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

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CINÉTICA DE LISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Estudante: **Lucas Moreira Cunha**

UBERLÂNDIA, MG

2013

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

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CINÉTICA DE LISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Estudante: **Lucas Moreira Cunha**
Orientador: Dr. **Nilson Penha-Silva**
Co-orientador: Dr. **Morun Bernadino Neto**

Tese 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

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C972i Cunha, Lucas Moreira, 1986-
2013 Investigação da associação entre cinética de lise em eritrócitos humanos, parâmetros bioquímicos e hematológicos / Lucas Moreira Cunha. -- 2013.
77 f. : il.

Orientadora Nilson Penha Silva.
Coorientador: Morun Bernardino Neto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Cinética química. - Teses. 3. Eritrocitos - Teses. I. Silva, Nilson Penha. II. Bernadino Neto, Morun. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Palavras-chave: Eritrócito, termodinâmica, cinética, lise, envelhecimento

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

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CINÉTICA DE LISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Estudante: **Lucas Moreira Cunha**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:	Prof. Dr. **Nilson Penha-Silva**	[UFU]
Examinador:	Prof. Dr. Carlos Henrique Alves de Rezende	[UFU]
Examinador:	Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho	[UFU]

Data da defesa: **29/07/2013**

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

Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**

(Orientador)

DEDICATÓRIA

A todos os meus familiares;

Em especial aos meus pais, Ayrton Rodrigues da Cunha e Chirlei de Fátima Cunha,

e minha irmã Caroline Moreira Cunha;

A todos os meus amigos;

A todos os professores que tive ao longo desta caminha.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meu caminho e me amparar nos momentos difíceis, me dando forças para superar as dificuldades e obstáculos.

A todos os meus familiares, pelo carinho, paciência, incentivo e por sempre estarem do meu lado, até mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, professor Nilson Penha-Silva, que me estendeu a mão e me deu oportunidade de ao seu lado aprender a verdadeira essência da pesquisa, com participação decisiva nesta minha formação.

Em especial, eu gostaria de agradecer ao meu pai, Ayrton Rodrigues da Cunha (*in memorian*), por sempre ter sido um grande incentivador de toda esta minha caminhada. Quero deixar aqui um agradecimento especial também à minha mãe, Chirlei de Fátima Cunha. Agradeço também minha irmã, Caroline Moreira da Cunha, pelo apoio incondicional durante esta trajetória, sempre acreditando na minha vitória.

A todos os amigos que fizeram parte desses momentos, sempre me ajudando a enfrentar os obstáculos e desfrutar os momentos felizes de cada conquista.

A todos os amigos do Laboratório de Biofisicoquímica, pelo companheirismo e pela ajuda e conhecimentos compartilhados ao longo deste período.

APOIO

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU)

SUMÁRIO

Página

Abreviaturas viii

Lista de Figuras x

Lista de Tabelas xi

Resumo 1

Abstract 3

Apresentação 5

Capítulo 1 [FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA] 7

Composição e estrutura de complexos biológicos 8

Estabilidade das membranas biológicas 9

Composição e estabilidade de eritrócitos 11

Análise da estabilidade de membranas de eritrócitos 12

Cinética enzimática de Michaelis-Menten 15

Considerações finais 18

Referências 27

Capítulo 2 [Investigação da associação entre cinética de lise em eritrócitos humanos, parâmetros bioquímicos e hematológicos**]** 34

Resumo 35

Abstract 37

Introdução 39

Material e métodos 41

Resultados 44

Discussão 52

Conclusões 55

Referências 56

ABREVIATURAS

A	Absorvância
$A_{540\ nm}$	Absorvância em comprimento de onda de 540 nm
AE1	Anion exchanger 1
A_{max}	Absorvância com percentual máximo de hemólise
A_{min}	Absorvância com percentual mínimo de hemólise
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
dX	Variação na concentração de NaCl capaz de promover 100% de hemólise
FOE	Fragilidade osmótica de eritrócitos
Glu	Glicose
H_{50}	Hipotonicidade capaz de provocar 50% de hemólise
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
Ht	Hematócrito
K_M	Constante de meia saturação de uma enzima
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
RBC	Células vermelhas sanguíneas
RDW	Distribuição de volume das células vermelhas do sangue
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Salina	Solução de NaCl a 0,9 g/dL
SFA	Ácido graxo saturado
T	Tempo
$t_{1/2}$	Tempo transcorrido para ocorrência de metade da lise total
t-C	Colesterol total plasmático
TG	Triglicérides
UFA	Ácido graxo insaturado

VCM	Volume corpuscular médio
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade
V_{max}	Velocidade máxima da reação enzimática
V_o	Velocidade inicial da reação enzimática

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Ilustração da influência da composição lipídica (teor de colesterol, ácidos graxos saturados e insaturados) e do calor sobre a estabilidade e a funcionalidade de uma membrana biológica	19
Figura 1.2	Representação esquemática das proteínas de membrana e do citoesqueleto de um eritrócito	20
Figura 1.3	Representação típica de uma curva de lise hipotônica de eritrócitos humanos, obtida por regressão sigmoidal entre os valores de absorvância a 540 nm e a concentração de NaCl da solução	21
Figura 1.4	Gráfico ilustrativo do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação enzimática, com representação das constantes cinéticas de Michaelis-Menten (V_{max} e K_M)	22
Figura 1.5	Dependência da formação de produto com o tempo em uma reação de catálise enzimática. A inclinação da porção linear inicial da curva corresponde à velocidade inicial (v_0) da catálise	23
Figura 1.6	Representação gráfica do método de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_M e V_{max})	24
Figura 1.7	Representação gráfica do método de Hanes-Woolf para determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_M e V_{max})	25
Figura 1.8	Representação gráfica do método de Eadie-Hofstee para determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_M e V_{max})	26
Figura 2.1	Cinética de hemólise em diferentes concentrações salinas (0,30; 0,35; 0,40 e 0,50 g/dL NaCl)	46
Figura 2.2	Cinética de hemólise a 0,4 g/dL de NaCl de quatro participantes do estudo, com variação nos valores de A_{max} e de $t_{1/2}$	47
Figura 2.3	Variação da cinética de hemólise de um participante jovem (23 anos) em relação a um participante idoso (86 anos)	48

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 2.1	Estatística descritiva dos dados experimentais coletados na população de estudo	49
Tabela 2.2	Comparação dos grupos etários em relação às variáveis cinéticas, hematológicas e bioquímicas (média ± desvio-padrão)	50
Tabela 2.3	Matriz de correlação (Spearman) e significância entre os pares de variáveis	51

RESUMO

[**Investigação da associação entre cinética de lise em eritrócitos humanos, parâmetros bioquímicos e hematológicos]**

A análise da estabilidade de membrana de eritrócito é feita em incubação a uma dada temperatura, por tempo fixo, e se baseia na quantidade de lise existente em função da diminuição na concentração de sal ou aumento na concentração de um agente desnaturante. As constantes de lise derivadas desta análise são de natureza termodinâmica, uma vez que representam uma situação de equilíbrio após um tempo suficientemente longo, embora a lise seja um processo muito rápido. As constantes de estabilidade de eritrócitos são válidas para análise de agentes moduladores que têm influência sobre esse equilíbrio, mas não daquelas que têm influência sobre a cinética de lise. Este trabalho desenvolveu condições experimentais para análise da cinética de lise de eritrócitos, não por monitoração em tempo real, mas por monitoração espectrofotométrica a 540 nm após interrupção da lise por hipertonicidade em intervalos pré-determinados de tempo. A cinética de lise foi estudada na região intermediária de salinidade (de 0,3 a 0,5 g/dL de NaCl) da curva de lise em tempo fixo. A concentração de 0,4 g/dL de NaCl permitiu uma melhor definição da cinética de lise e foi então usada na avaliação da cinética de lise de eritrócitos de 17 doadores. A curva de lise em função do tempo foi estatisticamente ajustada a uma hipérbole, usando a rotina de análise do modelo cinético integrado (que tem a mesma equação que o modelo de Michaelis-Menten na forma não integrada), o que permitiu a determinação do tempo de meia lise dos eritrócitos ($t_{1/2}$) e da máxima absorvância (A_{max}) atingida no ensaio. Os resultados apresentaram boa variância entre os doadores. A existência de associação entre essas constantes e as variáveis hematimétricas, glicemia e lipidemia dos doadores foi analisada por correlação de Spearman. A constante $t_{1/2}$ mostrou associação significante negativa com os valores de colesterol total (t-C) e LDL-C. A variável A_{max}, como era de se esperar, apresentou associações significantes com as variáveis hematológicas que estão sob a influência dos níveis de hemoglobina. A estratificação da população de estudo em duas faixas etárias (18-30 e 40-90 anos) mostrou que os valores de $t_{1/2}$ foram significantemente menores na população mais velha. Embora a população estudada tenha sido bem reduzida, esse trabalho mostra

que a utilização de um foco cinético na abordagem físico-química da lise de eritrócitos é bastante promissora para analisar a miríade de variáveis que tem influência sobre a membrana do eritrócito.

Palavras-chave: Eritrócito, termodinâmica, cinética, lise, envelhecimento

ABSTRACT

[**Investigation of the association between lysis kinetics of human erythrocytes and biochemical and hematological parameters**]

The analysis of the stability of the erythrocyte membrane is done under incubation at a given temperature for a fixed time, and is based on the amount of existing lysis a result of diminishing in the salt concentration or increased concentration of a denaturing agent. The lysis constants derived from this analysis are of a thermodynamic nature, since they represent an equilibrium situation after a sufficiently long time, although lysis is a very rapid process. These stability constants are valid for the analysis of modulating agents that influence on this equilibrium, but not those who have influence on the kinetics of lysis. This work has developed experimental conditions for the kinetic analysis of the lysis of erythrocytes not by monitoring in real time, but by spectrophotometric monitoring at 540 nm after an interruption of the lysis by hypertonicity at predetermined intervals of time. The kinetics of lysis was studied in the intermediate region of salt concentration (from 0.3 to 0.5 g/dL NaCl) of the hemolysis curve in conditions of fixed time incubation. The concentration of 0.4 g/dL NaCl led to a better definition of the lysis kinetics and was then used to evaluate the kinetics of lysis of erythrocytes from 17 donors that participated of the study. The lysis curve as a function of time was statiscally fitted to a hyperbola, using the analytical routine of the integrated kinetic model (which has the same equation as the Michaelis-Menten model in non-integrated form), allowing the determination of the time required to promote lysis of half of the population of erythrocytes ($t_{1/2}$) and the maximum absorbance (A_{max}) reached in the test. The results showed good variance among donors. The association between these constants and hematologic variables, blood glucose and blood lipid was analyzed by Spearman correlation. The constant $t_{1/2}$ was negatively correlated with total cholesterol (t-C) and LDL-C. The variable A_{max}, as it was expected, showed significant associations with hematologic variables that are under the influence of hemoglobin levels. Stratification of the study population into two age groups (18-30 and 40-90 y) showed that the values of $t_{1/2}$ were significantly lower in the older population. Although the population studied has been too small, this study showed that using a kinetic focus in the physico-

chemical approach of the RBC lysis is very promising for analyzing the myriad of variables which have influence on the erythrocyte membrane.

Keywords: erythrocyte, thermodynamics, kinetics, lysis, aging

APRESENTAÇÃO

As membranas celulares assim como as proteínas e ácidos nucleicos são exemplos de complexos organizacionais biológicos. Estes complexos desempenham funções importantes no nosso organismo. Entretanto para desempenhar estas funções de maneira adequada sua estrutura deve ser preservada. Diversos agentes e condições desnaturantes podem interferir na estrutura das membranas, prejudicando assim suas funções.

A capacidade da membrana em manter sua estrutura diante destes agentes e condições desfavoráveis é definida como estabilidade. Sendo assim, a estabilidade é um requisito essencial para preservação de sua função.

A funcionalidade e a estabilidade não seguem um padrão equivalente de sentido absoluto, uma vez que, uma maior estabilidade de membrana não coincide necessariamente com a maior funcionalidade. Para garantir uma maior funcionalidade, a membrana deve apresentar um nível de estabilidade que não é necessariamente o maior que ela pode ter.

Diversas doenças ou alterações fisiológicas do organismo, bem como a alimentação ou prática de exercício físico podem interferir na composição e no comportamento físico-químico das membranas e, consequentemente, em sua funcionalidade.

As inter-relações entre estabilidade e funcionalidade de membrana têm sido alvo de investigação no Laboratório de Biofisicoquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. Estes estudos são desenvolvidos utilizando o eritrócito como modelo de estudo, por ser um bom modelo experimental e por ser obtido de maneira minimamente invasiva, sem causar danos ao doador.

As análises da estabilidade de membrana são realizadas a partir da incubação destas células em gradiente de hipotonicidade ou de concentrações de agentes desnaturantes. A lise eritrocitária provocada por ação destas soluções pode ser verificada através da liberação de hemoglobina no meio e quantificada por espectrofotometria na região visível do espectro. O perfil desta lise gera uma curva de regressão sigmoidal a partir da qual podemos avaliar a estabilidade das células.

A análise da estabilidade de eritrócito é feita em incubação por tempo fixo, a uma dada temperatura, e se baseia na quantidade de lise existente a diferentes concentrações salinas ou de agentes desnaturantes. Como a lise é muito rápida e o tempo de incubação é suficientemente longo, as constantes de lise derivadas desta análise são, portanto, de natureza termodinâmica, uma vez que representam uma situação de equilíbrio. Certamente, o conjunto das variáveis que afetam a lise de eritrócitos deve compreender também o tempo. A introdução da variável tempo e a fixação da variável concentração da solução desnaturante muda a abordagem físico-química dos estudos, de um foco termodinâmico para um foco cinético. Esta dissertação trata do estabelecimento de condições e de um formalismo matemático para análise da cinética de lise hipotônica de eritrócitos. Essa mudança na natureza físico-química do foco deve ajudar a entender de uma forma mais ampla as influências da idade e de diferentes variáveis hematológicas e bioquímicas sobre o comportamento de eritrócitos.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Composição e estrutura das membranas biológicas

Membranas biológicas são complexos organizacionais celulares que delimitam o meio interno da célula, separando-o do meio extracelular. Em células eucariontes estas membranas são encontradas também revestindo as organelas intracelulares (Campbell, 2000).

São as membranas que, delimitando a célula, permitem a ocorrência em seu interior de reações químicas que não seriam possíveis no meio extracelular. Além disso, atuam como uma barreira seletiva, controlando a entrada e saída de substância das células (Cullis & de Kruijff, 1979; Lodish et al., 2007; Nelson & Cox, 2008).

As membranas biológicas são formadas por uma bicamada lipídica composta basicamente por fosfolipídios (R.A. Cooper, 1977), com presença de diversas outras moléculas, como glicolipídeos, colesterol e proteínas (Singer & Nicolson, 1972).

Os fosfolipídios encontrados nas membranas biológicas podem ser fosfoacilgliceróis (fosfatidatos, plasmalogênios, difosfatidilgliceróis e fosfoinositídeos) ou esfingolipídeos (ceramidas, esfingomielinas e glicoesfingolipídeos neutros e ácidos) (Bernardino Neto, 2011).

Uma grande variedade de outras classes de lipídeos compõe as membranas biológicas. Dentre os principais destacam-se derivados de fosfolipídios como ácidos graxos livres, mono- e di-acil-gliceróis, além de colesterol, que é outro importante lipídeo encontrado nas membranas de células eucarióticas (Bernardino Neto, 2011; Cribier, Morrot, & Zachowski, 1993).

Uma característica importante destes principais componentes lipídicos presente nas membranas é sua natureza anfifílica, que determina a estrutura e a disposição das membranas biológicas (Cribier et al., 1993). Desta forma, a porção hidrofóbica destes lipídeos aparece voltada para o interior da bicamada, enquanto a porções hidrofílicas estão orientadas para fora da bicamada, interagindo com meio intra- e extracelular (Murray & Granner, 2002).

Diversas proteínas se apresentam inseridas nesta estrutura lipídica, unidas por interações hidrofóbicas, que ocorrem entre os lipídios da membrana e os domínios hidrofóbicos das proteínas (Cribier et al., 1993). Apesar do arcabouço estrutural que forma a bicamada que compõe as membranas biológicas ser essencialmente lipídico, a

porção proteica é bastante considerável, representando cerca de 20 a 80% do peso total da membrana (Campbell, 2000).

As proteínas que compõem a membrana são estruturalmente classificadas em integrais e periféricas. As proteínas integrais penetram ou atravessam a bicamada lipídica, interagindo com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas; já as proteínas periféricas se encontram voltadas para a superfície interna e/ou externa da membrana (Campbell, 2000).

A maioria das funções das membranas está relacionada com as diversas funções desempenhadas por estas proteínas, como exemplo podemos citar o auxílio no transporte de substâncias entre o meio intracelular e extracelular (proteínas transportadoras) (Campbell, 2000; Storry, 2004), além da captação de sinais externos (proteínas receptoras), entre outras funções (Campbell, 2000).

A composição de uma membrana é muito relativa, por ser dependente de diversos fatores. O local em que a célula se encontra ou a própria função que ela desempenha são exemplos de fatores que podem interferir em sua composição (Bernardino Neto, 2011; Storry, 2004). Estas variações são verificadas tanto nas monocamadas internas como nas externas, as quais diferem em seus conteúdos lipídicos, proteicos e glicídicos (Bernardino Neto, 2011; Di, Liu, Liu, & Wang, 2006).

Estabilidade das membranas biológicas

A integridade físico-química das membranas biológicas é extremamente importante para que elas possam preservar suas funções. Sendo assim, as membranas biológicas precisam constantemente exercer um controle sobre diversos agentes e condições que podem interferir na sua estrutura e, consequentemente, na sua funcionalidade. A capacidade das membranas em manter sua estrutura diante destes agentes e condições desfavoráveis é denominada de estabilidade.

A funcionalidade e estabilidade não seguem um padrão equivalente de sentido absoluto, uma vez que, uma maior estabilidade de membrana não coincide necessariamente com a melhor funcionalidade, portanto uma maior estabilidade nem sempre é sinônimo de uma maior funcionalidade. Para garantir uma melhor funcionalidade, a membrana deve apresentar um nível necessário de estabilidade.

Diversos fatores e condições podem interferir na estabilidade e, consequentemente, na funcionalidade das membranas. Em geral estes fatores são semelhantes aos que afetam a estabilidade de proteínas, tais como pH, temperatura, drogas, solutos estabilizadores e desestabilizadores (caotrópicos).

As membranas não são estruturas estáticas, os lipídeos que a compõe são capazes de se moverem, proporcionando certa movimentação nestas membranas. A fluidez é a propriedade que está relacionada com o grau de liberdade na movimentação destes lipídeos e, consequentemente, das membranas. O grau de liberdade de movimentação destes lipídeos é determinado pelas forças de van-der-Waals, que unem os lipídios de membrana entre si e às proteínas, determinando assim uma maior ou menor movimentação (Murray & Granner, 2002).

O aumento no teor de ácido graxo insaturado (UFA) é capaz de promover uma elevação no grau de fluidez das membranas, ao contrário do ácido graxo saturado (SFA) e do colesterol, os quais contribuem para um menor grau de fluidez. Um aumento exagerado no teor de UFA e/ou uma diminuição excessiva no teor de colesterol da membrana é capaz de elevar o seu grau de fusibilidade, provocando uma maior vulnerabilidade de a membrana sofrer fusão e, consequentemente, lise. Por outro lado, o aumento excessivo no teor de SFA e/ou de colesterol provoca a rigidificação da membrana, a qual também se torna sujeita à lise, mas por friabilidade (Bernardino Neto, 2011; Chabanel et al., 1983).

O balanço necessário entre a estabilidade e a funcionalidade de uma membrana biológica exige um nível intermediário de fluidez, chamado de fluidez crítica, encontrada entre os estados sólido e líquido. Portanto, composição da membrana é importante para a determinação do grau de fluidez necessário (fluidez crítica) para o desempenho das funções da membrana (Bernardino Neto, 2011; Murray & Granner, 2002; Singer & Nicolson, 1972) (**Figura 1.1**).

Outros fatores mais específicos podem interferir na estabilidade das membranas, como a natureza e concentração relativa de todos os solutos dos ambientes extra- e intracelular (Borowitza & Brown, 1974; Bowlus & Somero, 1979; Nikolopoulos & Manetas, 1991; Pollard & Wyn-Jones, 1979; Santoro, Liu, Khan, Hou & Bolen, 1992; P.H.; Yancey, 1985; P.H.; Yancey, Clark, Hand, Bowlus & Somero, 1982), bem como os efeitos danosos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (EROS), os quais

podem promover a lipoperoxidação destas membranas, interferindo em sua estabilidade e funcionalidade (Begum & Terao, 2002).

Composição e estabilidade de eritrócitos

A composição da membrana do eritrócito é um dos fatores importantes na determinação de sua estabilidade de membrana.

Os principais lipídeos que compõem as membranas dos eritrócitos são fosfatidilcolina (25%), fosfatidiletanolanina (22%), fosfatidilserina (10%), esfigomielina (18%) e colesterol (25%) (Murray & Granner, 2002).

Alteração na composição lipídica das membranas de eritrócitos interfere em sua fluidez e estabilidade. Um exemplo destas alterações ocorre em condições de hipercolesterolemia (R.A. Cooper, Arner, Wiley, & Shattil, 1975; Schick & Schick, 1985), em que o excesso de colesterol da LDL vai para a membrana do eritrócito (Martinez et al., 1996), diminuindo sua fluidez (R.A. Cooper, 1977; Dwight, Mendes Ribeiro, & Hendry, 1996; Muller, Ziegler, Donner, Drouin, & Stoltz, 1990). Essa rigidificação da membrana altera suas propriedades e as características reológicas do sangue, com aumento na viscosidade e diminuição do aporte de oxigênio aos tecidos (Chabanel et al., 1983; Koter, Broncel, Chojnowska-Jezierska, Klikczynska, & Franiak, 2002).

As proteínas presentes na membrana do eritrócito também possuem papel relevante na determinação de sua estabilidade, principalmente as que estão ligadas ao citoesqueleto, uma vez que elas são essenciais na manutenção de sua estrutura e preservação de sua integridade física (Evans & Hochmuth, 1977; Fischer, Haest, Stohr, Kamp, & Deuticke, 1978; S. C. Liu & Palek, 1980; Mohandas, Chasis, & Shohet, 1983; Smith & Palek, 1983; van den Akker, Satchwell, Williamson, & Toye, 2010).

As proteínas que aparecem inseridas na membrana do eritrócito apresentam uma heterogeneidade de funções, como transporte, sinalização, adesão e interação com outras células do sangue ou do endotélio dos vasos sanguíneos, dentre outras atividades (Mohandas & Gallagher, 2008).

As proteínas de membrana com função de transporte incluem a banda 3 (Transportador de ânions), a aquaporina 1 (transportador de água), o GLUT1 (transportador de glucose), o RHAG (transportador de gás, provavelmente de dióxido

de carbono), e os co-transportadores Na^+Cl^+, Na^+K^+, Na^+K^+ATPase, Ca^{++}ATPase e $Na^+K^+2Cl^-$, dentre outras (Mohandas & Gallagher, 2008). Dentre as proteínas com função adesiva destaca-se a ICAM-4, que interage com as integrinas de membranas, promovendo a adesão celular (Cartron & Colin, 2001; Reid & Mohandas, 2004).

Uma proteína de membrana do eritrócito que está diretamente relacionada com a estrutura e estabilidade é a banda 3 ou *anion exchanger 1* (AE1). Ela é uma proteína extra-membranar e é considerada a principal proteína integral da membrana de eritrócitos, representando de 25%-30% de todas as proteínas da membrana, com aproximadamente 10^6 cópias por célula (Jarolim, Rubin, Zakova, Storry, & Reid, 1998; Murador & Deffune, 2007; Storry, 2000).

Outras proteínas integrais importantes são as proteínas transportadoras de íons e as glicoforinas A, B, C, D, que, além de possuírem receptores de membrana e de antígenos, também participam do reconhecimento celular na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto **(Figura 1.2)** (Gallager, Forget, & Lux, 1998).

As proteínas periféricas que formam o citoesqueleto da membrana eritrocitária são constituídas principalmente por espectrina, actina, anquirina, banda 4.1 e banda 4.9. Dentre as proteínas mencionadas, a espectrina, a actina e a banda 4.1 são as que estão mais diretamente relacionadas com a integridade estrutural das membranas (G. M. Cooper, 1997).

Análise da estabilidade de membrana de eritrócitos

A membrana do eritrócito constitui um modelo primário para estudo de membranas, pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelas (Murray & Granner, 2002) e refletir características físico-químicas de outras células pós-mitóticas do organismo.

Além disso, a análise da estabilidade de membrana usando o eritrócito como modelo de estudo é uma alternativa minimamente invasiva ao doador e constitui um modelo prático de estudo, uma vez que sua lise libera hemoglobina no meio, a qual pode ser facilmente quantificada por espectrofotometria na região visível do espectro (Nelson & Cox, 2008).

A estabilidade de membrana do eritrócito pode ser determinada em gradiente de concentração de NaCl (fragilidade osmótica eritrocitária ou FOE) (Cunha, Arvelos, Costa, & Penha-Silva, 2007; de Arvelos et al., 2013; de Freitas et al., 2010; Jain, 1986; Mansur et al., 2010; Penha-Silva et al., 2008; Penha-Silva et al., 2007) ou de diferentes solutos como o etanol (de Arvelos et al., 2013; de Freitas et al., 2010; Gouvêia-Silva, 2006; Penha-Silva et al., 2008) e o dodecil-sulfato de sódio (SDS), um detergente que possui ação desnaturante de membranas (Fonseca et al., 2010; W. Liu, Guo, & Guo, 2007; Moosavi-Movahedi, 2005; Tanford, 1968), dentre outros solutos. O uso de solutos estabilizantes como o glicerol (Cunha et al., 2007; de Freitas et al., 2010; Gouvêia-Silva, 2006; Penha-Silva et al., 2008) e a glicose (Lemos, Marquez-Bernardes, Arvelos, Paraiso, & Penha-Silva, 2011) permite entender a influência da osmolaridade do meio sobre as propriedades físico-químicas da membrana dessa célula.

A incubação em tempo fixo dos eritrócitos em soluções com diferentes concentrações de NaCl ou de solutos desnaturantes gera um gradiente de lise, que pode ser caracterizado pela medida da absorvância a 540 nm (A_{540}) da hemoglobina liberada em cada condição de incubação. Os valores de A_{540} variam conforme a concentração de NaCl ou do soluto desnaturante e podem ser ajustados por regressão não-linear sigmoidal, de acordo com a equação de Boltzmann (Bernardino Neto, 2011).

À medida que aumenta a concentração do agente caotrópico ou diminui a tonicidade do meio, aumenta a lise dos eritrócitos. A curva de lise gerada através da diminuição tonicidade do meio por decréscimo na concentração salina é dada por uma sigmóide decrescente, enquanto lise ocasionada pelo agente caotrópico é dada por uma sigmóide crescente(Bernardino Neto, 2011; Cunha et al., 2007; Penha-Silva et al., 2008).

A **Figura 1.3** ilustra uma curva de lise por hipotonicidade. A regressão sigmoidal gerada pela liberação de hemoglobina possui um caráter semelhante aos sistemas cooperativos saturáveis. Se analisarmos o perfil da lise eritrocitária a partir de diferentes gradientes de concentrações salinas, observamos que a liberação de hemoglobina parte de um platô mínimo estável (representado pela sigla $\mathbf{A_2}$, refere-se ao valor estacionário médio de absorvância) em que há uma baixa taxa de hemoglobina liberada no meio. À medida que a concentração salina no meio diminui, há um aumento gradativo da lise eritrocitária, que a partir de um determinado ponto

sofre uma aceleração exponencial. Ao atingir o ponto intermediário da curva, a liberação de hemoglobina sofre uma desaceleração hiperbólica, até atingir um platô máximo estável (representado pela sigla $\mathbf{A_1}$, refere-se ao valor estacionário médio de absorvância).

A variação na concentração de sal (**X**) promove a transição entre os valores de $\mathbf{A_2}$ e $\mathbf{A_1}$, sendo que a diferença entre dois pontos é representada pela variável **dX**. O ponto intermediário da concentração salina em que há uma taxa de 50% de lise dos eritrócitos presente no sistema é representado pela variável $\mathbf{H_{50}}$.

As variáveis **dX** e $\mathbf{H_{50}}$ estão relacionadas diretamente com a estabilidade de membrana dos eritrócitos. A variável **dX** é diretamente proporcional à estabilidade, uma vez que, quanto menor o valor de **dX**, menor é a estabilidade. Como a estabilidade membranas é inversamente proporcional à fragilidade osmótica, neste caso há uma maior fragilidade osmótica dos eritrócitos. Valores relativamente menores de **dX** demonstra que foi necessária uma menor variação na concentração salina do sistema para promover a lise eritrocitária, indicando assim uma menor estabilidade da membrana celular.

A variável $\mathbf{H_{50}}$, diferentemente de **dX**, é inversamente proporcional à estabilidade, uma vez que, quanto menor o valor de $\mathbf{H_{50}}$ maior é a estabilidade, portanto menor será a fragilidade osmótica dos eritrócitos. Valores relativamente menores de $\mathbf{H_{50}}$ demonstram que foi necessária uma maior taxa de hipotonicidade do meio para promover a hemólise, indicando, portanto uma estabilidade maior da membrana diante das condições hipotônicas do meio (Bernardino Neto, 2011; de Freitas et al., 2008; Penha-Silva et al., 2007). O inverso de H_{50}, $1/H_{50}$, tem sido mais propriamente usado como variável de estabilidade (Bernardino Neto, 2011; de Arvelos et al., 2013).

Embora os parâmetros **dX** e $\mathbf{1/H_{50}}$ apareçam como constantes associadas ao formalismo de Boltzmann, os seus valores variam em função de todos os fatores que têm influência sobre a estabilidade de membrana. Esses fatores compreendem uma miríade de condições como a idade (Penha-Silva et al., 2007) e as variáveis bioquímicas e hematológicas trivialmente usadas em diagnósticos clínicos (de Arvelos et al., 2013; Fonseca et al., 2010).

Entender como essa complexa rede de variáveis afeta o comportamento físico-químico e fisiológico da membrana do eritrócito em função do ganho de idade e das doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento é uma tarefa importante que justifica o aprofundamento do estudo da físico-química de membrana dessa célula. Uma variável hematológica que apresenta associação com a estabilidade do eritrócito é a RDW (Bernardino Neto, 2011). Como um aumento na RDW foi recentemente associado ao risco de morte por doença cérebro-cardiovascular (Cavusoglu et al., 2010; Felker et al., 2007; Tziakas et al., 2012), é bem possível que essas intercorrências estejam relacionadas ao comportamento físico-químico do eritrócito.

Como a análise da estabilidade de eritrócito, que é uma propriedade termodinâmica, é feita em incubação por tempo fixo e a lise é muito rápida em relação ao tempo de incubação, ela não avalia a influência do tempo sobre a hemólise, que exige uma abordagem cinética. A cinética de complexos biológicos mais definida e largamente estudada é aquela das enzimas.

A cinética enzimática de Michaelis-Menten

O estudo cinético das reações enzimáticas é comumente fundamentado na equação de Michaelis-Menten (Michaelis & Menten, 1913),

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_M + [S]} \qquad (1.1),$$

que representa a dependência da velocidade inicial da reação (**v_0**) com a concentração do substrato (**S**), onde **V_{max}** é a velocidade máxima da reação e **K_M** é a concentração de substrato necessária para a **v_0** atingir a metade do valor da velocidade máxima (**Figura 1.4**).

A cinética de Michaelis-Menten foi associada ao equilíbrio de estado estacionário de Briggs-Haldane (Briggs & Haldane, 1925; Carvalho, Pires, Antunes, & Faria, 2010; Espenson, 2002),

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{+2}} E + P \qquad (1.2),$$

que considera as reações de formação e dissociação do complexo enzima-substrato (**ES**), caracterizadas pelas suas respectivas constantes cinéticas **k_{+1}** e **k_{-1}**, e a reação de

formação do produto (**P**) e regeneração da enzima livre (**E**), caracterizada pela constante cinética $\mathbf{k_{+2}}$.

No curso da reação, a enzima é encontrada sob a forma livre (**E**) e a forma ligada ao substrato (**ES**). Em baixas concentrações de substrato, a maior quantidade de enzimas está na forma livre. Sob estas condições, a velocidade inicial da reação ($\mathbf{v_0}$) (**Figura 1.5**) aumenta quase linearmente com o aumento de **S**, uma vez que há enzima livre para promover aumento na velocidade da reação. Á medida que ocorre maior aumento na concentração de **S**, mas a concentração total da enzima no meio permanece constante, o aumento em $\mathbf{v_0}$ diminui, porque a população de enzima livre está em decréscimo. Quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma ligada (**ES**) e a concentração da enzima livre (**E**) for insignificante, a $\mathbf{V_{max}}$ é atingida. Nesta situação, a enzima está saturada pelo substrato, de forma que o aumento na concentração de **S** não é mais capaz de aumentar a velocidade da reação e o sistema está em equilíbrio de estado estacionário (**Figura 1.4**) (Michaelis & Menten, 1913).

As constantes $\mathbf{K_M}$ e $\mathbf{V_{max}}$ da equação de Michaelis-Menten podem ser definidas a partir das constantes cinéticas do equilíbrio de Briggs-Haldane pela equações

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \qquad (1.3),$$

e

$$V_{max} = k_2[E_T] \qquad (1.4),$$

respectivamente, onde $\mathbf{E_T}$ representa a concentração total da enzima (livre e ligada) na solução.

A cinética de Michaelis-Menten, segundo o equilíbrio de Briggs-Haldane, é largamente utilizada para caracterização de enzimas e ligantes (substratos e inibidores), particularmente pela determinação das constantes cinéticas $\mathbf{K_M}$ e $\mathbf{V_{max}}$.

A determinação dessas constantes hoje pode ser facilmente feita por regressão não linear hiperbólica, com a utilização de programas estatísticos. Mas existem vários métodos que permitem a determinação delas por regressão linear. Um desses métodos é fundamentado na equação de Lineweaver-Burk (Lineweaver & Burk, 1934),

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max.}}\frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max.}} \qquad (1.5),$$

também chamada de equação dos duplos recíprocos, por ser a forma inversa da equação de Michaelis-Menten (**Figura 1.6**). Neste método, as interseções da reta de regressão na ordenada e na abscissa vão gerar respectivamente os valores de $1/V_{max}$ e de $-1/K_M$, dos quais se pode facilmente obter os valores das constantes cinéticas de Michaelis-Menten. Os demais métodos de linearização são derivados da equação de Lineaweaver-Burk. O método de Hanes-Woolf (**Figura 1.7**) é fundamentado na equação

$$\frac{S}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max.}} + \frac{1}{V_{max.}} S \qquad (1.6),$$

obtida pela multiplicação da equação de Lineaweaver-Burk por **S**. Neste método, a inclinação da reta de regressão é $1/V_{max}$ e sua interseção na abscissa é igual a $-K_M$ (Hanes, 1932). Por outro lado, o método de Eadie-Hofstee (**Figura 1.7**) é baseado na equação

$$v_0 = V_{max.} - K_M \frac{v_0}{S} \qquad (1.7),$$

que é derivada da multiplicação da equação de Lineweaver-Burk por V_{max}. Neste método, a interseção da linha de regressão ocorre em um valor de $v_0 = V_{max}$ e sua inclinação é igual a $-K_M$ (Eadie, 1942).

A análise de muitos tipos de processos biológicos que são ajustáveis por regressão não linear hiperbólica pode usar as estratégias do método original de Michaelis-Menten e dos métodos de linearização derivados desse modelo matemática para obtenção de constantes. A cinética de lise de eritrócitos humanos pode ser um desses tipos de processos.

Considerações finais

Em nosso organismo, diversos fatores e condições patológicas podem afetar a estabilidade das membranas biológicas, interferindo em sua funcionalidade. O eritrócito constitui um excelente modelo para estudo da influência desses fatores e condições sobre uma membrana biológica, em decorrência de sua obtenção por procedimento simples e minimamente invasivo ao doador. Embora, a maioria dos estudos sobre o assunto terem uma abordagem termodinâmica, com avaliação da lise de membrana após um período fixo de tempo, uma abordagem cinética da hemólise pode permitir a obtenção de informações dos fatores e condições patológicas que dependem do tempo para exercer suas influências sobre a membrana da célula. Esta revisão da literatura objetivou instrumentar a compreensão das questões relevantes no estabelecimento das condições e padronização de métodos para estudo da cinética de lise de eritrócitos.

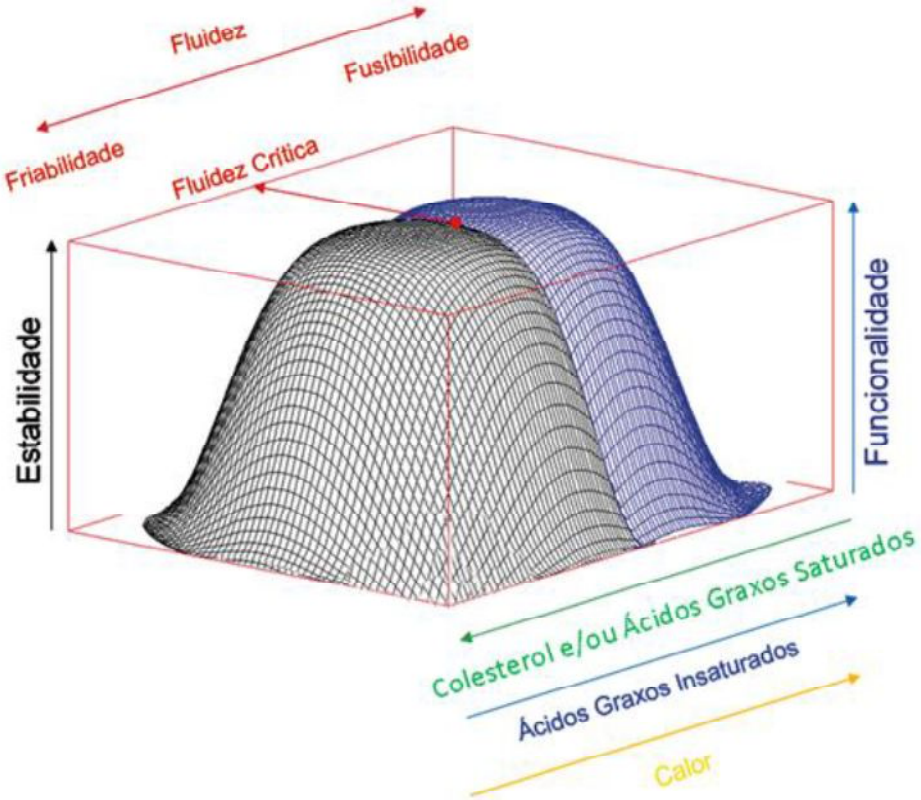

Figura 1.1. Ilustração da influência da composição lipídica (teor de colesterol, ácidos graxos saturados e insaturados) e do calor sobre a estabilidade e a funcionalidade de uma membrana biológica. Uma fluidez excessiva promove fusão da membrana. Por outro lado, uma diminuição excessiva da fluidez torna a membrana sólida e friável (Bernardino Neto, 2011).

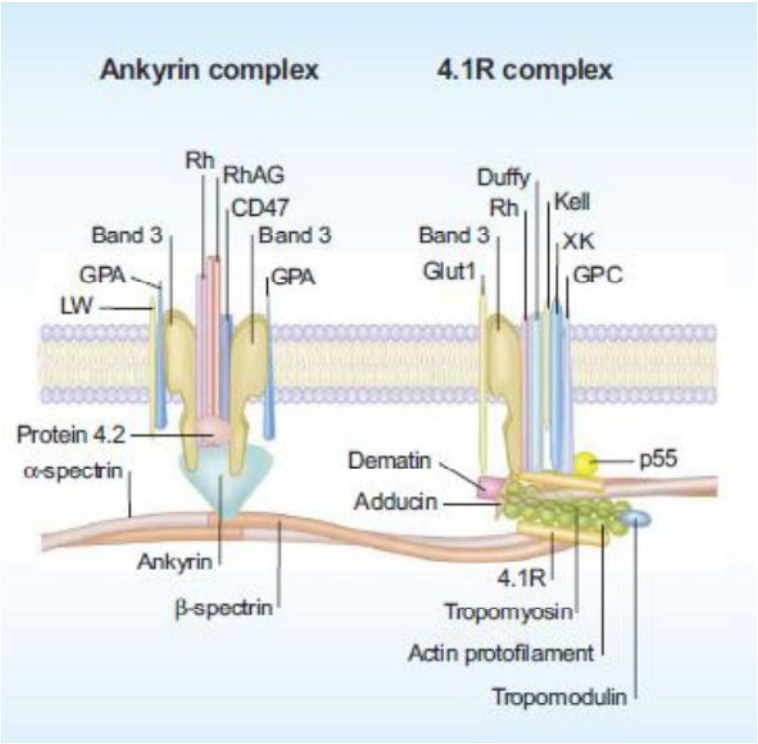

Figura 1.2. Representação esquemática das proteínas de membrana e do citoesqueleto de um eritrócito (Mohandas & Gallagher, 2008).

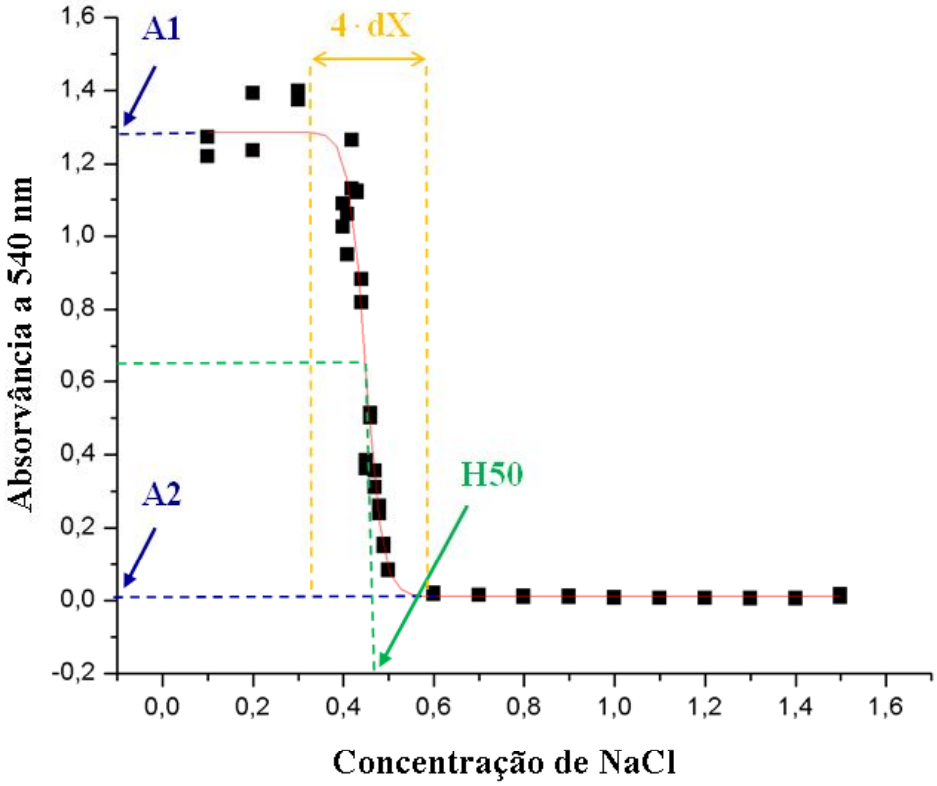

Figura 1.3 Representação típica de uma curva de lise hipotônica de eritrócitos humanos, obtida por regressão sigmoidal entre os valores de absorvância a 540 nm e a concentração de NaCl da solução. A_1 representa a absorvância média máxima associada à hemólise total; A_2 representa a absorvância média mínima associada à hemólise basal; H_{50} representa a concentração de NaCl necessária para promover lise de 50% da população de eritrócitos; e dX representa a variação na concentração de NaCl necessária para levar os eritrócitos do estado íntegro (A_2) ao estado lisado (A_1) (Bernardino Neto, 2011).

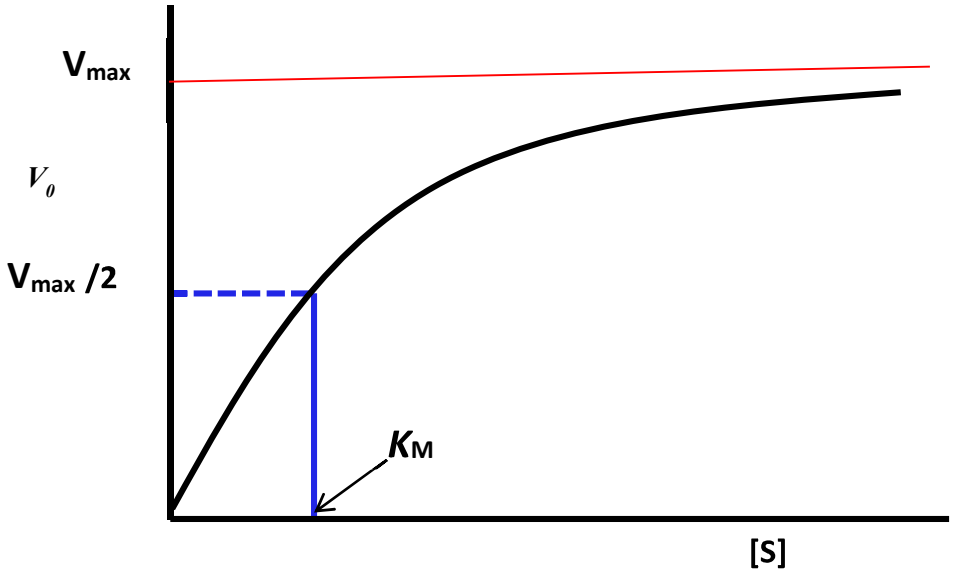

Figura 1.4. Gráfico ilustrativo do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação enzimática, com representação das constantes cinéticas de Michaelis-Menten (V_{max} e K_M).

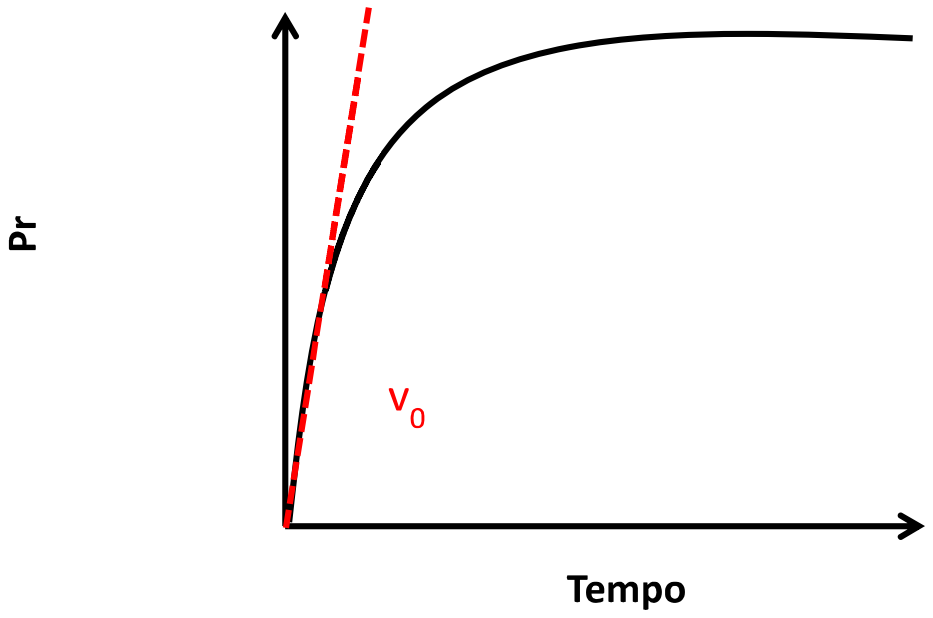

Figura 1.5. Dependência da formação de produto com o tempo em uma reação de catálise enzimática. A inclinação da porção linear inicial da curva corresponde à velocidade inicial (v_0) da catálise.

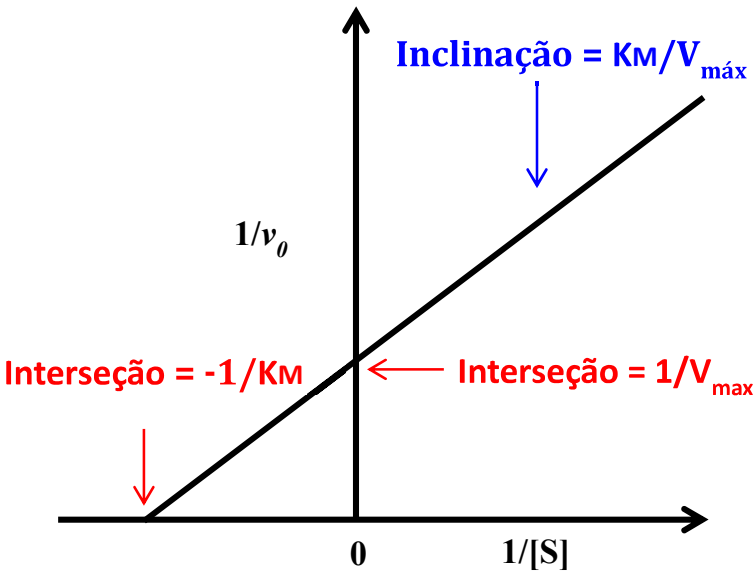

Figura 1.6. Representação gráfica do método de Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_M e V_{max}).

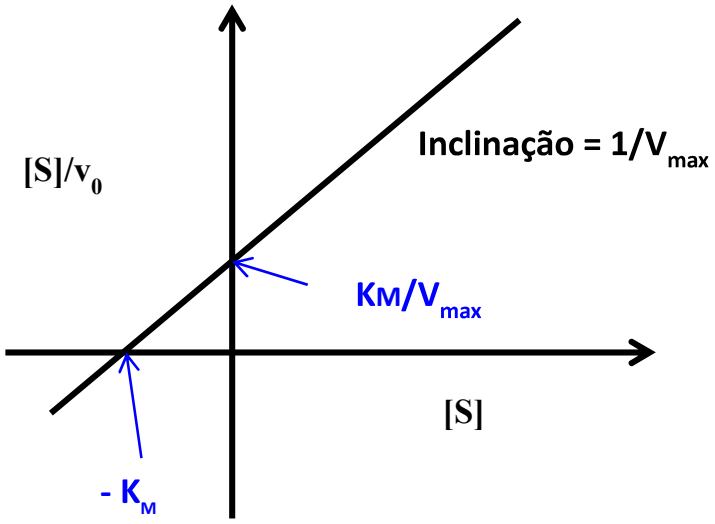

Figura 1.7. Representação gráfica do método de Hanes-Woolf para determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_M e V_{max}).

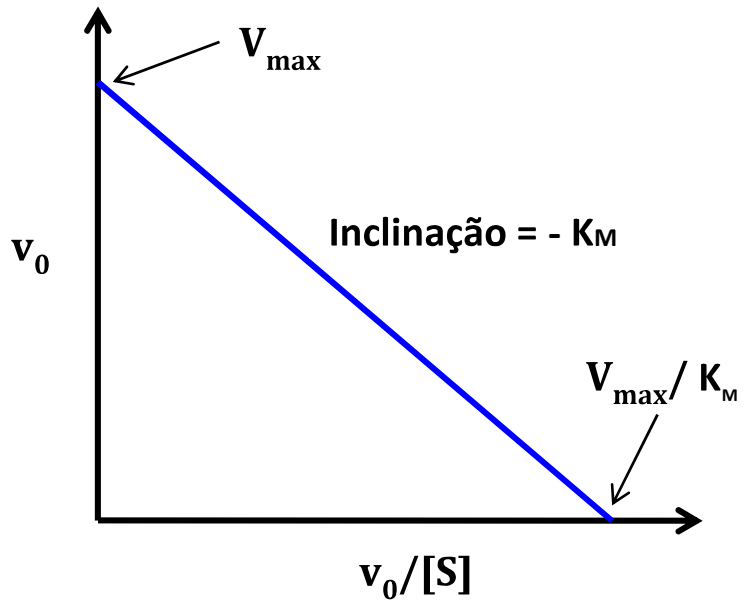

Figura 1.8. Representação gráfica do método de Eadie-Hofstee para determinação dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_M e V_{max}).

Referências

BEGUM, A. N.; TERAO, J. Protective effect of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. **Biosci Biotechnol Biochem,** v. 66, n. 2, p. 398-403, 2002.

BERNARDINO NETO, M. **Análise de correlações entre estabilidade de membrana de eritrócitos, níveis séri-cos de lipídeos e varáveis hematimétricas**. (Doutorado) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

BOROWITZA, L. J.; BROWN, A. D. The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga Dunaliella: the role of glycerol as a compatible solute. **Archiv fur Mikrobiologie,** v. 96, p. 37-52, 1974.

BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **J Exp Zool,** v. 208, n. 2, p. 137-51, 1979.

BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. **Biochem J,** v. 19, n. 2, p. 338-9, 1925.

CAMPBELL, M.K. & FARRELL, S.O. Lipídeos e proteínas estão associados a membranas biológicas. **Bioquímica** (5ª ed) São Paulo: Thomsom, cap.8, p.197-225, 2007.

CARTRON, J. P.; COLIN, Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. **Transfus Clin Biol,** v. 8, n. 3, p. 163-99, 2001.

CARVALHO, N. M. F.; PIRES, B. M.; ANTUNES, O. A.; FARIA, R. B.; OSÓRIO, R. E.; PIOVEZAN, C.; NEVES, A. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. . **Quimica Nova,** v. 33, n. 7, p. 1607-1611, 2010.

CAVUSOGLU, E.; CHOPRA, V.; GUPTA, A.; BATTALA, V. R.; POLUDASU, S.; ENG, C.; MARMUR, J. D. Relation between red blood cell distribution width (RDW) and all-

cause mortality at two years in an unselected population referred for coronary angiography. **International Journal of Cardiology,** v. 141, n. 2, p. 141-146, 2010.

CHABANEL, A.; FLAMM, M.; SUNG, K. L.; LEE, M. M.; SCHACHTER, D.; CHIEN, S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophys J,** v. 44, n. 2, p. 171-6, 1983.

COOPER, G. M. The cell surface. In: (Ed.). **The cel: A molecular approach**. Washington: ASM Press, 1997.

COOPER, R. A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. . **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital,** v. 297, n. 7, p. 371-377, 1977.

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

CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,** v. 48, n. 1, p. 27-32, 1993.

CULLIS, P. R.; DE KRUIJFF, B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. **Biochim Biophys Acta,** v. 559, n. 4, p. 399-420, 1979.

CUNHA, C. C.; ARVELOS, L. R.; COSTA, J. O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **J Bioenerg Biomembr,** v. 39, n. 4, p. 341-7, 2007.

DE ARVELOS, L. R.; ROCHA, V. C. A.; FELIX, G. P.; DA CUNHA, C. C.; NETO, M. B.; DA SILVA GARROTE FILHO, M.; PENHA-SILVA, N. Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. **J Membr Biol,** v. 246, n. 3, p. 231-42, 2013.

DE FREITAS, M. V.; DE OLIVEIRA, M. R.; DOS SANTOS, D. F.; NETTO, R. D. C. M.; FENELON, S. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of the use of statin on the stability of

erythrocyte membranes in multiple sclerosis. **J Membr Biol,** v. 233, n. 1-3, p. 127-34, 2010.

DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. D. C. M.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M. T.; COSTA, J. O.; FIRMINO, C. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicol In Vitro,** v. 22, n. 1, p. 219-24, 2008.

DI, L.; LIU, W.; LIU, Y.; WANG, J. Y. Effect of asymmetric distribution of phospholipids in ghost membrane from rat blood on peroxidation induced by ferrous ion. **FEBS Lett,** v. 580, n. 2, p. 685-90, 2006.

DWIGHT, J. F.; MENDES RIBEIRO, A. C.; HENDRY, B. M. Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. **Clin Chim Acta,** v. 256, n. 1, p. 53-63, 1996.

EADIE, G. S. THE INHIBITION OF CHOLINESTERASE BY PHYSOSTIGMINE AND PROSTIGMINE. **J. Biol. Chem,** v. 146, p. 85-93, 1942.

ESPENSON, J. H. **Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms**. 2. Nova Iorque: 2002.

EVANS, E. A.; HOCHMUTH, R. M. A solid-liquid composite model of the red cell membrane. **J Membr Biol,** v. 30, n. 4, p. 351-62, 1977.

FELKER, G. M.; ALLEN, L. A.; POCOCK, S. J.; SHAW, L. K.; MCMURRAY, J. J.; PFEFFER, M. A.; GRANGER, C. B. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure - Data from the CHARM program and the Duke Databank. **Journal of the American College of Cardiology,** v. 50, n. 1, p. 40-47, 2007.

FISCHER, T. M.; HAEST, C. W. M.; STOHR, M.; KAMP, D.; DEUTICKE, B. Selective Alteration of Erythrocyte Deformability by Sh-Reagents - Evidence for an Involvement of Spectrin in Membrane Shear Elasticity. **Biochimica Et Biophysica Acta,** v. 510, n. 2, p. 270-282, 1978.

FONSECA, L. C.; ARVELOS, L. R.; NETTO, R. C. M.; LINS, A. B.; GARROTE-FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. Influence of the albumin concentration and temperature on the

lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. **J Bioenerg Biomembr,** v. 42, n. 5, p. 413-8, 2010.

GALLAGER, P. G.; FORGET, B. G.; LUX, S. E. Disorders of Erythrocyte Membrane. In: DG, N.;FA, O., et al (Ed.). **Hematology of Infancy and Childhood**. 5. Philadelphia: WB Saunders, p.544-664, 1998.

GOUVÊA-E-SILVA, L. F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos humanos por etanol.** (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2006.

HANES, C. S. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **Biochem. J.,** v. 26, n. 5, p. 1406–1421, 1932.

JAIN, N. C. Hematology techniques. In: JAIN, N. C. (Ed.). **Shalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.64-71, 1986.

JAROLIM, P.; RUBIN, H. L.; ZAKOVA, D.; STORRY, J.; REID, M. E. Characterization of seven low incidence blood group antigens carried by erythrocyte band 3 protein. **Blood,** v. 92, n. 12, p. 4836-4843, 1998.

KOTER, M.; BRONCEL, M.; CHOJNOWSKA-JEZIERSKA, J.; KLIKCZYNSKA, K.; FRANIAK, I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. **Eur J Clin Pharmacol,** v. 58, n. 8, p. 501-6, 2002.

LEMOS, G. S. D.; MÁRQUEZ-BERNARDES, L. F.; ARVELOS, L. R.; PARAÍZO, L. F.; PENHA-SILVA, N. Influence of Glucose Concentration on the Membrane Stability of Human Erythrocytes. **Cell Biochemistry and Biophysics,** v. 61, n. 3, p. 531-537, 2011.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc. ,** v. 56, p. 658-666, 1934.

LIU, S. C.; PALEK, J. Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. **Nature,** v. 285, n. 5766, p. 586-8, 1980.

LIU, W.; GUO, X.; GUO, R. The interaction between hemoglobin and two surfactants with different charges. **Int J Biol Macromol,** v. 41, n. 5, p. 548-57, 2007.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P.; BRETSCHER, A.; MATSUDARIA, P. **Molecular Cell Biology** ed. 6, 2007.

MANSUR, P. H.; LACORDAIRE, C.; ADRIANO, P.; NILSON, P. S.; ADRIANO, A. The approximate entropy of the electromyographic signals of tremor correlates with the osmotic fragility of human erythrocytes. **Biomed Eng Online,** v. 9, p. 29, 2010.

MARTINEZ, M.; VAYÁ, A.; MARTÍ, R.; GIL, L.; LLUCH, I.; CARMENA, R.; AZNAR, J. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. **Thromb Res,** v. 83, n. 5, p. 375-88, 1996.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetik der Invertinwirkung. Biochem **Biochem Z. ,** v. 49, p. 333-369, 1913.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A.; SHOHET, S. B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. **Semin Hematol,** v. 20, n. 3, p. 225-42, 1983.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood,** v. 112, n. 10, p. 3939-48, 2008.

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

MULLER, S.; ZIEGLER, O.; DONNER, M.; DROUIN, P.; STOLTZ, J. F. Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. **Atherosclerosis,** v. 83, n. 2-3, p. 231-7, 1990.

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

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K. Membranas: estrutura, montagem e função. In: GRANNER, D. K.;MAYES, P. A., et al (Ed.). **Harper's Biochemistry**. São Paulo: Atheneu Editora, cap.5, pg. 422-442, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Biological Membranes and Transport. **Lehninger Principles of Biochemistry**. (5 th ed)New York, cap. 11, p. 371-417, 2008.

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

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L. R.; CUNHA, C. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A.; GOUVÊA-E-SILVA, L. F.; GARROTE-FILHO, M. S.; DE FREITAS REIS, F. G. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry,** v. 73, n. 1, p. 23-9, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C. B.; DE FREITAS REIS, F. G.; HUSS, J. C. D. C.; DE SOUZA, T. M. T.; DE FREITAS, M. V., NETTO, R. D. C. M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mech Ageing Dev,** v. 128, n. 7-8, p. 444-9, 2007.

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

REID, M. E.; MOHANDAS, N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. **Semin Hematol,** v. 41, n. 2, p. 93-117, 2004.

SANTORO, M. M. et al. Increase thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. **Biochemistry,** v. 31, p. 5278-5283, 1992.

SCHICK, B. P.; SCHICK, P. K. Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. **Biochim Biophys Acta,** v. 833, n. 2, p. 281-90, 1985.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science,** v. 175, n. 4023, p. 720-31, 1972.

SMITH, D. K.; PALEK, J. Sulfhydryl reagents induce altered spectrin self-association, skeletal instability, and increased thermal sensitivity of red cells. **Blood,** v. 62, n. 6, p. 1190-6, 1983.

STORRY, J. R. A review: modification of the red blood cell membrane and its application in blood group serology. **Immunohematology,** v. 16, n. 3, p. 101-4, 2000. _____. Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. **Immunohematology,** v. 20, n. 4, p. 206-16, 2004.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Adv Protein Chem,** v. 23, p. 121-282, 1968.

TZIAKAS, D.; CHALIKIAS, G.; GRAPSA, A.; GIOKA, T.; TENTES, I.; KONSTANTINIDES, S. Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. **Clin Hemorheol Microcirc,** v. 51, n. 4, p. 243-54, 2012.

VAN DEN AKKER, E.; SATCHWELL, T. J.; WILLIAMSON, R. C.; TOYE, A. M. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. **Blood Cells Mol Dis,** v. 45, n. 1, p. 1-8, 2010.

YANCEY, P. H. Organic osmotic effectors in cartilagionous fishes. In: R. GILLES e GILLES-BAILLIEN, M. (Ed.). **Transport Processes, Iono- and Osmoregulation**. New York: Springer-Verlag, p.424-436, 1985.

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

CAPÍTULO 2

INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CINÉTICA DE LISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

RESUMO

A análise da estabilidade de membrana de eritrócito é feita em incubação a uma dada temperatura, por tempo fixo, e se baseia na quantidade de lise existente em função da diminuição na concentração de sal ou aumento na concentração de um agente desnaturante. As constantes de lise derivadas desta análise são de natureza termodinâmica, uma vez que representam uma situação de equilíbrio após um tempo suficientemente longo, embora a lise seja um processo muito rápido. As constantes de estabilidade de eritrócitos são válidas para análise de agentes moduladores que têm influência sobre esse equilíbrio, mas não daquelas que têm influência sobre a cinética de lise. Este trabalho desenvolveu condições experimentais para análise da cinética de lise de eritrócitos, não por monitoração em tempo real, mas por monitoração espectrofotométrica a 540 nm após interrupção da lise por hipertonicidade em intervalos pré-determinados de tempo. A cinética de lise foi estudada na região intermediária de salinidade (de 0,3 a 0,5 g/dL de NaCl) da curva de lise em tempo fixo. A concentração de 0,4 g/dL de NaCl permitiu uma melhor definição da cinética de lise e foi então usada na avaliação da cinética de lise de eritrócitos de 17 doadores. A curva de lise em função do tempo foi estatisticamente ajustada a uma hipérbole, usando a rotina de análise do modelo cinético integrado (que tem a mesma equação que o modelo de Michaelis-Menten na forma não integrada), o que permitiu a determinação do tempo de meia lise dos eritrócitos ($t_{1/2}$) e da máxima absorvância (A_{max}) atingida no ensaio. Os resultados apresentaram boa variância entre os doadores. A existência de associação entre essas constantes e as variáveis hematimétricas, glicemia e lipidemia dos doadores foi analisada por correlação de Spearman. A constante $t_{1/2}$ mostrou associação significante negativa com os valores de colesterol total (t-C) e LDL-C. A variável A_{max}, como era de se esperar, apresentou associações significantes com as variáveis hematológicas que estão sob a influência dos níveis de hemoglobina. A estratificação da população de estudo em duas faixas etárias (18-30 e 40-90 anos) mostrou que os valores de $t_{1/2}$ foram significantemente menores na população mais velha. Embora a população estudada tenha sido bem reduzida, esse trabalho mostra que a utilização de um foco cinético na abordagem fisicoquímica da lise de eritrócitos é

bastante promissora para analisar a miríade de variáveis que tem influência sobre a membrana do eritrócito.

Palavras-chave: Eritrócito, termodinâmica, cinética, lise, envelhecimento

ABSTRACT

[**Study of hypotonic lysis kinetics of human erythrocytes after interruption of lysis by hypertonic solution of sodium chloride**]

The analysis of the stability of the erythrocyte membrane is done under incubation at a given temperature for a fixed time, and is based on the amount of existing lysis a result of diminishing in the salt concentration or increased concentration of a denaturing agent. The lysis constants derived from this analysis are of a thermodynamic nature, since they represent an equilibrium situation after a sufficiently long time, although lysis is a very rapid process. These stability constants are valid for the analysis of modulating agents that influence on this equilibrium, but not those who have influence on the kinetics of lysis. This work has developed experimental conditions for the kinetic analysis of the lysis of erythrocytes not by monitoring in real time, but by spectrophotometric monitoring at 540 nm after an interruption of the lysis by hypertonicity at predetermined intervals of time. The kinetics of lysis was studied in the intermediate region of salt concentration (from 0.3 to 0.5 g/dL NaCl) of the hemolysis curve in conditions of fixed time incubation. The concentration of 0.4 g/dL NaCl led to a better definition of the lysis kinetics and was then used to evaluate the kinetics of lysis of erythrocytes from 17 donors that participated of the study. The lysis curve as a function of time was statiscally fitted to a hyperbola, using the analytical routine of the integrated kinetic model (which has the same equation as the Michaelis-Menten model in non-integrated form), allowing the determination of the time required to promote lysis of half of the population of erythrocytes ($t_{1/2}$) and the maximum absorbance (A_{max}) reached in the test. The results showed good variance among donors. The association between these constants and hematologic variables, blood glucose and blood lipid was analyzed by Spearman correlation. The constant $t_{1/2}$ was negatively correlated with total cholesterol (t-C) and LDL-C. The variable A_{max}, as it was expected, showed significant associations with hematologic variables that are under the influence of hemoglobin levels. Stratification of the study population into two age groups (18-30 and 40-90 y) showed that the values of $t_{1/2}$ were significantly lower in the older population. Although the population studied has been too small, this study showed that using a kinetic focus in the physico-

chemical approach of the RBC lysis is very promising for analyzing the myriad of variables which have influence on the erythrocyte membrane.

Keywords: erythrocyte, thermodynamics, kinetics, lysis, aging

INTRODUÇÃO

As membranas celulares são um dos mais importantes complexos biológicos, formando uma barreira de permeabilidade seletiva, que separa a célula do meio externo e suas organelas do citoplasma (Alberts, Johnson, Lewis, & Raff, 2008; Lodish et al., 2007; Nelson & Cox, 2008; Vieira, Gazzinelli & Mares-Guia, 1996), permitindo a ocorrência de uma série de reações no interior destes compartimentos bem como na superfície das próprias membranas(Bright, Gratian, & Luzio, 2005; Rothman & Orci, 1996).

Ao formar esta barreira seletiva, as membranas celulares geram um ambiente adequado para a função ideal de proteínas integrais e transmembrânicas, tais como os canais e bombas de íons(Chen & Gross, 1994; Kim & Clapham, 1989), além de proporcionar uma matriz interfacial que facilita interações com uma variedade de constituintes celulares hidrofóbicos e hidrofílicos (Flewelling & Hubbell, 1986; Seelig, Macdonald, & Scherer, 1987).

Para desempenhar suas funções de maneira adequada, estas membranas devem manter sua estrutura organizacional, que está diretamente relacionada com a preservação de suas propriedades físico-químicas.

Diversos agentes e condições caotrópicas podem interferir na integridade destas membranas, consequentemente gerando prejuízos a sua funcionalidade. Entretanto, as membranas são capazes de suportar certos níveis de ações ou processos que podem promover sua desestabilização organizacional. A capacidade biológica das membranas de manutenção da sua estrutura organizacional diante destes agentes ou condições caotrópicas é denominada de estabilidade (Cunha et al., 2007).

Os fatores que podem afetar a estabilidade das membranas são basicamente semelhantes aos que afetam a estabilidade de proteínas, tais como pH, temperatura, drogas, solutos estabilizadores e desestabilizadores (caotrópicos). Também podem promover alterações na estabilidade das membranas biológicas fatores mais específicos, como a concentração relativa dos constituintes da própria membrana (Murray & Granner, 2002).

A membrana do eritrócito é um modelo muito usado para estudo de membranas, pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelas (Murray & Granner, 2002) e também por constituir um modelo prático de estudo, uma vez que sua lise libera hemoglobina, que pode ser facilmente quantificada por espectrofotometria na região visível do espectro, além de sua obtenção utilizar de um processo minimamente invasivo ao doador (Nelson & Cox, 2008).

Uma das formas de analisar a estabilidade de membrana do eritrócito é em soluções com gradiente de concentração de NaCl (fragilidade osmótica eritrocitária ou FOE) (Cunha et al., 2007; de Freitas et al., 2010; de Freitas et al., 2008; Jain, 1986; Penha-Silva et al., 2007).

A lise ocorrida nestas soluções pode ser verificada pela liberação de hemoglobina no meio e quantificada por espectrofotometria na região visível do espectro. O perfil desta lise gera uma curva de regressão sigmoidal a partir da qual podemos avaliar a estabilidade das células (Cunha et al., 2007).

Este método, assim como os demais utilizados no estudo da estabilidade das membranas biológicas, baseia-se nos princípios da termodinâmica, em que se determina variação das propriedades de um sistema quando este passa de um estado de equilíbrio para outro. Se a variável tempo for introduzida nesta análise teremos assim um estudo cinético. A análise cinética da lise pode distinguir as influências de fatores cujos efeitos tenham diferentes velocidades de ação sobre a hemólise, embora em condições de incubação por tempo fixo esses efeitos sejam equivalentes.

A cinética de complexos biológicos mais definida e largamente estudada é aquela das enzimas. O estudo cinético das reações enzimáticas é comumente fundamentado na equação de Michaelis-Menten (Michaelis & Menten, 1913), que representa a dependência hiperbólica da velocidade inicial da reação com o aumento na concentração do substrato. O uso de um ajuste estatístico não linear hiperbólico permite a determinação da velocidade máxima (V_{max}) que a enzima pode atingir no estado de quase equilíbrio (ou estado estacionário), em que o substrato está presente em concentrações saturantes para o catalisador, e do ponto de meia transição da curva, onde se tem uma constante chamada K_M, que representa a concentração de subtrato em que a enzima atinge a metade da V_{max}. Pelo fato das constantes K_M e V_{max} serem muito significantes para a caracterização das enzimas, muitos tratamentos matemáticos foram desenvolvidos para determinação de seus valores. Estes tratamentos compreendem os métodos de linearização de Lineweaver-Burk (Lineweaver & Burk, 1934), de Hanes-Woolf (Hanes, 1932) e de Eadie-Hofstee (Eadie, 1942).

Os tratamentos matemáticos usados naqueles métodos clássicos de estudo de cinética enzimática têm sido usados na análise de diversos processos biológicos e fisiológicos. O presente trabalho usa da rotina de ajuste não linear hiperbólico para analisar a cinética de lise de eritrócitos.

MATERIAL E METODOS

Amostras de material biológico

O estudo foi desenvolvido utilizando sangue total humano cedido pelo Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas LABORMED, em Uberlândia, MG. O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo CEP-UFU 127/11).

As amostras consistiram de pessoas saudáveis, com 18 a 90 anos, sem histórico de consumo crônico de álcool e drogas. A coleta de sangue não foi um procedimento desenvolvido exclusivamente para o projeto, uma vez que, somente o sangue excedente coletado (material biológico de descarte) durante as rotinas de análises do laboratório é que foi repassado para o desenvolvimento do estudo.

As coletas de sangue na rotina do laboratório normalmente ocorrem após jejum noturno de 8 a12 horas. O sangue foi coletado, por punção intravenosa, diretamente em tubos evacuados contendo K_3EDTA a 0,1 g/dL como anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil).

Reagentes

Durante os procedimentos experimentais foi utilizado NaCl da marca Labsynth (Diadema, SP, Brasil) com grau de pureza de 99,5%, o qual foi devidamente corrigido para preparo de suas soluções.

Equipamentos

As medidas de volume foram realizadas em buretas de vidro refratário ou com auxílio de pipetas automáticas (Labsystems, modelo Finnpipette Digital, Helsinki, Finlândia). Para as medidas de massa foi utilizada balança digital de precisão (AND, modelo 870, Japão).

O controle de temperatura das incubações foi realizado em banho termostatizado (Marconi, modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil). A centrifugação foi

feita em centrifuga Hitachi Koki (modelo CF15RXII, Hitachinaka, Japão) e as leituras de absorvância em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV1650TC, Japão) com utilização do programa UV Probe 2.21.

Padronização do método para estudo da cinética de lise de eritrocitária

Os testes iniciais para padronização do método foram realizados em duplicata, utilizando 10 minitubos (Eppendorf®) contendo 1mL de solução de NaCl nas concentrações iniciais selecionadas (0,10; 0,30; 0,35; 0,40 e 0,50 g/dL). Estas soluções foram previamente pré-incubadas em banho termostatizado a 37 °C por 10 min. Após a pré-incubação foram adicionados 20 µL de sangue total em cada minitubo e após homogeneização e incubação, sob as mesmas condições de temperatura. A lise em cada tubo foi interrompida por meio do choque hipertônico, com adição de 1 ml de solução hipertônica de NaCl (5 g/dL), aos tempos de 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,5; 1,75; 2; 15 e 30 min. Após nova incubação por 30 min, sob as mesmas condições, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm e a 25 ºC. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos com pipeta automática e submetidos a leitura de absorvância a 540 nm.

A solução NaCl a 0,4 g/dL foi selecionada para os testes subquentes, que foram realizados sob as mesmas condições citadas acima, com modificação somente nos tempos analisados, os quais passaram a ser de 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 25 e 30 min.

Determinação da curva cinética de lise dos eritrócitos

Os parâmetros cinéticos da lise de eritrócitos humanos foram determinados por ajuste estatístico a uma hipérbole dada pela equação

$$A = \frac{A_{max} t}{t_{1/2} + t} \qquad (2.1),$$

em que **A** é a absorvância a 540 nm obtida a cada intervalo de tempo (**t**) considerado, $\mathbf{A_{max}}$ é o valor máximo de absorvância atingido no platô da curva, que representa a lise total dos eritrócitos, e $\mathbf{t_{1/2}}$ é o tempo transcorrido para ocorrência de metade da lise total ($\mathbf{A_{max}/2}$).

Análises estatísticas, cálculos e edição dos dados

As análises da cinética de lise foram feitas pela aplicação da rotina analítica do modelo cinético integrado (que tem a mesma equação que o modelo de Michaelis-Menten na forma não integrada), com a utilização do aplicativo GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), pré-selecionado para fazer remoção automática de possíveis pontos 'outlier'. As demais análises estatísticas (teste de normalidade, correlações de Spearman e ANOVA) foram feitas com a utilização do programa Origin 9.0 (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, EUA).

RESULTADOS

Os resultados dos testes iniciais para estudo da cinética de lise de eritrócitos, feitos em soluções de NaCl (a 0,1; 0,3; 0,35; 0,4 e 0,5 g/dL), com interrupção hipertônica da hemólise aos 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 15 e 30 min após início do processo, (**Figura 2.1**). O uso de NaCl a 0,4 g/dL proporcionou uma curva de lise mais gradativa, permitindo melhor análise do processo no intervalo de tempo considerado.

Em função disto, os testes subsequentes foram feitos em solução de NaCl a 0,4 g/dL. A análise da cinética de hemólise de cada paciente por ajuste hiperbólico permitiu a determinação dos valores de $\mathbf{A_{max}}$, que é o valor máximo de absorvância atingido no platô da curva e que representa a lise total dos eritrócitos, e $\mathbf{t_{1/2}}$, que é o intervalo de tempo capaz de promover metade da hemólise total ($\mathbf{A_{max}/2}$). Os ensaios feitos mostraram a existência de bastante variância nas variáveis cinéticas consideradas ($\mathbf{A_{max}}$ e $\mathbf{t_{1/2}}$) (**Figura 2.2**).

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar estatisticamente a normalidade dos valores de $\mathbf{t_{1/2}}$, $\mathbf{A_{max}}$ e das variáveis hematológicas e bioquímicas dos participantes do estudo. Os valores de $\mathbf{t_{1/2}}$, $\mathbf{A_{max}}$, idade, MCV, RDW, TG e VLDL-C não apresentam distribuições normais (**Tabela 1.1**).

Embora os dados da população total do estudo não terem apresentado normalidade, após a estratificação etária da amostra, os dois subgrupos obtidos (18-30 anos e acima de 30 anos) apresentaram normalidade em relação a todas as variáveis consideradas, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Uma comparação pelo uso de ANOVA mostrou que o subgrupo mais jovem apresentou valores significantemente maiores de $\mathbf{t_{1/2}}$, **RBC**, **RDW** e **HDL-C**, enquanto o grupo mais velho apresentou valores maiores de **VCM**, **HCM** e **Glu** (**Tabela 2.2**).

A **Figura 2.3** ilustra a variação da cinética de hemólise de um participante jovem em relação a um participante idoso. O valor de $t_{1/2}$ do participante jovem foi visivelmente maior que o valor de $t_{1/2}$ do participante idoso.

A existência de associações entre todas as combinações duas a duas das variáveis cinéticas, hematológicas e bioquímicas consideradas neste estudo, foi avaliada por correlação de Spearman (**Tabela 2.3**), uma vez houve ausência de normalidade na distribuição dos valores de muitas das variáveis consideradas no estudo (**Tabela 1.1**). Os valores de $\mathbf{t_{1/2}}$ apresentaram uma correlação negativa significante com os níveis de colesterol total (**t-C**) e correlação negativa limítrofe com os níveis de **LDL-C**. Por sua vez, os valores de $\mathbf{A_{max}}$ apresentaram correlações positivas significantes com os valores de **Hb**, **Ht**, **VCM**, **HCM** e **t-C**, além de uma correlação positiva limítrofe com os valores de **VLDL-C**.

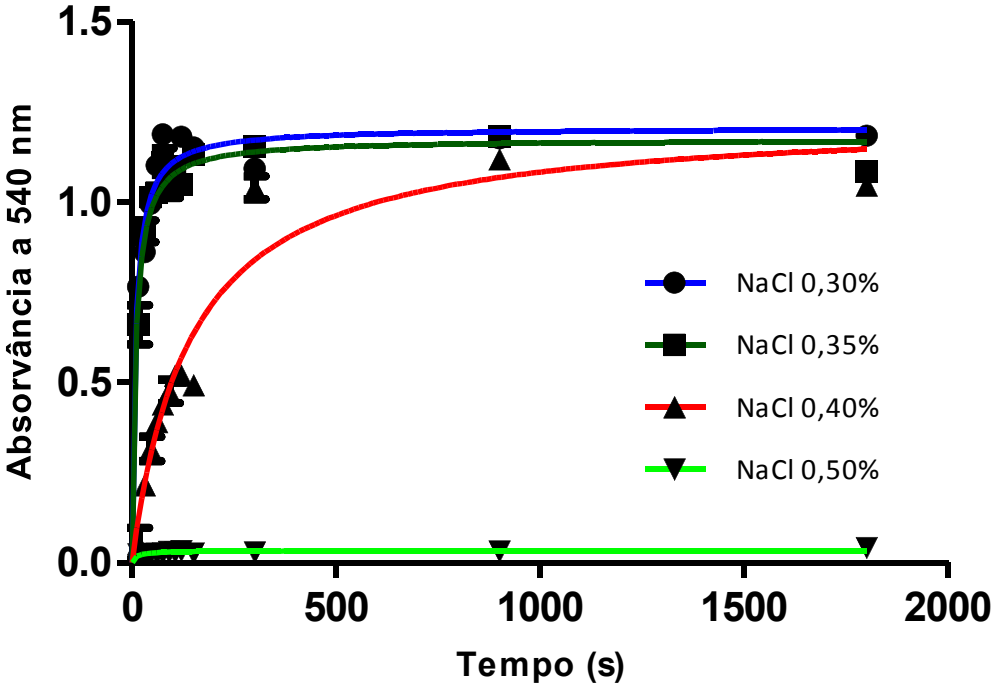

Figura 2.1. Cinética de hemólise em diferentes concentrações salinas (0,30; 0,35; 0,40 e 0,50 g/dL NaCl).

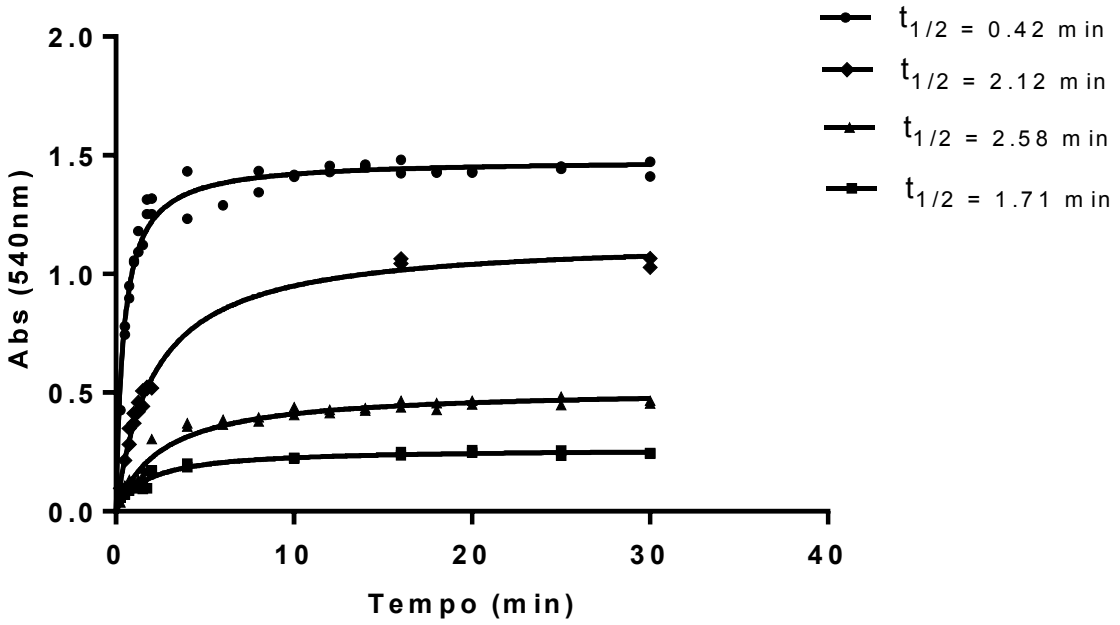

Figura 2.2. Cinética de hemólise a 0,4 g/dL de NaCl de quatro participantes do estudo, com variação nos valores de A_{max} e de $t_{1/2}$.

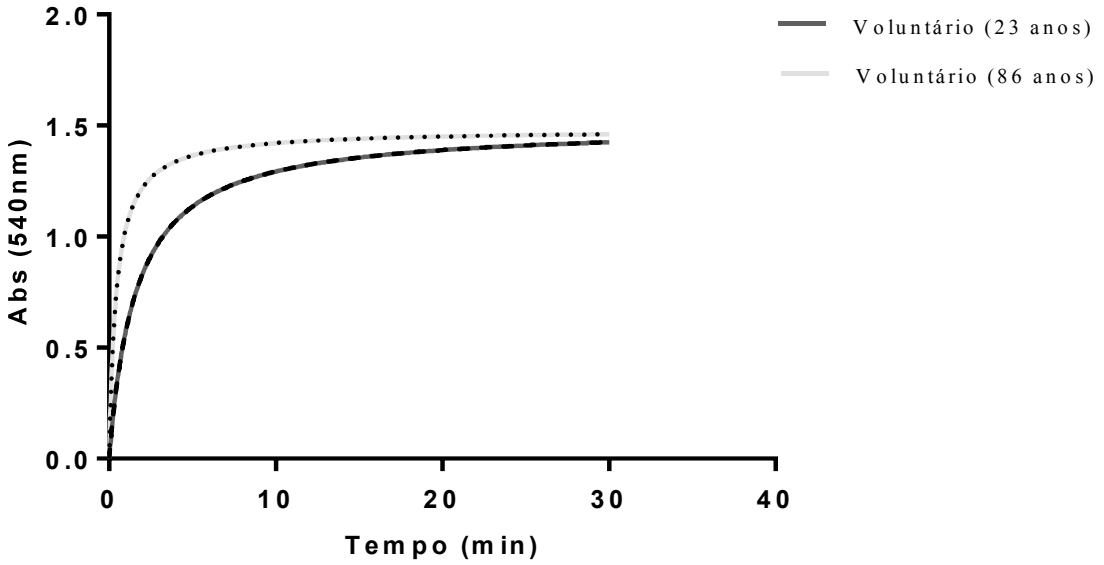

Figura 2.3. Variação da cinética de hemólise de um participante jovem (23 anos) em relação a um participante idoso (86 anos). O valor de $t_{1/2}$ do participante jovem (curva à direita) foi visualmente maior do que o valor de $t_{1/2}$ do participante idoso (curva à direita).

Tabela 2.1. Estatística descritiva dos dados experimentais coletados na população de estudo

	N	Média	SD	Mediana	Mínimo	Máximo	P
$t_{1/2}$ (min)	17	0,7915	0,7257	0,4996	0,0934	2,3015	0,007
A_{max} (ΔOD)	17	1,1209	0,3888	1,2183	0,2643	1,5015	0,001
Idade (anos)	17	40,4118	21,5524	30	18	86	0,042
Hb (g/dL)	17	14,1706	2,0170	14,5	9,6	17,8	0,983*
Ht (%)	17	43,0588	5,9867	43,3	30,8	55,2	0,994*
RBC ($x10^6$/mL)	17	4,8653	0,6574	4,83	3,89	6,27	0,590*
MCV (fL)	17	88,8647	9,5645	92,3	65,7	100,2	0,004
RDW (%)	17	14,1529	1,8221	13,2	12	18,9	0,038
MCH (pg)	17	29,2588	3,4298	30,1	21	33,5	0,008
MCHC (g/dL)	17	32,9059	0,7925	33	31,2	34	0,414*
Glu (mg/dL)	17	88,5529	15,8839	85	63	134	0,093*
TG (mg/dL)	17	100,4706	36,1347	94	57,2	183,1	0,015
VLDL-C (mg/dL)	17	20,2012	7,2232	18,9	11,4	36,62	0,024
LDL-C (mg/dL)	17	116,6871	28,8508	103,6	78,2	177	0,119*
HDL-C (mg/dL)	17	49,8588	13,7235	50,4	28,6	70,4	0,332*
t-C (mg/dL)	17	186,7471	31,2554	182	130,9	233,2	0,315*

*Ao nível de 0,05, os dados foram significantemente associados a uma distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk).

Tabela 2.2. Comparação dos grupos etários em relação às variáveis cinéticas, hematológicas e bioquímicas (média ± desvio-padrão)

Variáveis	18-30 anos (n = 9)	> 30 anos (n = 8)	p
Idade (anos)	23,11±4,54	59,87±14,85	<0,0001*
$t_{1/2}$ (min)	1,16±0,83	0,37±0,20	0,020*
A_{max} (ΔOD)	1,01±0,51	1,24±0,14	0,252
Hb (g/dL)	14,22±2,48	14,11±1,5	0,915
Ht (%)	43,58±7,57	42,48±3,98	0,717
RBC ($x10^6$/mL)	5,15±0,65	4,53±0,52	0,049*
VCM (fL)	84,61±11,1	93,65±4,34	0,047*
RDW (%)	15,33±1,77	12,83±0,41	0,001*
HCM (pg)	27,63±3,88	31,08±1,55	0,033*
CHCM (g/dL)	32,64±0,82	33,2±0,70	0,155
Glu (mg/dL)	81,28±10,9	96,73±17,21	0,041*
TG (mg/dL)	92,9±17,06	108,93±49,97	0,380
VLDL-C (mg/dL)	18,8±3,48	21,79±9,99	0,410
LDL-C (mg/dL)	105,47±23,12	129,30±30,8	0,089
HDL-C (mg/dL)	56,1±10,9	42,87±13,73	0,042*
t-C (mg/dL)	180,36±28,5	193,92±34,56	0,389

*Diferença estatisticamente significante (p <0,05) entre os grupos etários (one-way ANOVA). Ao nível de 0,05, todas as variáveis apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) nos subgrupos etários considerados no estudo.

Tabela 2.3. Matriz de correlação (Spearman) e significância entre os pares de variáveis

		$t_{1/2}$	A_{max}	Idade	Hb	Ht	RBC	VCM	RDW	HCM	CHCM	Glu	TG	VLDL-C	LDL-C	HDL-C	t-C
$t_{1/2}$	r																
	p	--															
A_{max}	r	-0.1520															
	p	0.5604	--														
Idade	r	-0.2184	0.0896														
	p	0.4000	0.7324	--													
Hb	r	-0.2612	0.7652*	-0.1621													
	p	0.3113	<0.001	0.5343	--												
Ht	r	-0.2843	0.7230*	-0.2589	0.9896*												
	p	0.2687	0.0010	0.3157	<0.0001	--											
RBC	r	0.1803	0.2342	-0.5304*	0.6742*	0.7125*											
	p	0.4887	0.3656	0.0285	0.0030	0.0013	--										
VCM	r	-0.2734	0.5923*	0.3947	0.3221	0.2636	-0.3221										
	p	0.2882	0.0122	0.1169	0.2074	0.3066	0.2074	--									
RDW	r	0.2626	-0.0577	-0.6173*	0.0964	0.1423	0.4727§	-0.2597									
	p	0.3086	0.8260	0.0083	0.7129	0.5858	0.0554	0.3142	--								
HCM	r	-0.3558	0.5141*	0.4159§	0.3579	0.2994	-0.2990	0.9386*	-0.3655								
	p	0.1610	0.0348	0.0969	0.1584	0.2431	0.2438	<0.0001	0.14915	--							
CHCM	r	-0.0994	0.1768	0.3792	0.2058	0.1093	-0.0565	0.2095	-0.4745§	0.3682							
	p	0.7041	0.4973	0.1333	0.4282	0.6763	0.8294	0.4198	0.0543	0.1459	--						
Glu	r	-0.2060	0.0883	0.6894*	0.0454	-0.0196	-0.1460	0.0325	-0.4150§	0.1191	0.2955						
	p	0.4276	0.7362	0.0022	0.8626	0.9404	0.5760	0.9014	0.0977	0.6489	0.2496	--					
TG	r	-0.1740	0.4044	0.1571	0.5212*	0.4779§	0.3998	-0.0294	0.2331	0.0061	0.2762	0.4917*					
	p	0.5042	0.1074	0.5472	0.0319	0.0523	0.1119	0.9107	0.3679	0.9814	0.2831	0.0450	--				
VLDL-C	r	-0.1226	0.4574§	0.1774	0.5546*	0.4966*	0.3926	0.0417	0.2180	0.0792	0.3569	0.4613§	0.9847*				
	p	0.6392	0.0649	0.4958	0.0209	0.0426	0.1190	0.8737	0.4008	0.7626	0.1597	0.0623	<0.0001	--			
LDL-C	r	-0.4534§	0.3137	0.3804	0.4108	0.3922	0.1410	0.0110	-0.2344	0.0994	0.1203	0.7541*	0.5931*	0.5518*			
	p	0.0676	0.2201	0.1320	0.1014	0.1195	0.5893	0.9665	0.3653	0.7043	0.6455	<0.001	0.0121	0.0217	--		
HDL-C	r	-0.0147	0.3480	-0.5571*	0.2538	0.3186	0.2207	0.1619	0.3718	0.0074	-0.5930*	-0.5849*	-0.2328	-0.2477	-0.1838		
	p	0.9553	0.1710	0.0202	0.3256	0.2126	0.3946	0.5348	0.1417	0.9776	0.0121	0.01365	0.3685	0.3378	0.4800	--	
t-C	r	-0.5221*	0.5270*	0.2564	0.5273*	0.52451*	0.1128	0.2489	-0.1939	0.2896	-0.0332	0.5248*	0.4657§	0.4464§	0.8971*	0.1593	
	p	0.0316	0.0297	0.3204	0.0296	0.0307	0.6664	0.33532	0.4559	0.2598	0.8995	0.0305	0.0596	0.0725	<0.0001	0.5414	--

*Correlações estatisticamente significantes ($p<0.05$)

§ Correlações limítrofes ($0.05<p<0.10$)

DISCUSSÃO

Padronização do método cinético

A padronização do método cinético para análise da estabilidade de membranas foi desenvolvido a partir de uma série de testes preliminares com diversas modificações no decorrer de sua padronização. Estas modificações foram realizadas não somente para validar o método, mas a fim de torná-lo uma ferramenta prática e viável para ser utilizada em outros estudos. O desenvolvimento do método cinético foi baseado nos princípios aplicados no teste de fragilidade osmótica.

Os testes iniciais para padronização do método foram realizados a partir de uma seleção prévia de quatro concentrações salinas (0,3; 0,35; 0,4 e 0,5 g/dL NaCl), próximas da região intermediária de uma típica curva de lise obtida em condições de incubação por tempo fixo, e outra concentração bem além da menor concentração salina (0,1 g/dL NaCl) onde ocorre lise completa nas mesmas condições (**Figura 2.1**). Na falta de instrumentação passível de analisar a lise em tempo real, foi desenvolvido um método de interrupção da lise, a momentos previamente determinados do ensaio, com a utilização de choque hipertônico.

As curvas obtidas nos testes com as soluções de 0,3 e 0,35 g/dL de NaCl não se mostraram adequadas para padronização do método proposto, isto porque estas curvas atingiram rapidamente o platô ($\mathbf{A_{max}}$), o que ocorreu entre 1 e 2 min. A solução de NaCl a 0,50 g/dL também não apresentou um perfil adequado, por provocar uma baixa taxa de lise e não fornecer uma curva com transição entre pontos de menor e maior lise.

Dentre as soluções testadas, a solução de NaCl a 0,4 g/dL foi selecionada para os testes subquentes, por apresentar um perfil de lise mais gradativo e adequado para um estudo cinético (**Figura 2.1**). Os ensaios preliminares também permitiram uma melhor definição dos tempos de lise a serem considerados, os quais passaram a ser de 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 25 e 30 min, a fim de melhor caracterizar o perfil do processo.

O uso de NaCl a 0,40 g/dL tornou possível a obtenção de curvas cinéticas com perfis suficientemente diferentes, entre diferentes indivíduos, gerando nos valores de $\mathbf{t_{1/2}}$ e também de $\mathbf{A_{max}}$ a variância necessária para analisar a influência de possíveis variáveis moduladoras (**Figura 2.3**).

Aplicação do método cinético na população de estudo

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos constituem biomarcadores importantes para aulixiar no diagnóstico do estado nutricional, de doenças e da resposta aos tratamentos (Hausman, Fischer, & Johnson, 2012). Neste trabalho, os valores desses parâmetros foram caracterizados na população de estudo (**Tabela 2.1** e **2.3**) e correlacionados com $\mathbf{t_{1/2}}$ e $\mathbf{A_{máx}}$ para investigar se essas variáveis cinéticas seriam válidas para estudo da influência de variáveis moduladoras do comportamento de eritrócitos.

Os valores de $\mathbf{A_{máx}}$, que representam a absorvância máxima na cinética de hemólise, apresentaram as correlações positivas esperadas com Hb, Ht e HCM (**Tabela 2.3**). Além disso, $\mathbf{A_{max}}$ também apresentou uma correlação positiva significante com **t-C** e uma correlação positiva limítrofe com **VLDL-C**.

A variável cinética $\mathbf{t_{1/2}}$ não apresentou correlação com as variáveis hematológicas, mas apresentou uma correlação negativa significante com **t-C** (**Tabela 2.3**). Isso deve significar que a elevação dos níveis de colesterol, dentro dos limites de variação da colesterolemia dos participantes do estudo, está contribuindo para acelerar a cinética de hemólise, o que estaria ocorrendo entre os indivíduos mais velhos, uma vez que t-C apresentou a conhecida relação positiva com a idade.

O grupo de pessoas de 40 a 90 anos apresentou menor contagem de eritrócitos (RBC), corroborando com dados da literatura que mostram a diminuição na quantidade de RBC com o envelhecimento (Hausman et al., 2012; Marks & Glader, 2005). Além disso, os valores de VCM aumentaram com a idade. VCM corresponde à média do volume dos eritrócitos e se encontra aumentado quando há deficiência nutricional de folato e/ou cobalamina, que é comum em pessoas mais velhas (Alves de Rezende, Coelho, Oliveira, & Penha Silva, 2009). Por outro lado, o aumento no volume das células pode indicar maior taxa de renovação dos eritrócitos, uma vez que eritrócitos mais jovens são maiores (Ganzoni, Oakes, & Hillman, 1971; Griggs, Weisman, & Harris, 1960). De fato, estudos reportaram menor tempo de vida do eritrócito em pessoas mais velhas (Shperling & Danon, 1990).

Em relação às variáveis bioquímicas, os maiores valores de glicose nas pessoas mais velhas podem estar relacionados à glicação de proteínas e diminuição na fluidez da membrana (Bryszewska & Szosland, 1988), levando a alteração da sua estrutura e

função biológica (Shin, Ku, Suh, & Singh, 2008). Sendo assim, os mecanismos de manutenção da estabilidade da membrana seriam afetados, acarretando os menores valores de $\mathbf{t_{1/2}}$ vistos no grupo acima de 30 anos. De fato, De Arvelos e colaboradores encontraram menor estabilidade osmótica eritrocitária em indivíduos com maior glicemia (de Arvelos et al., 2013).

Em geral, indivíduos mais velhos apresentam os lipídios plasmáticos alterados, com altos níveis de LDL-C e baixos valores de HDL-C (Hausman et al., 2012). Como a composição da membrana do eritrócito é influenciada pelos níveis plasmáticos de lipídios (Bhandaru, Srinivasan, Radhakrisnamurthy, & Berenson, 1982), excesso de colesterol pode alterar as propriedades fisicoquímicas da membrana celular (R. A. Cooper, Durocher, & Leslie, 1977; Hui & Harmony, 1979). Nesse sentido, os valores de $\mathbf{t_{1/2}}$ e de $\mathbf{A_{máx}}$ do presente trabalho tiveram correlação negativa e positiva com t-C, respectivamente, e os menores índices de HDL-C foram observados nos indivíduos mais velhos.

No trabalho de Hui e Harmony, eritrócitos incubados por determinado tempo com LDL-C tiveram modificação morfológica, passando da característica forma bicôncava para esferócitos (Hui & Harmony, 1979). Este fato poderia contribuir para desestabilização da membrana do eritrócito em meio hipotônico e justificar o menor $\mathbf{t_{1/2}}$ e maior $\mathbf{A_{máx}}$ com o aumento do colesterol total no presente trabalho. Porém, são necessárias investigações com número maior de voluntários para confirmar os resultados e possibilitar análises estatísticas mais complexas, a exemplo das análises multivariadas.

CONCLUSÕES

O estudo da cinética de lise de eritrócitos em solução de NaCl a 0,4 g/dL, com interrupção da lise com solução hipertônica de NaCl, gerou um perfil gradativo e adequado para a obtenção das constantes cinéticas $\mathbf{A_{max}}$ e $\mathbf{t_{1/2}}$.

As constantes cinéticas $\mathbf{A_{max}}$ e $\mathbf{t_{1/2}}$ apresentaram variâncias suficientemente elevadas entre diferentes indivíduos para serem usadas no estudo da influência de variáveis moduladoras da composição e/ou do comportamento de eritrócitos.

A variável $\mathbf{A_{max}}$, que representa a maior concentração de hemoglobina do participante, apresentou as correlações esperadas com as variáveis hematológicas **Hb**, **Ht** e **HCM**.

A variável $\mathbf{t_{1/2}}$ foi maior no subgrupo de participantes mais jovens em relação aos mais velhos. Essa diferença pode ser suportada pela correlação negativa significante entre $\mathbf{t_{1/2}}$ e **t-C**, uma vez que **t-C** apresentou a conhecida relação positiva com a idade dos participantes.

Em suma, as variáveis cinéticas obtidas nas condições experimentais padronizadas neste estudo são válidas para estudo dos fatores que afetam a composição e/ou o comportamento de eritrócitos.

Referências

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M. Estrutura da membrana. **Molecular Biology of the Cell** (5th ed.). New York: Garland, cap.4, p.583-615, 2008.

ALVES DE REZENDE, C. H.; COELHO, L. M.; OLIVEIRA, L. M.; PENHA SILVA, N. Dependence of the geriatric depression scores on age, nutritional status, and haematologic variables in elderly institutionalized patients. **J Nutr Health Aging**, 13(7), 617-621, 2009.

BEGUM, A. N.; & TERAO, J. Protective effect of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. **Biosci Biotechnol Biochem**, 66(2), 398-403, 2002.

BERNADINO NETO, M. **Análise de correlações entre estabilidade de membrana de eritrócitos, níveis séricos de lipídeos e varáveis hematimétricas.** (Doutorado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

BHANDARU, R.; SRINIVASAN, S. R.; RADHAKRISNAMURTHY, B.; BERENSON, G. S. Effects of diabetes and high fat-high cholesterol diet on plasma lipid levels and on erythrocyte membrane composition. **Atherosclerosis**, 42(2-3), 263-272, 1982.

BOROWITZA, L.J.; & BROWN, A.D. The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga Dunaliella: the role of glycerol as a compatible solute. **Archiv fur Mikrobiologie**, 96, 37-52, 1974.

BRIGGS, G. E.; & HALDANE, J. B. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. **Biochem J**, 19(2), 338-339, 1925.

BRIGHT, N. A.; GRATIAN, M. J.; LUZIO, J. P. Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. **Curr Biol**, 15(4), 360-365, 2005.

BRYSZEWSKA, M.; SZOSLAND, K. Association between the glycation of erythrocyte membrane proteins and membrane fluidity. **Clin Biochem**, 21(1), 49-51, 1998.

CAMPBELL, M.K.; & FARRELL, S.O. Lipídeos e proteínas estão associados a membranas biológicas. **Bioquímica** (5 th ed) São Paulo: Thomsom, cap.8, p.197-225, 2007.

CARTRON, J. P.; COLIN, Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. **Transfus Clin Bio**l, 8(3), 163-199, 2001.

CARVALHO, N. M. F.; PIRES, B. M.; ANTUNES, O. A. C.; FARIA, R. B. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. **Quimica Nova**, 33(7), 1607-1611, 2010.

CAVUSOGLU, E.; CHOPRA, V.; GUPTA, A.; BATTALA, V. R.; POLUDASU, S.; ENG, C.; MARMUR, J. D. Relation between red blood cell distribution width (RDW) and all-cause mortality at two years in an unselected population referred for coronary angiography. **International Journal of Cardiology,** 141(2), 141-146, 2010.

CHABANEL, A.; FLAMM, M.; SUNG, K. L.; LEE, M. M.; SCHACHTER, D.; & CHIEN, S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophys J**, 44(2), 171-176, 1983.

CHEN, X.; & GROSS, R. W. Phospholipid subclass-specific alterations in the kinetics of ion transport across biologic membranes. **Biochemistry**, 33(46), 13769-13774, 1994.

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

COOPER, R. A.; DUROCHER, J. R.; LESLIE, M. H. Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. **J Clin Invest**, 60(1), 115-121, 1977.

COOPER, R.A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital**, 297(7), 371-377, 1977.

COOPER, R.A.; ARNER, E.C.; WILEY, J.S.; & SHATTIL, J.S. Modifications of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersion. **J Clin Invest**, 55, 115-125.

CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 48(1), 27-32, 1993.

CULLIS, P. R.; DE KRUIJFF, B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. **Biochim Biophys Acta**, 559(4), 399-420, 1979.

CUNHA, C. C.; ARVELOS , L. R., Costa, J. O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **J Bioenerg Biomembr**, 39(4), 341-347,2007.

DE ARVELOS, L. R.; ROCHA, V. C.; FELIX, G. P.; DA CUNHA, C. C.; BERNADINO NETO, M.; DA SILVA GARROTE FILHO, M.; PENHA-SILVA, N. Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. **J Membr Biol,** 246(3), 231-242, 2013.

DE FREITAS, M. V.; DE OLIVEIRA, M. R.; DOS SANTOS, D. F.; DE CASSIA MASCARENHAS NETTO, R.; FENELON, S. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. **J Membr Biol***,* 233(1-3), 127-134, 2010.

DE FREITAS, M. V.; NETTO RDE, C.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M.; COSTA, J. O.; FIRMNINO, C. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicol In Vitro**, 22(1), 219-224, 2008.

Di, L.; LIU, W.; LIU, Y.; WANG, J. Y. Effect of asymmetric distribution of phospholipids in ghost membrane from rat blood on peroxidation induced by ferrous ion. **FEBS Lett**, 580(2), 685-690, 2006.

DWIGHT, J. F.; MENDES RIBEIRO, A. C.; HENDRY, B. M. Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. **Clin Chim Acta**, 256(1), 53-63, 1996.

EADIE, G. S. The inhibition of cholinesterase by physostigmine anda prostigmine. **J. Biol. Chem**, 146, 85-93, 1942.

EVANS, E. A.; HOCHMUTH, R. M. A solid-liquid composite model of the red cell membrane. **J Membr Biol**, 30(4), 351-362, 1977.

FELKER, G. M.; ALLEN, L. A.; POCOCK, S. J.; SHAW, L. K.; McMURRAY, J. J. V.; PFEFFER, M. A.; GRANGER, C. B. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure - Data from the CHARM program and the Duke Databank. **Journal of the American College of Cardiology**, 50(1), 40-47, 2007.

FISCHER, T. M.; HAEST, C. W. M.; STOHR, M.; KAMP, D.; DEUTICKE, B. Selective Alteration of Erythrocyte Deformability by Sh-Reagents - Evidence for anInvolvement of Spectrin in Membrane Shear Elasticity. **Biochimica Et Biophysica Acta**, 510(2), 270-282, 1978.

FLEWELLING, R. F.; HUBBELL, W. L. Hydrophobic ion interactions with membranes. Thermodynamic analysis of tetraphenylphosphonium binding to vesicles. **Biophys J**, 49(2), 531-540, 1986.

FONSECA, L. C.; ARVELOS, L. R.; NETTO, R. C.; LINS, A. B.; GARROTE-FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. **J Bioenerg Biomembr**, 42(5), 413-418, 2010.

GALLAGER, P.G.; FORGET, B.G., & LUX, S.E. Disorders of Erythrocyte Membrane. In Nathan DG, Oski FA & Orkin SH (Eds.), **Hematology of Infancy and Childhood** (5 ed., pp. 544-664). Philadelphia: WB Saunders, 1998.

GANZONI, A. M.; OAKES, R.; HILLMAN, R. S. Red cell aging in vivo. **J Clin Invest**, 50(7), 1373-1378, 1971.

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

GRIGGS, R.C.; WEISMAN, R.; HARRIS, J.W. Alterations in osmotic and mechanical fragility related to in vivo erythrocyte aging and splenic sequestration in hereditary spherocytosis. **J Clin Invest**, 39(1), 89-101, 1960.

HANES, C.S. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **Biochem. J.***,* 26(5), 1406–1421, 1932.

HAUSMAN, D. B.; FISCHER, J. G.; JOHNSON, M. A. Protein, lipid, and hematological biomarkers in centenarians: definitions, interpretation and relationships with health. **Maturitas**, 71(3), 205-212, 2012.

HUI, D. Y.; HARMONY, J. A. Interaction of plasma lipoproteins with erythrocytes. I. Alteration of erythrocyte morphology. **Biochim Biophys Acta**, 550(3), 407-424, 1979.

JAIN, N. C. Hematology techniques. In N. C. Jain (Ed.), **Shalm's Veterinary Hematology** Philadelphia: Lea & Febiger, 64-71, 1986.

JAROLIM, P.; RUBIN, H. L.; ZAKOVA, D.; STORRY, J.; REID, M. E. Characterization of seven low incidence blood group antigens carried by erythrocyte band 3 protein. **Blood**, 92(12), 4836-4843, 1998.

KIM, D.; CLAPHAM, D. E. Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. **Science**, 244(4909), 1174-1176, 1989.

KOTER, M.; BRONCEL, M.; CHOJNOWSKA-JEZIERSKA, J.; KLIKCZYNSKA, K.; FRANIAK, I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. **Eur J Clin Pharmacol**, 58(8), 501-506, 2002.

LEMOS, G. S. D.; MARQUEZ-BERNADES, L. F.; ARVELOS, L. R.; PARAISO, L. F.; PENHA-SILVA, N. Influence of Glucose Concentration on the Membrane Stability of Human Erythrocytes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 61(3), 531-537, 2011.

LINEWEAVER, H., & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.** , 56, 658-666, 1934.

LIU, S. C.; PALEK, J. Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. **Nature**, 285(5766), 586-588, 1980.

LIU, W.; GUO, X.; GUO, R. The interaction between hemoglobin and two surfactants with different charges. **Int J Biol Macromol**, 41(5), 548-557, 2007.

LODISH, H.; BERK, A; KAISER, C.A.; KRIEGER, M. P.; SCOTT, M.P.; BRETSCHER, A.; MATSUDARIA, P.T. Molecular Cell Biology (W.H.Freeman & Co Ltd Ed. 6 ed.), 2007.

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

MARKS, P.W.; GLADER, B. Approach to anemia in the adult and child. . In Hoffman R., Jr Benz, S.J. Shattil, B. Furie, H.J. Cohen, L.E Silberstein & P. McGlave (Eds.), **Hematology: basic principles and practice** (4th ed.). Philadelphia: Elsevier, 2005.

MARTINEZ, M.; VAYA, A.; MARTI, R.; GIL, L.; LUCH, I.; CARMENA, R.; AZNAR, J. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. **Thromb Res**, 83(5), 375-388, 1996.

MICHAELIS, L.; & MENTEN, M. L. Die kinetik der Invertinwirkung. **Biochem Biochem Z**., 49, 333-369, 1913.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A.; SHOHET, S. B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. **Semin Hematol**, 20(3), 225-242, 1983.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, 112(10), 3939-3948, 2008.

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

MULLER, S.; ZIEGLER, O.; DONNER, M.; DROUIN, P.; STOLTZ, J. F. Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. **Atherosclerosis**, 83(2-3), 231-237, 1990.

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

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K. Membranas: estrutura, montagem e função. In: GRANNER, D. K.; MAYES, P. A., et al (Ed.). **Harper's Biochemistry**. São Paulo: Atheneu Editora, cap.5, pg. 422-442, 2002.

NELSON, D.L., & COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry** (Worth Ed. 5 ed.). New York, 2008.

NIKOLOPOULOS, D., & MANETAS, Y. (1991). Compatible solutes and in vitro satability of salsola soda enzymes: proline incompatibility. **Phytochemistry**, 30, 411-413.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L. R.; CUNHA, C. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A.; GOUVEIA-E-SILVA, L. F.; GARROTE-FILHO, M. S.; DE FREITAS REIS, F. G. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, 73(1), 23-29, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C. B.; DE FREITAS REIS, F. G.; DA COSTA HUSS, J. C.; DE SOUZA, T. M.; DE FREITAS, M. V.; NETTO, R. C. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mech Ageing Dev**, 128(7-8), 444-449, 2007.

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

REID, M. E.; MOHANDAS, N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. **Semin Hematol**, 41(2), 93-117, 2004.

ROTHMAN, J. E.; ORCI, L. Budding vesicles in living cells. **Sci Am**, 274(3), 70-75, 1996.

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

SCHICK, B. P.; & SCHICK, P. K. Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. **Biochim Biophys Acta**, 833(2), 281-290, 1985.

SEELIG, J.; MACDONALD, P. M.; & SCHERER, P. G. Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. **Biochemistry**, 26(24), 7535-7541, 1987.

SHIN, S.; KU, Y. H.; SUH, J. S.; & SINGH, M. Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media. **Clin Hemorheol Microcirc**, 38(3), 153-161, 2008.

SHPERLING, T.; & DANON, D. Age population distribution of erythrocytes in young and old healthy donors. **Exp Gerontol**, 25(5), 413-422, 1990.

SINGER, S. J.; & NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, 175(4023), 720-731, 1972.

SMITH, D. K.; & PALEK, J. Sulfhydryl reagents induce altered spectrin self-association, skeletal instability, and increased thermal sensitivity of red cells. **Blood**, 62(6), 1190-1196, 1983.

STORRY, J. R. A review: modification of the red blood cell membrane and its application in blood group serology. **Immunohematology**, *16*(3), 101-104, 2000.

STORRY, J. R. Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. **Immunohematology**, 20(4), 206-216, 2004.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Adv Protein Chem**, 23, 121-282, 1968.

TZIAKAS, D.; CHALIKIAS, G.; GRAPSA, A.; GIOKA, T.; TENTES, I.; KONSTANTINIDES, S. Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. **Clin Hemorheol Microcirc**, 51(4), 243-254, 2012.

VAN DEN AKKER, E.; SATCHWELL, T. J.; WILLIAMSON, R. C.; TOYE, A. M. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. **Blood Cells Mol Dis**, 45(1), 1-8, 2010.

VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; & MARES-GUIA, M. Membranas e transporte. **Bioquímica celular e biologia molecular** (2ª ed.). São Paulo: Atheneu, cap. 8, p. 127-145, 1996.

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

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.