



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

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SALINA SOBRE A ESTABILIDADE
DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SOLUÇÕES DE ETANOL**

Estudante: **Rafael Lopes Pena de Sousa**
Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

UBERLÂNDIA, MG

2008



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

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SALINA SOBRE A ESTABILIDADE
DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SOLUÇÕES DE ETANOL**

Estudante: **Rafael Lopes Pena de Sousa**
Orientador: **Professor Dr. Nilson Penha-Silva**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Bioquímica (área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- S725e Sousa, Rafael Lopes Pena de, 1983-
 Efeito da concentração salina sobre a estabilidade de eritrócitos
 humanos em soluções de etanol / Rafael Lopes Pena de Sousa. – 2008.
 37 f.: il.
- Orientador: Nilson Penha-Silva.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
 grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
1. Membranas - Células - Teses. 2. Eritrócitos - Teses. I. Penha-Silva,
 Nilson. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
 Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 576.314

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

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SALINA SOBRE A ESTABILIDADE
DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SOLUÇÕES DE ETANOL**

Estudante: **Rafael Lopes Pena de Sousa**

Comissão examinadora

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

Examinador: Professora Dra. **Veridiana de Melo Rodrigues Ávila** (UFU)

Examinador: Professor Dr. **Fernando Barbosa Júnior** (USP)

Data da defesa: 30/06/2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para elaboração da dissertação de mestrado foram contempladas.

Professor Dr. Nilson Penha-Silva
(Orientador)

DEDICATÓRIA

A Jesus Cristo,
motivo de minha idolatria,
e a Fernando Pena
(*in memoriam*),
motivo da minha existência e orgulho.

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, que me condicionou, aumentando cada dia a minha fé, colocando em minha vida anjos que me resguardaram e fizeram de um projeto de vida uma realidade.

Ao meu eterno e amado pai, Fernando Pena, que sem dúvida foi e sempre será a grande alavanca que impulsionou minha vida profissional e meu caráter e que infelizmente não está presente para desfrutar conosco de mais essa realização. Amo-te pai!

A minha mãe, Silvia, minha paixão e exemplo de humildade, inteligência, sabedoria, domínio próprio e amor para comigo. Sem você jamais teria conseguido.

A minha esposa, Jaqueline, maravilhosa, e ao meu filho, Samuel, por transformar os dias difíceis que passamos em satisfação e felicidade mútua e por encherem minha vida de alegria.

Aos meus irmãos Fernanda e Gustavo obrigado pela torcida.

Minha avó Arlinda e minha tia Dayse, que mesmo de longe torceram e oraram para que tudo desse certo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, por ter me aceito como estudante e possibilitado a condução desse trabalho.

Ao professor Dr. Nilson Penha-Silva, meu sincero carinho e admiração por sua pessoa que, apesar de todos os obstáculos e dificuldades enfrentadas, sempre foi uma rocha onde foi possível construir de maneira segura o conhecimento necessário para o início e término deste trabalho.

A Lubia e ao Alan, por cederem além de sua casa seus corações e seu apoio para a realização deste trabalho.

Às amigas especiais Lúbia Cristina Fonseca e Maria Thereza Alves Batista, por confiar e acreditar que essa realização fosse possível, pela bondade e imensa ajuda durante a realização dos experimentos.

Ao amigo Professor Paulo, que tantas vezes me motivou e me substituiu no trabalho; sem você não teria conseguido.

Ao Professor Ricardo Carvalho, pelos conselhos e oportunidade de desenvolver e aplicar meu conhecimento profissional.

À Júnia de Oliveira Costa pelo apoio inestimável na geração deste trabalho

Aos demais colegas de laboratório, pela ajuda oportuna em inúmeros momentos.

A todos aqueles que participaram da realização deste trabalho.

Que Jesus Cristo abençoe a todos!

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.....	viii
Apresentação.....	01
Capítulo 1 (Fundamentação teórica)	02
Introdução	03
Macro-estados morfológicos de eritrócitos	04
Efeitos do etanol sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos	04
Considerações finais	05
Referências	06
Capítulo 2 (Trabalho experimental)	08
Resumo	09
Abstract	10
Introdução	11
Material e métodos	16
Resultados	18
Discussão	30
Conclusões	33
Referências	34

ABREVIATURAS

D	Desnaturante
D ₅₀	Concentração de etanol que produz 50% de hemólise
dD	Amplitude da curva de transição sigmoidal de lise dos eritrócitos
dS	Amplitude da curva de transição sigmoidal de estabilização dos eritrócitos
dX	Amplitude da transição sigmoidal
h	Altura da curva de transição sigmoidal
R	Estado morfológico relaxado dos eritrócitos
RBC	Eritrócitos
S	Estabilizante
S ₅₀	Concentração de etanol que produz 50% de estabilização dos eritrócitos
T	Estado morfológico tenso ou apertado dos eritrócitos

APRESENTAÇÃO

Todos os complexos organizacionais biológicos dependem da preservação de sua estrutura para exercer suas funções específicas.

À capacidade do complexo biológico resistir às alterações ambientais que promoveriam a perda de suas funções em consequência de alterações em sua estrutura nós chamamos de estabilidade.

A natureza tem um arsenal de estratégias para estabilizar esses complexos biológicos contra a agressão de fatores que a própria natureza também fornece. Assim, a ação de agentes estabilizantes é contraposta pela ação de agentes caotrópicos, que induzem a desorganização da estrutura do complexo organizacional.

Alterações na composição do solvente podem afetar a estabilidade desses complexos, tanto no sentido de promover sua estabilização quanto no sentido de promover sua desestabilização.

Esse trabalho foi desenvolvido em um laboratório que têm estudado dualismo das condições ambientais sobre a organização e estabilidade de complexos biológicos.

Esses estudos compreendem os efeitos do etanol sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos. O etanol é um agente caotrópico, que promove desorganização da estrutura de membranas de eritrócitos, mas que ao mesmo tempo também promove um aumento da osmolaridade do meio, que é reconhecidamente um fator estabilizante de proteínas e membranas.

No presente trabalho, nós estudamos o efeito da alteração da concentração salina sobre a ação caotrópica do etanol na membrana de eritrócitos humanos.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

EFEITO DO ETANOL SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS

INTRODUÇÃO

A estabilidade de uma membrana biológica é essencial para o exercício de suas funções. A estabilidade de uma membrana aumenta com o aumento na concentração de colesterol e fosfolípidos ricos em ácidos graxos saturados e diminui com a diminuição na concentração de colesterol e fosfolípidos ricos em ácidos graxos insaturados. Entretanto, a falta ou o excesso de estabilidade irá comprometer suas funções [PENHA-SILVA, 2008].

Agentes caotrópicos como extremos de pH e temperatura, estresse hipotônico, uréia, hidrócloro de guanidina e etanol desestabilizam a membrana, induzindo um estado de desorganização, pelo qual têm maior afinidade. Por outro lado, a estabilidade de uma membrana biológica pode ser aumentada por condições favoráveis como pH e temperatura ótimos, isotonicidade e a presença de solutos protetores denominados osmólitos.

Muitos organismos e células acumulam osmólitos ou solutos osmoprotetores (pequenas moléculas orgânicas) [YANCEY e SOMERO, 1979; YANCEY et al., 1982]. Estes solutos aumentam a estabilidade termodinâmica de proteínas, preservando as suas funções [SANTORO et al., 1992; TIMASHEFF, 1993].

Pouco se sabe sobre o processo de estabilização desencadeado pelos osmólitos sobre as membranas biológicas. Acredita-se que o efeito solvofóbico ou osmofóbico [BOLEN e BASKAKOV, 2001; TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1998] utilizado para explicar a estabilização de proteínas por co-solventes possa ser aplicado ao processo de estabilização de membranas biológicas [BERNARDINO-NETO, 2006; FINOTTI, 2006].

Os osmólitos podem ser classificados nas seguintes categorias: 1) metilaminas, como TMAO (óxido de trimetilamina), betaína, sarcosina, 2) aminoácidos (alanina, prolina) e seus derivados e 3) álcoois polihidroxílicos, como glicerol, sacarose e trealose [YANCEY et al., 1982].

O estudo da estabilidade de membrana utilizando eritrócitos torna-se promissor, devido à hemólise desencadeada por estresses ambientais, liberando hemoglobina, a qual pode ser quantificada por espectrofotometria em

540 nm. A absorção de luz nesse comprimento de onda (A_{540nm}) é proporcional à hemólise (extensão da lise dos eritrócitos).

MACRO-ESTADOS MORFOLÓGICOS DE ERITRÓCITOS

Os eritrócitos podem existir em dois macro-estados morfológicos, que foram denominados de **R** (relaxado ou expandido) e **T** (tenso ou condensado). O estado **R** é encontrado naturalmente no sangue e o estado **T** está presente em condições de elevada osmolaridade [PENHA-SILVA et al., 2008]. É possível que haja algum nível de equilíbrio entre estes estados, porque os eritrócitos compactados podem retornar ao estado morfológico expandido quando o excesso de soluto é diluído [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996; DE LOECKER et al., 1993; PELLERIN-MENDES et al., 1997].

EFEITOS DO ETANOL SOBRE A ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS

O etanol, estrutura anfifílica, em concentrações elevadas na presença de solução salina promove uma diminuição progressiva da constante dielétrica do meio e aumenta a magnitude das forças de atração entre as cargas opostas. Por outro lado, diminui a intensidade da força hidrofóbica, com atenuação das forças atrativas de van der Waals. Em baixas concentrações, este soluto pode apresentar efeito protetor sobre os eritrócitos contra a hemólise hipotônica [SEEMAN, ROTH, SCHNEIDER, 1971].

Um aumento gradativo na concentração de etanol promove lise do estado **R**, o que se deve à ação caotrópica do etanol [CUNHA et al., 1997; PENHA-SILVA et al., 2008].

Entretanto, com uma elevação mais expressiva na concentração alcoólica, os eritrócitos sofrem estabilização, por compactação, com a geração do estado morfológico **T**. Essa estabilização é fundamentada na ação do etanol como um osmólito. Há uma concentração crítica de etanol em que os eritrócitos

são estabilizados, mas além da qual os eritrócitos também sofrerão lise. De fato, uma elevação ainda mais expressiva na concentração de etanol leva à lise do estado T [CUNHA et al., 1997; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; PENHA-SILVA et al., 2008].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O etanol congrega propriedades caotrópicas, o que prevalece em mais baixas concentrações, com uma capacidade de estabilização de complexos biológicos, fundamentada na ação como osmólito, o que prevalece em concentrações intermediárias daquele soluto. Além dessas concentrações intermediárias críticas, aumentos na concentração de etanol também vão promover diminuição da estabilidade de eritrócitos.

REFERÊNCIAS

BAKALTCHEVA, I.B.; ODEYALE, C.O.; SPARGO, B.J. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1280, n. 1, p. 73-80, 1996.

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

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

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

DE LOECKER, R.; GOSENS, W.; VAN DUPPEN, V.; VERWILGHEN, R.; DE LOECKER, W. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. **Cryobiology**, v. 30, p.279-285, 1993.

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

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

PELLERIN-MENDES, C.; MILLION, L.; MARCHAND-ARVIER, M.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. In vitro study of the effects of trehalose and dextran during

freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. **Cryobiology**, **30**, 279-285, 1997.

PENHA-SILVA, N; ARVELOS, LR; CUNHA, CC; AVERSI-FERREIRA, TA; GOUVÊA-E-SILVA, LF; GARROTE-FILHO, MS; FINOTTI, CJ; BERNARDINO-NETO, M; DE FREITAS REIS, FG. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 23-29, 2008.

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

SEEMAN, P.; ROTH, S.; SCHNEIDER, H. The membrane concentrations of alcohol anesthetics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 225, p. 117-184, 1971.

TIMASHEFF, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 22, 67-69, 1993.

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

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with whater stress: evolution of osmolyte system. **Science**. v. 217, p. 1214-1222, 1982.

YANCEY, P.H.; SOMERO, G.N. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. **Biochemical Journal**, v. 183, p. 317-23, 1979.

CAPÍTULO 2

TRABALHO EXPERIMENTAL

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SALINA SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SOLUÇÕES DE ETANOL

RESUMO

O NaCl é um agente osmorregulatório clássico que em condições isotônicas com o plasma é capaz de estabilizar os eritrócitos em um estado R, onde essas células congregam um certo grau de estabilidade com a capacidade de exercerem suas funções. O etanol é um agente caotrópico clássico, capaz de promover desnaturação, mas é também um osmólito, capaz de promover estabilização de eritrócitos. Em NaCl a 0,9% m/v e entre 0 e 24% v/v de etanol, os eritrócitos sofrem lise, mas entre 24 e 32% v/v, os eritrócitos são estabilizados pela ação do etanol. Essa estabilização forma eritrócitos compactados, em um estado morfológico T, que perdem, entretanto, várias funções dessas células. Neste trabalho nós estudamos o efeito de concentrações de NaCl a 0,5, 0,9 e 1,1% m/v sobre a incubação por tempo fixo (30 min) de amostras de sangue humano com concentrações de etanol entre 0 e 32% v/v. As transições de lise e estabilização dos eritrócitos pelo etanol foram descritas por sigmóides e caracterizadas pelo ponto de meia-transição de lise (D_{50}) e de estabilização (S_{50}), respectivamente, mas também pela amplitude (dX) e altura (h) daquelas curvas (h). O valor de D_{50} do etanol aumentou de 12,61 para 14,29, mas voltou a diminuir para 13,97%, com o aumento da concentração da NaCl de 0,5 para 0,9 e 1,1% m/v, respectivamente. O valor médio de S_{50} diminuiu de 27,26 para 26,22 e 25,99% de etanol/100 mL de solução com o aumento na concentração de NaCl da solução de 0,5 para 0,9 e 1,1% m/v, respectivamente. Esses resultados indicam que a solução salina hipertônica potencializou o efeito de estabilização promovido pelo etanol, certamente deslocando os eritrócitos do estado R para o estado T.

Palavras-chave: Eritrócitos; Estabilidade de membrana; Etanol

ABSTRACT

NaCl is a classic osmoregulatory agent that in isotonic conditions with the plasma is able to stabilize the red blood cells (RBC) in a relaxed (R) state, where these cells congregate a certain degree of stability with the capacity of exercise properly all its functions. The ethanol is a classic chaotropic agent, capable of promoting denaturation, but is also an osmolyte, able to promote stabilization of RBC. In 0.9% w/v NaCl and between 0 and 24% v/v ethanol, the RBC suffer lysis, but between 24 and 32%, the RBC are stabilized by the action of ethanol. This stabilization forms compacted or tight (T) RBC, which lost however many cell functions. In this work we studied the effect of concentrations of NaCl at 0.5, 0.9 and 1.1% w/v on the fixed time incubation (30 min) of human blood with concentrations of ethanol between 0 and 32%v/v. The RBC lysis and stabilization transitions by ethanol were described by sigmoids and characterized by their lysis half-point (D_{50}) and stabilization (S_{50}) transitions, respectively, and also by the amplitude (dX) and height (h) of those curves. The average value of D_{50} increased from 12.61 to 14.29%, but fell back again to 13.97% of ethanol/100 mL of 0.5, 0.9 and 1.1% w/v NaCl, respectively. The average value of S_{50} fell from 27.26 to 26.22 and 25.99% of ethanol/100 mL of solution with the increase in the concentration of NaCl solution of 0.5 to 0.9 and mL of 1.1% w/v saline, respectively. These results indicate that hypertonic saline solution potentiated the stabilizing effect of ethanol, certainly moving the RBC from of the state R to the state T.

Key words: Erythrocytes; Ethanol; Membrane stability

INTRODUÇÃO

As membranas plasmáticas delimitam as fronteiras das células e constituem o local de contato, comunicação e intercâmbio entre elas; isso exige todo um aparato bioquímico especializado para as diferentes funções desempenhadas pelas células. As membranas plasmáticas constituem, portanto, o primeiro ponto de contato das células com qualquer substância proveniente do meio externo, o que significa que as células são criticamente dependentes delas.

As membranas biológicas são formadas por uma bicamada lipídica, onde estão inseridas proteínas integralmente em ambas as camadas, unilateralmente em uma ou outra das monocamadas lipídicas ou perifericamente no interior ou exterior da célula [DANIELLI e DAVSON, 1935].

A bicamada lipídica é constituída de fosfoacilgliceróis, esfingolipídeos e colesterol. A natureza dos ácidos graxos presentes nos fosfoacilgliceróis e esfingolipídeos, juntamente com o teor relativo de colesterol, é uma variável importante na determinação do equilíbrio que deve existir entre a estabilidade e funcionalidade da membrana. A presença de mais ácidos graxos saturados e de colesterol aumenta a estabilidade da membrana, o que até um certo nível é desejável para garantir sua funcionalidade, mas além desse nível o aumento excessivo da estabilidade deve comprometer as funções normais da célula [ARAKI e RIKKIND, 1981; PENHA-SILVA et al., 2008; SHIGA e MAEDA, 1980].

A bicamada lipídica pode ser afetada pela inserção de xenobióticos, que podem então causar mudanças na organização estrutural e nas funções das biomembranas e, conseqüentemente, das próprias células [NARENDRA et al., 2007].

Os eritrócitos constituem uma ferramenta simples e de baixo custo para estudo da interação de biomembranas com drogas, agentes tóxicos e outros solutos bioativos [BARAKAT, 2005; BATISTA et al., 2007; BHALLA e AGRAWAL, 1998; BLASIAK et al., 1991; BUKOWSKA, 2007; DE FREITAS et al., 2008; NARENDRA, 2007; NASUTI et al., 2003; NISHIHARA e UTSUMI, 1983]. Eles são muito vulneráveis a esses agentes, já que não possuem capacidade de regeneração e de reparo de suas membranas [MCNEIL e STEINHARDT, 1997; WEBSTER e TOOTHILL, 1987], de tal maneira que as

injúrias sofridas pelos eritrócitos podem gerar alterações conformacionais ou lise [SHIGA e MAEDA, 1980].

Alterações conformacionais estabilizantes têm sido descritas como decorrência da incubação de eritrócitos com solutos osmoestabilizadores, como glicerol e sorbitol [CUNHA et al., 2007; DE LOECKER et al., 1993; LANG et al., 1998; PELLERIN-MENDES et al., 1997].

A incubação de eritrócitos mesmo com solutos caotrópicos como os alcanóis mostrou a preservação dessas células em conformações esferocíticas de menor volume [BAKALTCHEVA, ODEYALE e SPARGO, 1996].

A interação de etanol com eritrócitos humanos têm sido bastante estudada atualmente. O etanol, que é um agente caotrópico clássico [Fonseca et al., 2006], também aumenta a osmolaridade do meio e a partir de certa concentração crítica é capaz de promover estabilização de eritrócitos humanos [GOUVÊA-E-SILVA, 2006; FINOTTI, 2006; BERNARDINO-NETO, 2006, CUNHA, 2007; DE FREITAS REIS, 2007; FIRMINO, 2007].

A influência da concentração do etanol sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos pode ser vista na **Figura 1** [ARVELOS, 2007; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; CUNHA et al., 2007; DE FREITAS REIS, 2007; PENHA-SILVA et al., 2008]. A incubação de eritrócitos humanos com diferentes concentrações de etanol por tempo fixo (30 min) é capaz de demonstrar a existência de três transições. A primeira (A) é uma transição de lise, induzida por aumento menos pronunciado na concentração de etanol. A segunda (B) é uma transição de estabilização, induzida por um aumento intermediário na concentração de etanol. A terceira (C) é novamente uma transição de lise, induzida por um aumento mais expressivo na concentração de etanol. Estas três transições são definidas por sigmóides e caracterizadas respectivamente por seus pontos de meia-transição, quais sejam D_{50R} , S_{50T} e D_{50T} .

Um modelo de transição de estados conformacionais morfológicos foi proposto para explicar as diferentes transições induzidas pelo etanol e é mostrado na figura 2 [GOUVÊA-E-SILVA, 2006; FINOTTI, 2006; BERNARDINO-NETO, 2006, CUNHA, 2007; DE FREITAS REIS, 2007; CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2008].

O aumento inicial na concentração de etanol induz a lise dos eritrócitos presentes na conformação funcional expandida **R**, através da rota 1 (Figura 2) e caracterizada pelo ponto de meia-transição sigmoidal D_{50R} (Figura 1). Um aumento adicional na concentração de etanol induz uma transição de estabilização, dada pela rota 2 (figura 2) e caracterizada pelo ponto de meia-transição S_{50T} (Figura 1), com a geração de um estado conformacional tenso ou apertado **T**. Os subseqüentes aumentos na concentração de etanol induzem a lise desse estado **T**, através da rota 3, caracterizada pelo ponto de meia transição D_{50T} [CUNHA et al., 2007; PENHA-SILVA et al., 2008].

No presente trabalho, foi estudada a influência da concentração de NaCl do meio sobre os efeitos do etanol sobre a estabilidade de eritrócitos humanos.

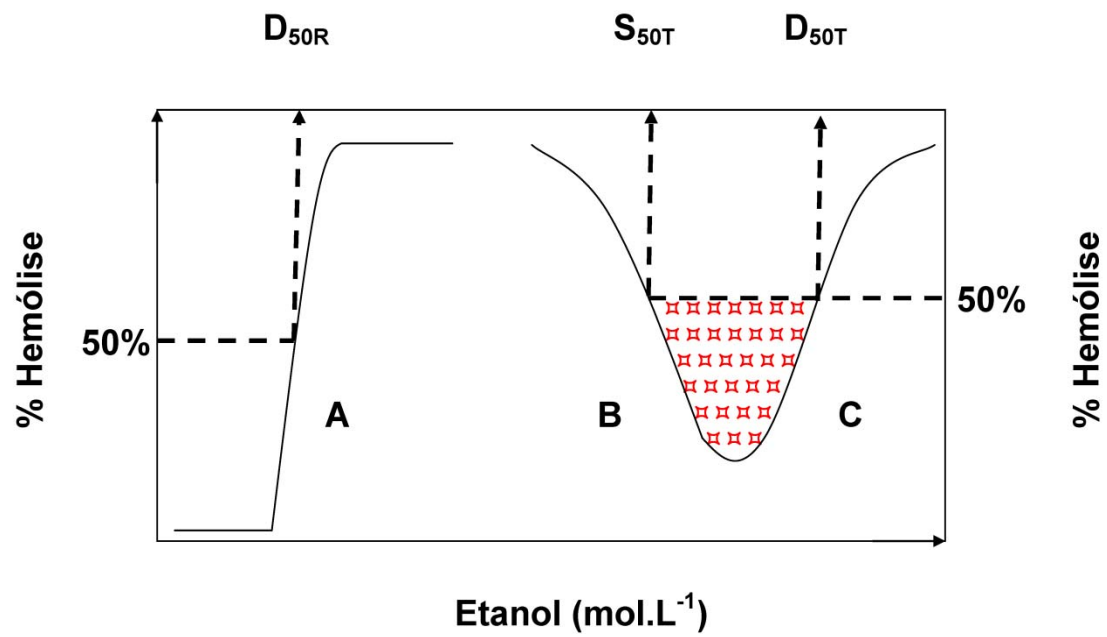


Figura 1. Efeito da incubação por tempo fixo (30 min) de concentrações crescentes de etanol com eritrócitos humanos.

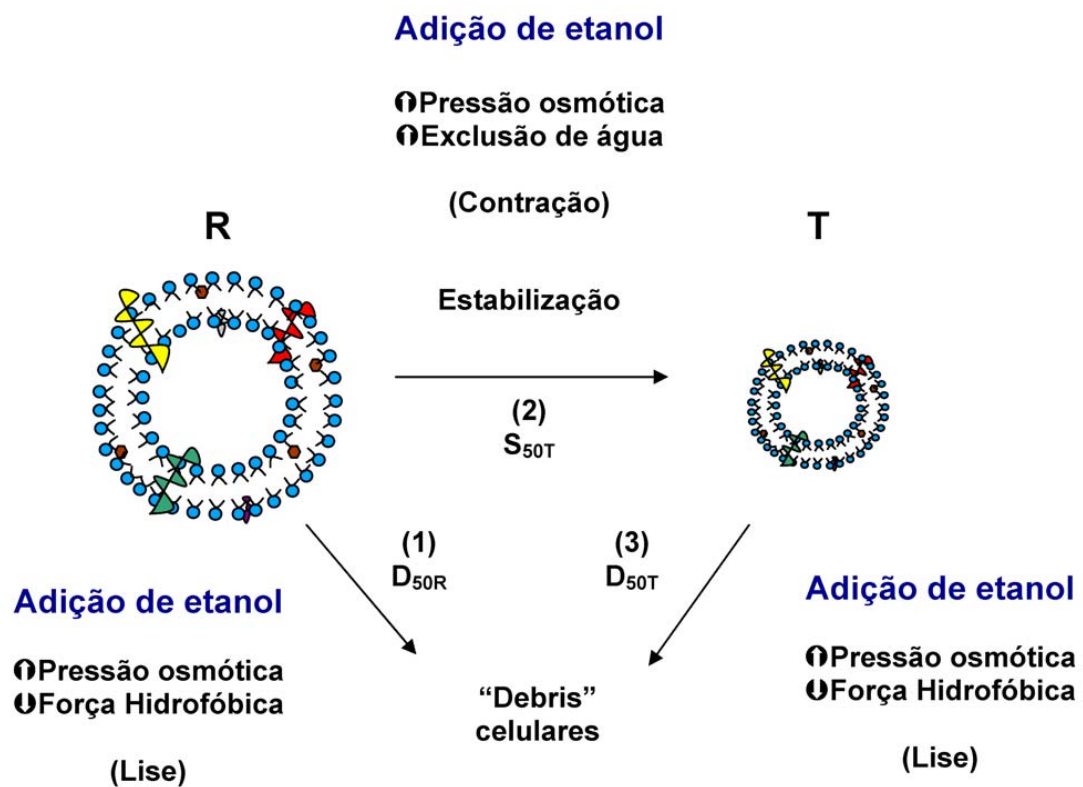


Figura 2. Indução de transição de estados morfológicos de eritrócitos pela incubação com diferentes concentrações de etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de sangue

Este trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa. Amostras de 4 mL de sangue foram colhidas em tubos de coleta de sangue a vácuo contendo heparina sódica (Labor Import), de 6 voluntárias saudáveis jovens (22-28 anos), para evitar interferência de efeitos de hemoglobinopatias e outras doenças [ASHTON, 2007; HARVEY, 1997; LEPOCK et al., 1989; PALEK e LUX, 1983; PARAMAHASA, APARNA, e VARADACHARYULU, 2002] bem como da idade [FIRMINO, 2007; PENHA-SILVA et al., 2007]. No momento da coleta de sangue as voluntárias estavam em jejum de 12 horas e abstinência do uso de bebida alcoólica por pelo menos duas semanas, para evitar interferência do metabolismo do etanol [CHAN, GODIN e SUTTER, 1983; LINDI, MONTORFANO e MARCIANI, 1998; SENTHILKUMAR, SENGOTUVELAN e NALINI, 2004; TYULINA et al., 2000] e da alcoolemia sobre os resultados.

Reagentes e equipamentos

Foi utilizado NaCl da marca CINÉTICA, com 99,5% de grau de pureza, o qual foi devidamente corrigido durante o preparo das soluções e álcool etílico, PA, marca PROQUÍMIOS. As medidas de volume foram realizadas em bureta de vidro refratário e pipetas automáticas. As medidas de massa foram feitas utilizando-se balança digital da marca AND, modelo 870. As incubações foram feitas em banho-maria termostatizado, modelo MA 184, da marca MARCONI. A centrifugação foi feita em centrífuga da marca Excelsa Baby. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro Micronal modelo B-442.

Incubação de eritrócitos humanos em soluções etanólicas de NaCl a 1,1; 0,9 e 0,5% m/v

Soluções teste com concentrações de 0 a 32% v/v de álcool etílico foram preparadas em soluções com NaCl a 1,1; 0,9 e 0,5% m/v.

Baterias de tubos de ensaio (Eppendorff®) em duplicata foram preparadas com 1 mL da solução teste e 10 µL de sangue. Após

homogeneização e incubação a 37 °C por 30 minutos os frascos foram centrifugados por 10 minutos a 1.300xg e o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria visível a 540 nm.

Determinação das curvas de transição de lise dos eritrócitos

As dependências dos valores de absorbância a 540 nm (A_{540}) com as concentrações de álcool etílico foram ajustadas para cada concentração de NaCl usada, por linhas de regressão sigmoidal, dadas pela equação de Boltzmann,

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

em que A_1 e A_2 representam os valores mínimo e máximo de hemólise, X é a concentração de etanol, X_{50} representa o ponto de meia transição e dD é a amplitude da transição sigmoidal entre A_1 e A_2 . Para a transição de lise dos eritrócitos pelo etanol, X_{50} caracterizou a concentração de etanol (D_{50}) que causou 50% de hemólise. Para a transição de estabilização dos eritrócitos pelo etanol, X_{50} caracterizou a concentração de etanol que causou 50% de estabilização (S_{50}) da população de eritrócitos.

Edições de gráficos e análises estatísticas

Os resultados foram inicialmente submetidos a um teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), com a utilização do aplicativo GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA).

As edições de gráficos e análises estatísticas foram realizadas com o programa Origin 7.5 Professional (Microcal Inc. Massachusetts, EUA).

Somente foram consideradas significantes as linhas de regressão com p menor que 0,05.

A comparação dos valores de D_{50} foi feita por análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$ indicando diferença estatisticamente significativa entre as médias.

RESULTADOS

Os valores de cada parâmetro analisado mostraram um comportamento normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0,05$).

Incubação por tempo fixo (30 min) de amostras de sangue humano (10 μ L), colhidas com heparina, em concentrações de etanol entre 0 e 25% v/v, na presença de NaCl a 0,5, 0,9 ou 1,1% m/v produziram os gráficos $A_{540\text{ nm}}$ em função da concentração de etanol apresentados nas **Figura 3, 4 e 5**, respectivamente. Essas curvas mostram ajustes sigmoidais coletivos obtidos para o conjunto de todos os dados experimentais em cada uma das concentrações salinas.

A partir de cada um dos experimentos individuais foram obtidos o ponto médio (D_{50}), a amplitude (dD) e a altura (h) da curva de transição experimental. Os valores obtidos desses parâmetros foram apresentados na **Tabela 1**. Entre as diferentes concentrações salinas utilizadas, houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de D_{50} , mas não entre os valores de dD e h (**Tabela 1**).

O valor médio de D_{50} aumentou de $12,61 \pm 0,67\%$ de etanol/100 mL de salina a 0,5% para $14,29 \pm 0,81\%$ de etanol/100 mL de salina a 0,9%, mas voltou a diminuir para $13,97 \pm 0,30\%$ de etanol/100 mL de salina a 1,1% (**Tabela 1**). Essa tendência pode ser observada na **Figura 6**, onde também foram inseridos os valores obtidos por Gouvêa-e-Silva [2006] a 0,6% m/v de NaCl.

Incubação de amostras de sangue humano, como já descrito anteriormente, colhidas com heparina, em concentrações de etanol entre 24 e 32%, na presença de NaCl a 0,5, 0,9 ou 1,1% m/v produziram os gráficos de $A_{540\text{ nm}}$ em função da concentração de etanol apresentados nas **Figuras 7, 8 e 9**, respectivamente.

Em cada experimento individual foram obtidos o ponto médio (S_{50}), a amplitude (dD) e a altura (h) da curva de transição (**Tabela 2**). Houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de S_{50} , mas não entre os valores de dD e h (**Tabela 2**), obtidos nas diferentes concentrações salinas utilizadas.

O valor médio de S_{50} diminuiu de $27,26 \pm 0,65$ para $26,22 \pm 1,23$ e $25,99 \pm 0,09\%$ de etanol/100 mL de solução com o aumento na concentração de

NaCl da solução de 0,5 para 0,9 e 1,1% m/v, respectivamente (**Tabela 2**). Essa tendência pode ser observada na **Figura 10**, onde também foram inseridos os resultados obtidos por Gouvêa-e-Silva [2006] em solução de NaCl a 0,6% m/v.

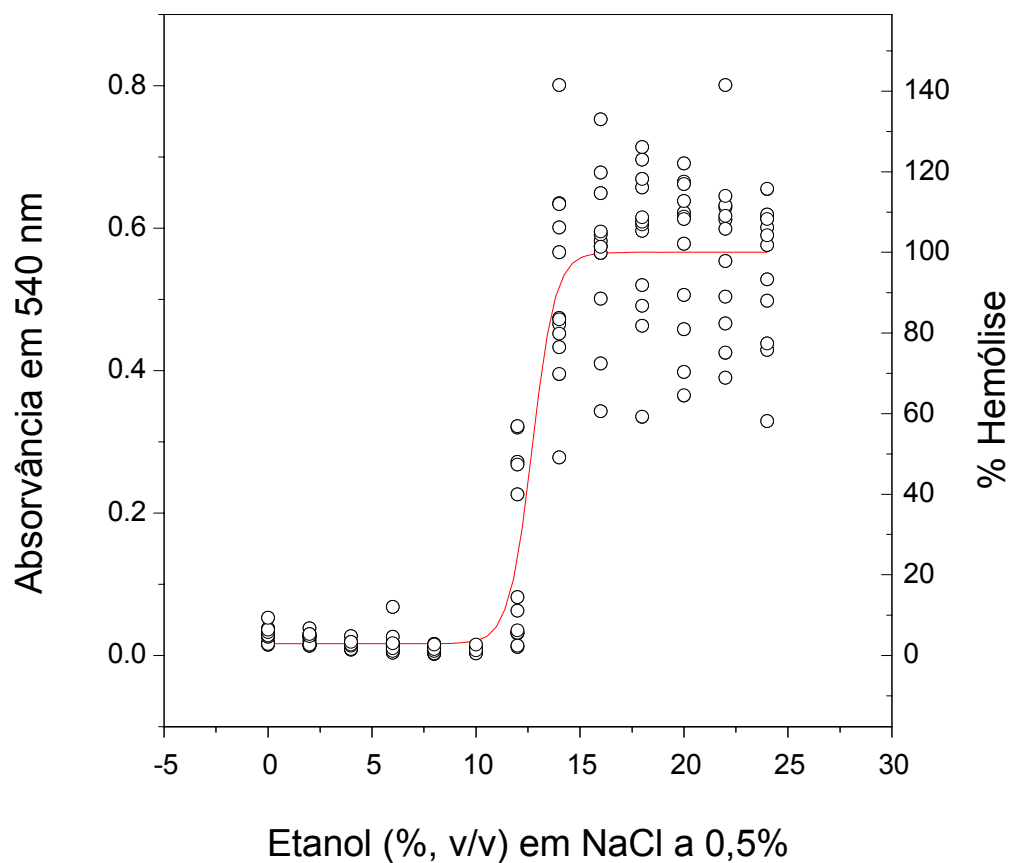


Figura 3. Lise de eritrócitos humanos em função da concentração de etanol em NaCl a 0,5% m/v e 37 °C.

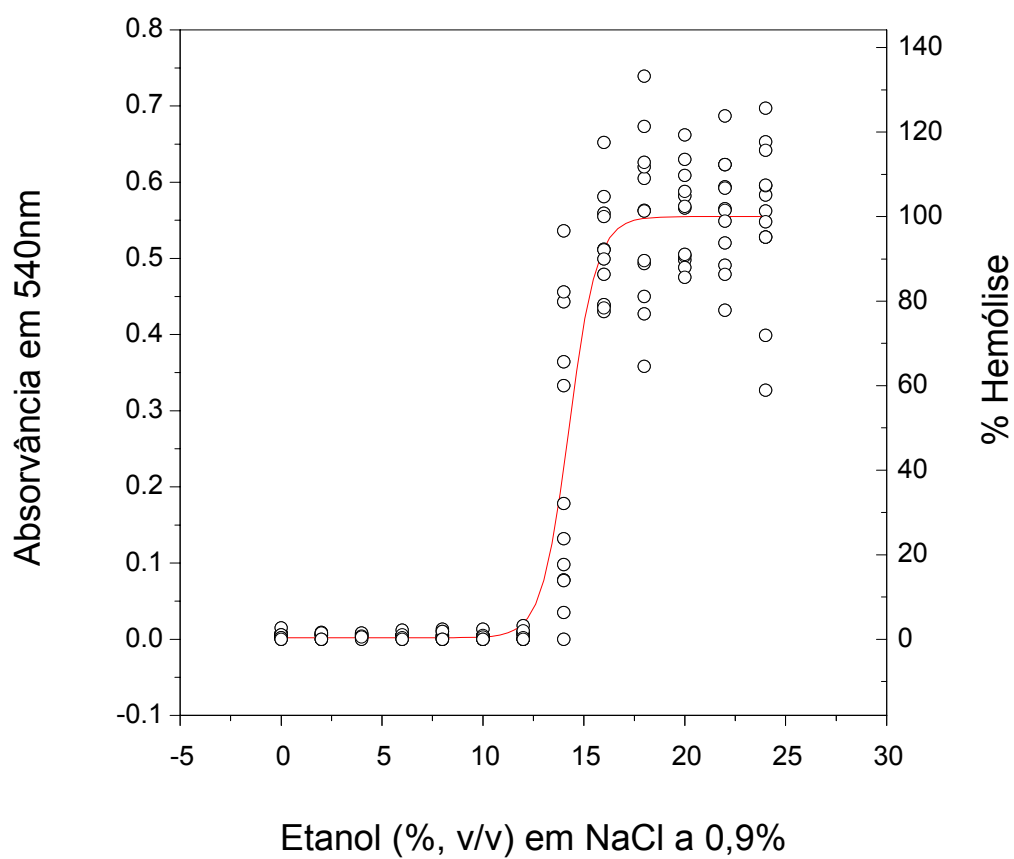


Figura 4. Lise de eritrócitos humanos em função da concentração de etanol em NaCl a 0,9% m/v e 37 °C.

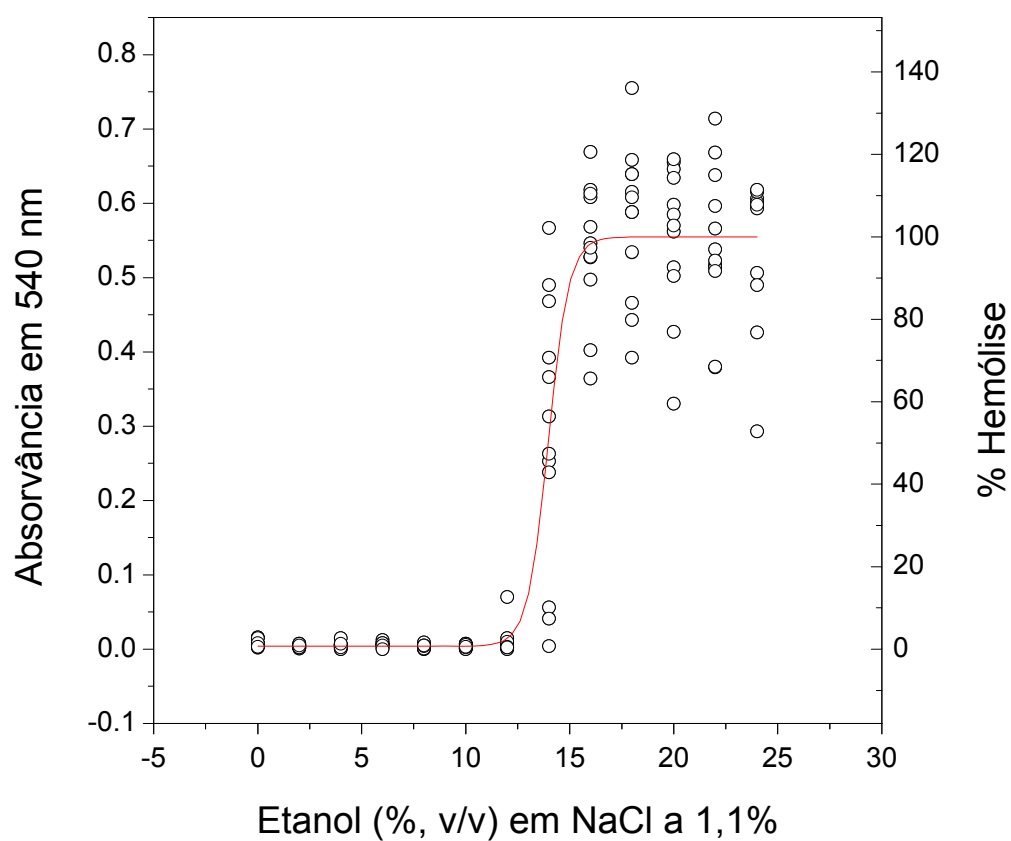


Figura 5. Lise de eritrócitos humanos em função da concentração de etanol em NaCl a 1,1% m/v e 37 °C.

Tabela 1. Valores de D_{50} (média $\pm$ desvio-padrão) e da amplitude (dD), dados em % etanol/100 mL salina e da altura (h), dados em unidades de absorvância (ΔOD) obtidos para amostras de sangue humano coletadas na presença de heparina como anti-coagulante.

Parâmetro	Salina a 0,5% m/v	Salina a 0,9% m/v	Salina a 1,1% m/v	p *
D_{50}	12,61 $\pm$ 0,67 (N = 6)	14,29 $\pm$ 0,81 (N = 6)	13,97 $\pm$ 0,30 (N = 5)	*
dD	0,36 $\pm$ 0,25 (N = 6)	0,48 $\pm$ 0,13 (N = 6)	0,32 $\pm$ 0,29 (N = 5)	
h	0,55 $\pm$ 0,10 (N = 6)	0,55 $\pm$ 0,06 (N = 6)	0,56 $\pm$ 0,07 (N = 5)	

* p < 0,05 indicando diferença estatisticamente significativa entre as soluções salinas (ANOVA).

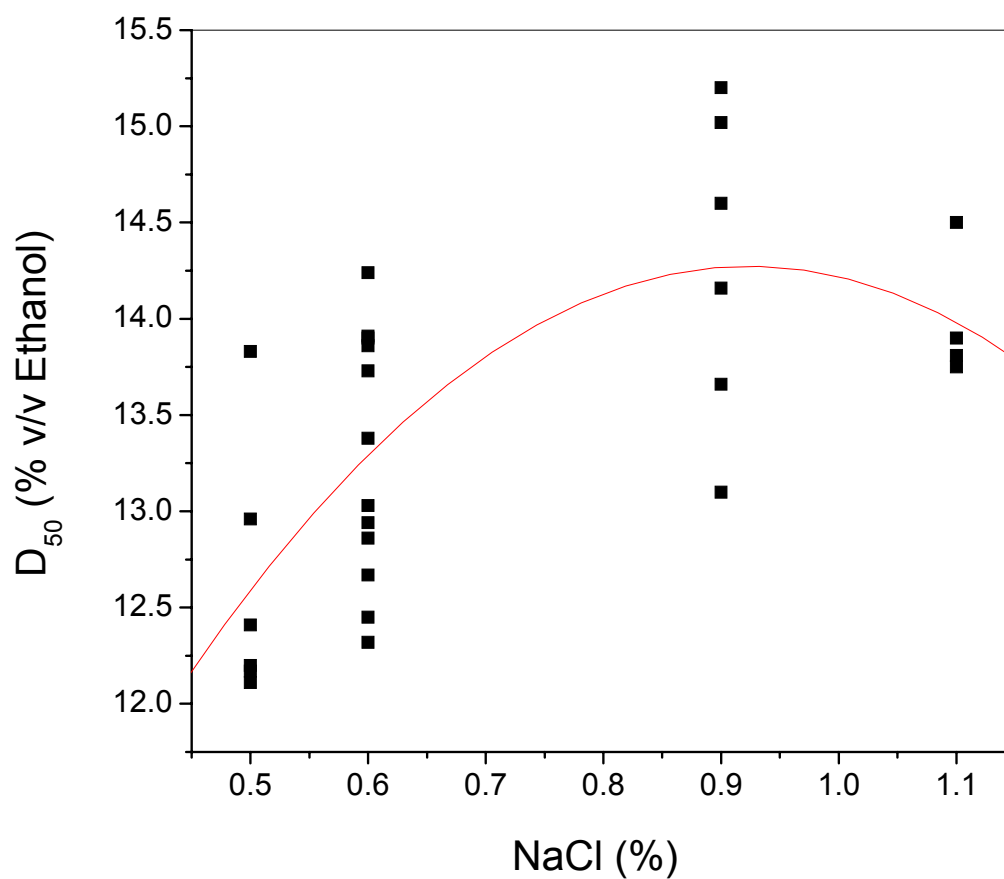


Figura 6. Dependência de D_{50} com a concentração de NaCl. A linha vermelha representa a linha de regressão polinomial, dada pela equação $y = 6,28 + 17,30 x - 9,37 x^2$ ($r = 0,4912$; $N = 29$; $P = 0,000153$).

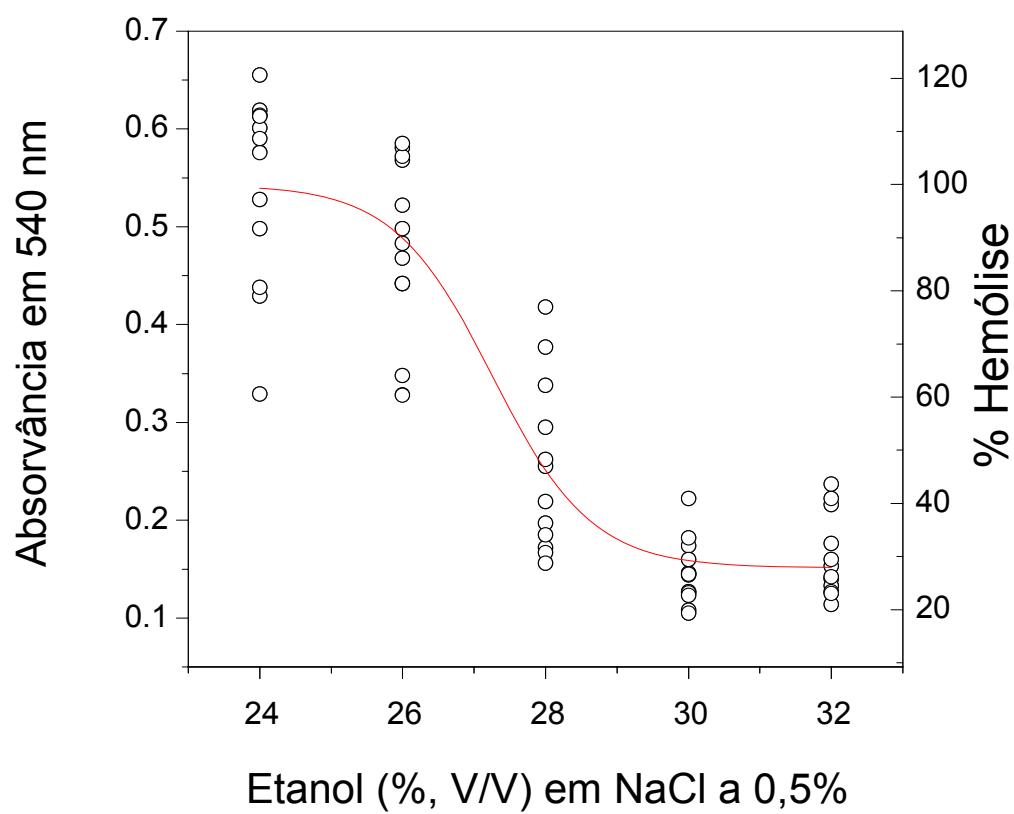


Figura 7. Estabilização de eritrócitos humanos em função da concentração de etanol em NaCl a 0,5% m/v e 37 °C.

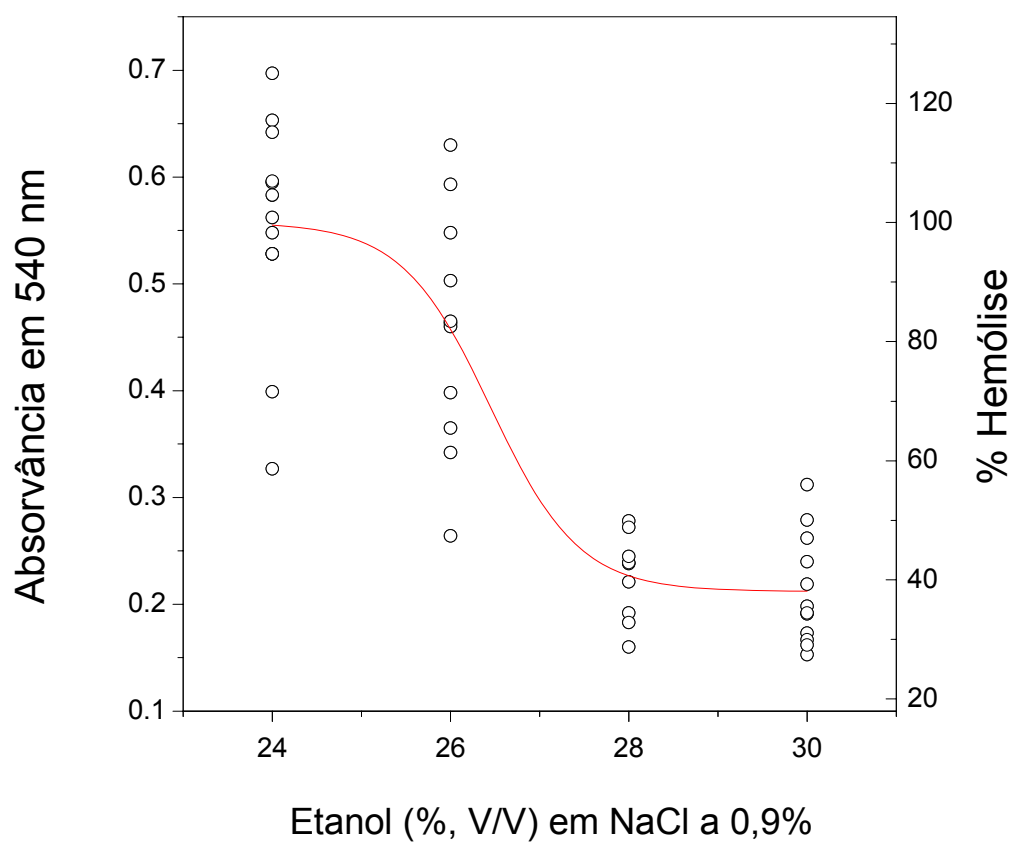


Figura 8. Estabilização de eritrócitos humanos em função da concentração de etanol em NaCl a 0,9% m/v e 37 °C.

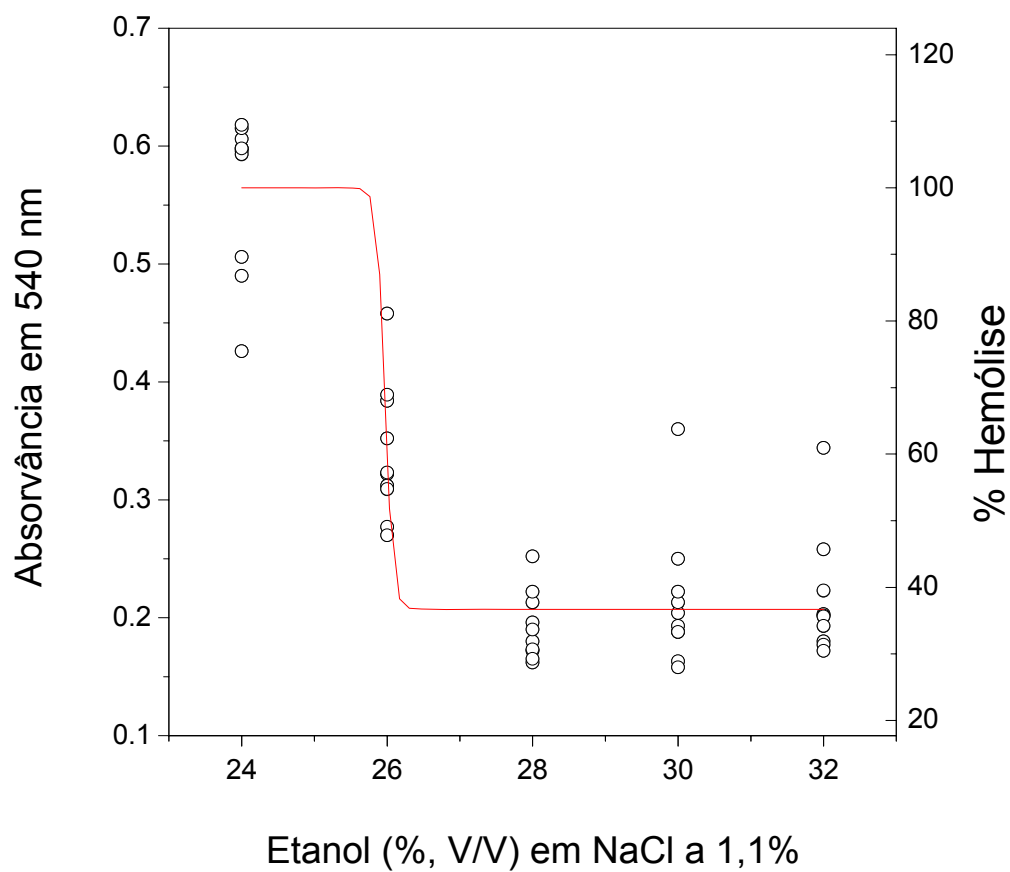


Figura 9. Estabilização de eritrócitos humanos em função da concentração de etanol em NaCl a 1,1% m/v e 37 °C.

Tabela 2. Valores de S_{50} (média + desvio-padrão) e da amplitude (dS), dados em % etanol/100 mL salina e da altura (h), dados em unidades de absorvância (ΔOD) obtidos para amostras de sangue humano coletadas na presença de heparina como anti-coagulante.

	Salina 0,5%	Salina 0,9%	Salina 1,1%	p*
S_{50}	27,26 $\pm$ 0,65 (N = 6)	26,22 $\pm$ 1,23 (N = 6)	25,99 $\pm$ 0,09 (N = 5)	*
dS	0,54 $\pm$ 0,26 (N = 6)	0,34 $\pm$ 0,37 (N = 6)	0,13 $\pm$ 0,15 (N = 5)	
h	0,39 $\pm$ 0,09 (N = 6)	0,37 $\pm$ 0,04 (N = 6)	0,35 $\pm$ 0,05 (N = 5)	

* p < 0,05 indicando diferença estatisticamente significante entre as soluções salinas (ANOVA).

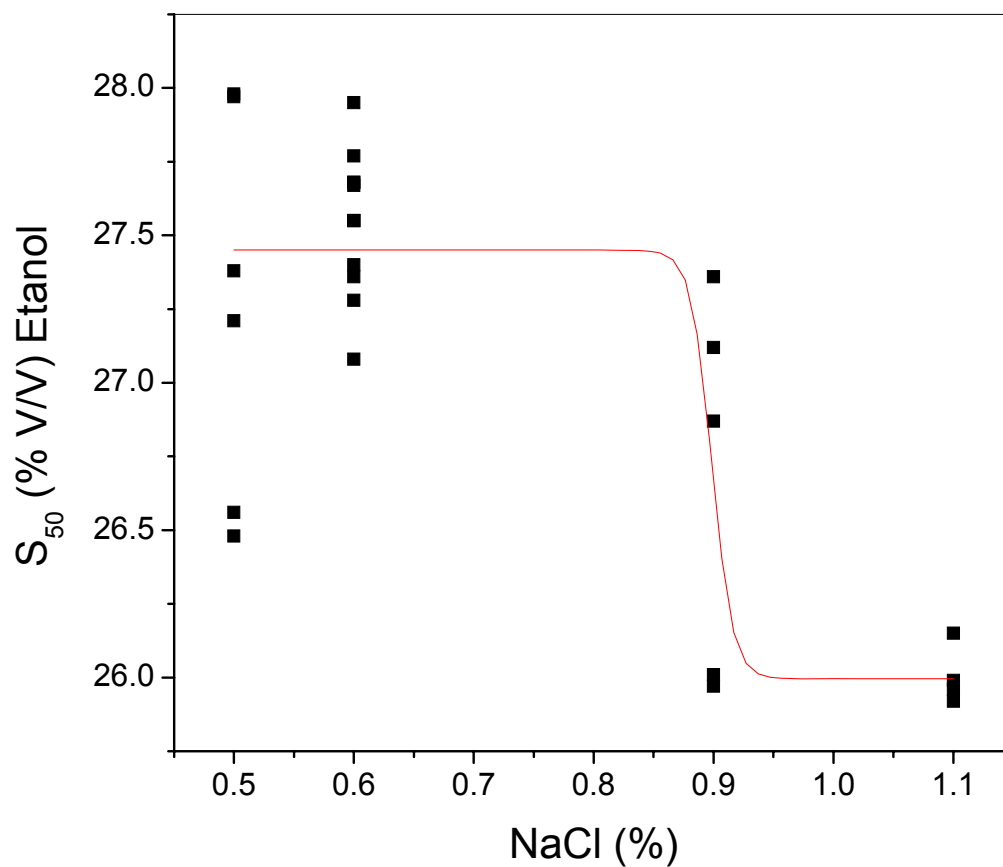


Figura 10. Dependência de S_{50} com a concentração de NaCl. A linha vermelha representa a curva de regressão sigmoidal ($r = -0,8122$; $N = 28$), dada pela equação:

$$A_{540} = \frac{27,450 - 25,996}{1 + e^{(X - 0,8986)/0,008655}} + 25,996$$

onde X representa a concentração de NaCl.

DISCUSSÃO

O etanol, que é um alanol, possui um grupo hidrofóbico (CH_3CH_2-) capaz de formar ligações de van de Waals com outros grupamentos hidrofóbicos, conjuntamente com um grupamento hidrofílico ($-\text{OH}$), capaz de formar ligações de hidrogênio com a água e outros grupos hidrofílicos [FONSECA, 1996]. Essa natureza anfifílica o habilita a misturar-se com a água e diminuir a constante dielétrica do meio, atenuando a intensidade da força hidrofóbica. Assim, numa mistura de etanol e água, há uma diminuição da força que compele os grupos hidrofóbicos de complexos biológicos, como os eritrócitos, a manterem-se escondidos do meio externo aquoso. Esse estímulo caotrópico também está associado à capacidade do etanol em acomodar melhor no solvente aqueles grupos hidrofóbicos que agora tendem a se expor no meio externo, isto devido à interação com a cadeia alquílica do etanol por meio de ligações de van der Waals.

É seguramente este o cenário bioquímico que está associado às transições de lise de eritrócitos humanos pelo etanol (**Figuras 3, 4 e 5**).

Por outro lado, a mistura de etanol com a água também aumenta a osmolaridade do meio, o que gera uma condição de natureza estabilizante, associada à exclusão de água de complexos biológicos como os eritrócitos [PENHA-SILVA, 2008]. Essa ação é concomitante à ação caotrópica do etanol, que em nenhum momento desaparece, com o aumento da ação estabilizante determinada pelo aumento na osmolaridade. Mas com o aumento na osmolaridade, a ação estabilizante do etanol vai superando a ação caotrópica, fundamentada na diminuição da constante dielétrica do meio, até uma concentração crítica.

Este é seguramente o cenário bioquímico que determina as transições de estabilização de eritrócitos pelo etanol (**Figuras 7, 8 e 9**).

Além daquela concentração crítica, o aumento excessivo na osmolaridade para exercer também uma ação caotrópica, como se pode ver na curva C da **Figura 1**.

No presente trabalho, nós nos ocupamos apenas com as transições de lise (**A**) e de estabilização (**B**) dos eritrócitos (**Figura 1**) induzidas ambas pelo aumento na concentração de etanol.

A vulnerabilidade dos eritrócitos à lise por hipotonicidade ou por hipertonicidade é amplamente conhecida na literatura.

Neste trabalho, nós investigamos o impacto da hipotonicidade (**Figura 3 e 7**) e da hipertonicidade (**Figuras 5 e 9**) sobre os efeitos caotrópicos (**Figuras 3 e 5**) e estabilizante do etanol sobre eritrócitos humanos (**Figuras 7 e 9**), em relação aos efeitos caotrópico (**Figura 4**) e estabilizante (**Figura 8**) do etanol em condições isotônicas com o sangue.

Os efeitos aqui observados não podem ser atribuído à ação de tampões nem a flutuações do pH do meio. Nossos experimentos foram todos conduzidos na ausência de tampão, para evitar a influência de sua concentração sobre a osmolaridade do meio. Como utilizamos sempre reagentes sem impurezas ácido-básicas, não houve flutuações significativas de pH em nenhuma das situações consideradas. Além disso, lise de eritrócitos em função do pH ocorre apenas nos extremos de pH [DE FREITAS et al., 2008]. Em condições de pH em torno da neutralidade não há também alterações conformacionais de eritrócitos induzidas pela concentração hidrogeniônica [YAO e ZHA, 2007].

Os efeitos aqui observados também não podem ser decorrentes do metabolismo do etanol [CHAN, GODIN e SUTTER, 1983; LINDI, MONTORFANO e MARCIANI, 1998; SENTHILKUMAR, SENGOTUVELAN e NALINI, 2004; TYULINA et al., 2000] e sim da interação daquele soluto com o meio e com os eritrócitos.

A sequência das **Figuras 3, 4 e 5** mostra que tanto o meio hipotônico quanto o meio hipertônico favorecem a ação caotrópica do etanol, em condições de menor osmolaridade, uma vez que houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de D_{50R} obtidos nas três diferentes concentrações de NaCl utilizadas (**Tabela 1**). A influência do efeito da tonicidade sobre a ação caotrópica do etanol sobre eritrócitos humanos foi mostrada na **Figura 6**, onde foram também inseridos valores de D_{50R} em NaCl a 0,6% [GOUVÊA-E-SILVA, 2006]. A melhor preservação da integridade de membrana de eritrócitos em salina a 0,9% deve ser dependente dos efeitos elétricos do soluto na manutenção de sua integridade e estabilidade [GOUVÊA-E-SILVA, 2006].

Assim, condições isotônicas de salinidade plasmáticas protegem os eritrócitos e as outras células sanguíneas contra a ação caotrópica do etanol. Este achado pode ter implicações de ordem fisiológica para o dia-a-dia das pessoas. Indivíduos desidratados ou com concentrações salinas elevadas em seus plasmas devem ficar mais vulneráveis aos efeitos tóxicos determinados pela ingestão de etanol.

Para muito além de concentrações de etanol que possam ter algum significado fisiológico, a estabilização de eritrócitos pelo etanol também se mostrou dependente da salinidade, porém de uma maneira um pouco diferente. Os aumentos na concentração de NaCl produziram sempre uma diminuição seqüencial (**Figuras 7, 8 e 9**) nos valores de S_{50T} . Isso significa que o aumento na tonicidade favoreceu sempre a estabilização dos eritrócitos. Essa tendência é concordante com a estabilização osmolar de eritrócitos pelo etanol, fundamentada na compactação de suas estruturas (**Figura 2**).

Como a dependência de S_{50T} com a concentração de NaCl se ajustou melhor a uma curva de decaimento sigmoidal (**Figura 10**), isso sugere que o aumento na salinidade do meio estaria favorecendo de forma cooperativa a transição dos eritrócitos do estado **R** para o estado **T**.

CONCLUSÕES

A estabilidade das conformações existentes no estado relaxado ou expandido (**R**) de eritrócitos humanos contra a ação caotrópica do etanol é favorecida em condições de isotonicidade com o sangue. Tanto as condições de hipotonicidade quanto de hipertonicidade favorecem a ação caotrópica do etanol sobre o estado **R** dos eritrócitos humanos. Já o efeito osmoestabilizador de eritrócitos pelo etanol é potencializado, provavelmente de forma cooperativa, com o aumento da concentração salina do meio.

REFERÊNCIAS

ARAKI, K.; RIKKIND, J.M. The rate of osmotic hemolysis: a relationship with membrane bilayer fluidity, **Biochim. Biophys. Acta.**, 645, 81-91, 1981.

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

ASHTON, N. Physiology of red and white blood cells. **Physiology, Anaesthesia and intensive care medicine**, v.8, n.5, p.203-208, 2007.

BAKALTCHEVA, I.B.; ODEYALE, C.O.; SPARGO, B.J. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. **Biochim. Biophys. Acta**, 1280, 73-80, 1996.

BARAKAT, K.K. Effect of certain insecticides on the stabilization and lysis of human and fish erythrocyte. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 1, n. 2, p.195-199, 2005.

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

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

BHALLA, P.; AGRAWAL, D. Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technical) exposure. **Hum Exp Toxicol.**; v. 17, n. 11, p. 638-42, nov. 1998.

BLASIAK, J.; WALTER, Z.; GAWRONSKA, M. The changes of osmotic fragility

of pig erythrocytes induced by organophosphorus insecticides. **Acta Biochim Pol.**, v. 38, n. 1, p. 75-8, 1991.

BUKOWSKA, B.; PIENIAZEK, D.; DUDA, W. Hemolysis and lipid peroxidation in human erythrocytes incubated with roundup. **Current Topics in Biophysics**, v. 26, n. 2, p. 245-249, 2002.

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

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

DANIELLI J.F.; DAVSON H. A contribution to the theory of permeability of thin films. **J. Cell. Comp. Physiol.**, v.5, p. 495-508, 1935.

DE FREITAS MV, NETTO RDE C, DA COSTA HUSS JC, DE SOUZA TM, COSTA JO, FIRMINO CB, PENHA-SILVA N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p.219-24, 2008.

DE FREITAS REIS, F.G. Influência de glicerol e sorbitol sobre a dependência térmica da estabilização e desestabilização in vitro de eritrócitos humanos. 2007. 74f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2007. Nilson Penha-Silva (Orientador).

DE LOECKER, R.; GOSSENS, W.; VAN DUPPEN, V.; VERWILGHEN, R.; DE LOECKER, W. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. **Cryobiology**, v. 30, p. 270-285, 1993.

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

FIRMINO, C.B. **Influência da idade de doadoras humanas sobre a**

estabilidade de seus eritrócitos. 2007. 89f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2006. Nilson Penha-Silva (Orientador).

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

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

HARVEY, J.W. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th ed. San Diego: Academic Press USA, 1997. Cap.7, p.157-203.

LANG, F.; BUSCH, G.L.; RITTER, M.; VOLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HAUSSINGER, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiological reviews**, v. 78, p. 247-306, 1998.

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

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

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

NARENDRA, M.; BHATRACHARYULU, N. C.; PADMAVATHI, P.; VARADACHARYULU, N. C. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. **Chemosphere**, v.67, n.6, p.1065-1061, 2007.

NASUTI, C. CANTALAMESSA F. FALCIONI G. GABBIANELLI R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v. 191, n. 2, p. 233-244, sep., 2003.

NISHIHARA, Y.; UTSUMI, K.; Diminished osmotic fragility and shape alterations of human erythrocytes following the treatment with 1,1,1-trichloro-2,2-bis(P-chlorophenyl) ethane (DDT). **Cell Mol. Biol.**, v. 29, n. 1, p. 103-11, 1983.

PALEK, J.; LUX, S. Red cell membrane skeleton defects in hereditary and acquired hemolytic anemias. **Semin. Hematol.** 20: 189-224, 1983.

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

PELLERIN-MENDES, C.; MILLION, L.; MARCHAND-ARVIER, M.; LABRUDE, P.; VIGNERON, C. In vitro study of the effects of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. **Cryobiology**, 30, 279-285, 1997.

PENHA-SILVA N, ARVELOS LR, CUNHA CC, AVERSI-FERREIRA TA, GOUVÊA-E-SILVA LF, GARROTE-FILHO MS, FINOTTI CJ, BERNARDINO-NETO M, DE FREITAS REIS FG. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 23-29, 2008.

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

SENTHILKUMAR, R.; SENGOTUVELAN, M.; NALINI, N. Protective effect of glycine supplementation on the levels of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the erythrocyte of the rats with alcohol induced liver injury. **Cell Biochem. Funct.**, 22 123-128, 2004.

SHIGA, T., MAEDA, N. Influence of membrane fluidity on erythrocyte functions. **Biorheology**, v.17, n.5-6, 485–499, 1980.

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

WEBSTER, N. R.; TOOTHILL, C. Inorganic phosphate transport across the red blood cell membrane: the effect of exposure to hyperoxia. **Clinica Chimica Acta**, v.167, n.3, p.259–265. 1987.

YAO, C. C.; ZHA, Z. G. Effects of incubation pH on the membrane deformation of a single living human red blood cell. **Current Applied Physics**, v.7, n.1, p.11–14, 2007.