (1984) 151-160.
- [15] T. Arakawa, S.N. Timasheff, The stabilization of proteins by osmolytes, *Biophys. J.* 47 (1985) 411-414.
- [16] P.H. Yancey, Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes, in: R. Gilles, M. Gilles-Baillien (Eds.), *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation*, Springer-Verlag, New York, 1985, pp: 424-436.
- [17] S. Bagnasco, R. Balaban, H.M. Fales, Yang, Y. Burg, M. Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 5872-5877.
- [18] G.N. Somero, From dogfish to dog: trimethylamines protect proteins from urea, *New Physiol. Sci.* 1 (1986) 9-12.
- [19] G.N. Somero, Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function, *Am. J. Physiol.* 251 (1986) R197-R213.
- [20] S.N. Timasheff, T. Arakawa, Stabilization of protein structure by solvents, in: *Protein Structure: a Practical Approach*, T. E. Creighton (Ed.), IRL Press, Oxford, 1989, pp. 331-345.
- [21] R. Jaenicke, P. Závodsky, Proteins under extreme physical conditions, *FEBS Letters* 268 (1990) 344-349.

- [22] P.H. Yancey, M.B. Burg, Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. *Am J Physiol* 258 (1990) R198-R204.
- [23] A. Garcia-Perez, M.B. Burg, Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells, *Hypertension* 16 (1990) 595-602.
- [24] D. Nikolopoulos, Y. Manetas, Compatible solutes and *in vitro* stability of *salsola soda* enzymes: proline incompatibility, *Phytochemistry* 30 (1991) 411-413.
- [25] D.P. Peterson, K.M. Murphy, R. Ursino, K. Streeter, P.H. Yancey, Effects of dietary proteins and salt on rat renal osmolytes: covariation in urea and GPC contents, *J Physiol* 263 (1992) 594-600.
- [26] M.M. Santoro, Y. Liu, S.M.A. Khan, L.X. Hou, D.W. Bolen, Increase thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes, *Biochemistry* 31 (1992) 5278-5283.
- [27] S.N. Timasheff, The control of proteins stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22 (1993) 67-97.
- [28] Y. Liu, D.W. Bolen, The peptide backbone plays a dominant role in proteins stabilization by naturally occurring osmolytes, *Biochemistry* 34 (1995) 12884-12891.
- [29] L.S. Taylor, P. York, A.C. Williams, H.G.M. Edwards, C. Mehta, G.S. Jackson, I.G. Badcoe, A.R. Clarke, Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent, *Biochim Biophys Acta*, 1253 (1995) 39-46.
- [30] A. Wang, A.D. Robertson, D.W. Bolen, Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A, *Biochemistry* 34 (1995) 15096-15104.

- [31] K.B. Storey, D.D. Mosser, D.N. Douglas, J.E. Grundy, J.M. Storey, Biochemistry below 0 degrees C: nature's frozen vertebrates, *Braz J Med Biol Res* 29 (1996) 283-307.
- [32] A. Wang, D.W. Bolen, A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation, *Biochemistry*, 36 (1997) 9101-9108.
- [33] V. Rishi, F. Anjum, F. Ahmad, W. Pfeil, Role of non-compatible osmolytes in the stabilization of proteins during heat stress, *Biochem. J.* 329 (1998) 137-143.
- [34] Y. Qu, C.L. Bolen, D.W. Bolen. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein, *Proc. Natl Acad Sci. USA* 95 (1998) 9268-9273.
- [35] S.N. Timasheff, Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated, *Adv. Protein Chem.* 51 (1998) 355-433.
- [36] S.N. Timasheff, In disperse solution, "osmotic stress" in a restricted case of preferential interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 7363-7367.
- [37] R. Rodrigues-Silva, G.G.C. Antunes, D.T. Velarde, M.M. Santoro, Thermal stability of hyperimmune horse antivenoms, *Toxicon* 37 (1999) 33-45.
- [38] A.J. Saunders, P.R. Davis-Searles, D.L. Allen, G.J. Pielak, D.A. Erie, Osmolyte induced changes in protein conformational equilibria, *Biopolymers*, 53 (2000) 293-307.
- [39] D.W. Bolen, I.V. Baskakov, Review: the osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding, *J. Mol. Biol.* 310 (2001) 955-963.
- [40] P.H. Yancey, Water stress, osmolytes and proteins, *Am. Zool.* 41 (2001) 699-709.

- [41] D.K. Hinch, M. Hagemann, Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms, *Biochem. J.* 383 (2004) 277-283.
- [42] S. Moelbert, B. Normand, P. De Los Rios, Kosmotropes and chaotropes: modelling exclusion, binding and aggregate stability, *Biophys. Chem.* 112 (2004) 45-57.
- [43] L. C., Fonseca, N.C.R Corrêa, M.S. Garrote-Filho, C.C. Cunha, N. Penha-Silva, Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous solutions, *Química Nova* 29 (2006) 543-548.
- [44] N. Jovanovic, A. Bouchard, G.W. Hofland, G.J. Witkamp, D.J.A. Crommelin, W. Jiskoot, Distinct effect of sucrose and trehalose on protein stability during supercritical fluid drying and freeze-drying, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 27 (2006) 336-345.
- [45] Y. Nozaki, C. Tanford, The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 2211-2217.
- [46] G. Castronuovo, V. Elia, C. Postiglione, F. Velleca, Interactions of aminoacids in concentrated aqueous solutions of urea or ethanol. Implications for the mechanism of protein denaturation, *Thermochim Acta* 339 (1999) 11-19.
- [47] J. R. Lepock, H.E. Frey, H. Bayne, J. Markus, Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta.* 980 (1989) 191-201.
- [48] B.G. Vertessy, T.L. Steck, Elasticity of the human red cell membrane skeleton. Effects of temperature and denaturants, *Biophys. J.* 55 (1989) 255-262.
- [49] L.-M. Chi, W.-G. Wu, Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol, *Biochem. Biophys. Acta.* 1062 (1991) 46-50.

- [50] J.B. Zavodnik, T.P. Piletskaia, H. Stepuro, Kinetics of ethanol-induced lysis of human erythrocytes, *Biofizika*, 39 (1994) 1033-1039.
- [51] S. Svetina, D. Kuzman, R.E. Waugh, P. Ziherl, B. Zeks, The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells, *Bioelectrochemistry* 62 (2004) 107-113.
- [52] T. Betz, U. Bakowsky, M.R. Müller, C.-M. Lehr, I. Bernhardt, Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells, *Bioelectrochemistry* XX (2006) XXX-YYY [Epub ahead of print].
- [53] R. Usha, R. Maheshwari, R., A. Dhathathreyan, T. Ramasami, Structural influence of mono and polyhydric alcohols on the stabilization of collagen, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 48 (2006) 101-105.
- [54] P. Boutron, F. Arnaud, Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol, *Cryobiology* 21 (1984) 348-358.
- [55] C. Pellerin-Mendes, L. Million, M. Marchand-Arvier, P. Labrude, C. Vigneron, In vitro study of the effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen, *Cryobiology* 35 (1997) 173-186.
- [56] F. Lang, G.L. Busch, M. Ritter, H. Völkl, S. Waldegger, E. Gulbins, D. Häussinger, Functional significance of cell volume regulatory mechanisms, *Phys. Rev.* 78 (1998) 247-306.
- [57] C. T. Wagner, M.L. Martowicz, S. A. Livesey, J. Connor, Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation, *Cryobiology* 45 (2002) 153-166.
- [58] K.L. Scott, J. Lecak, J.P. Acker, Biopreservation of red blood cells: past, present, and future, *Transfus. Med. Rev.* 19 (2005) 127-142.
- [59] R. De Loecker, W. Gossens, V. van Duppen, R. Verwilghen, W. De Loecker, Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer, *Cryobiology* 30 (1993) 279-285.

- [60] I.B. Bakaltcheva, C.O. Odeyale, B.J. Spargo, Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis, *Biochim Biophys Acta* 1280 (1996) 73-80.
- [61] G. Xie, S.N. Timasheff, The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose, *Biophys. Chem.* 64 (1997) 25-43.
- [62] P. Seeman, S. Roth, H. Schneider, The membrane concentrations of alcohol anesthetics, *Biochim. Biophys. Acta* 225 (1971) 117-184.
- [63] R. Senthilkumar, M. Sengottuvelan, N. Nalini, Protective effect of glycine supplementation on the levels of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the erythrocyte of rats with alcohol induced liver injury, *Cell Biochem. Funct.* 22 (2004) 123-128.
- [64] J. Koska, P. Blazicek, M. Marko, J.D. Grna, R. Kvetnansky, M. Vigas, Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans, *Physiol. Res.* 49 (2000), S95-S100.
- [65] O.V. Tyulina, M.J. Huentelman, V.D. Prokopieva, A.A. Boldyrev, P. Johnson, Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis?, *Biochim. Biophys. Acta.* 1535 (2000) 69-77.
- [66] F. Marotta, P. Safran, H. Tajiri, G. Princess, H. Anzulovic, G.M. Ideo, A. Rouge, M.G. Seal, G. Ideo, Improvement of hemorheological abnormalities in alcoholics by an oral antioxidant, *Hepato-Gastroenterology.* 48 (2001) 511-517.
- [67] C. Lindi, G. Montorfano, P. Marciani, Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake, *Alcohol* 16 (1998) 311-316.
- [68] T.C. Chan, D.V. Godin, M.C. Sutter, Erythrocyte membrane properties of the chronic alcoholic rat, *Drug. Alcohol Depend.* 12 (1983) 249-257.
- [69] K. Araki, J.M. Rifkind, The rate of osmotic hemolysis: a relationship with membrane bilayer fluidity, *Biochim. Biophys. Acta.* 645 (1981) 81-91.

- [70] J. Adachi, M. Asano, Y. Ueno, O. Niemelä, K. Ohlendieck, T.J. Peters, V.R.J. Preedy, Alcoholic muscle disease and biomembrane perturbations, *J. Nutr. Biochem.* 14 (2003) 616-625.
- [71] G. Lizard, S. Monier, C. Cordelet, L. Gesquiere, V. Deckert, S. Gueldry, L. Lagrost, P. Gambert, Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 1190-1200.
- [72] M. Paramahamsa, S. Aparna, N. Varadacharyulu. Alcohol induced alterations in blood and erythrocyte membranes in diabetics. *Alcohol Alcohol.* 37 (2002) 49-51.
- [73] P.L. Mcneil, R.A. Steinhardt, Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity, *J. Cell Biol.* 137 (1997) 1-4.
- [74] M.M. Cartwright, S.M. Smith, Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol-exposed embryos: partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 19 (1995) 378-386.
- [75] T.A.A. Ferreira, N.R. Ferreira, N. Penha-Silva, Effects of acute prenatal exposure to ethanol on the postnatal morphology of the prefrontal cortex in Wistar rats. *Braz. J. Morphol. Sci.* 21 (2004) 99-103.