



ESTUDO IN VITRO DOS EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS

In vitro study of the effects of different ethanol concentrations on human erythrocytes

Luiz Fernando Gouvêa e Silva¹; Nilson Penha-Silva¹;
Tales Alexandre Aversi-Ferreira²

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia.

²Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

*Autor para correspondência: aversiferreira@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: *eritrócitos humanos, etanol, estabilidade de membrana.*

1- INTRODUÇÃO

A osmoestabilização dos eritrócitos e de outras células é um procedimento conhecido por permitir sua criopreservação por longos períodos de tempo, tarefa esta que emprega pequenos solutos como glicerol, sorbitol, trealose e dextrana (BOUSTRON; ARNAUD, 1984; PELLERIN-MENDES et al., 1997; LANG et al., 1998; WAGNER et al., 2002; SCOTT; LECAK; ACKER, 2005). Uma vez que a osmoestabilização do eritrócito ocorre com contração de volume e alterações morfológicas que podem ser revertidas após diluição do excesso de soluto (PELLERIN-MENDES et al., 1997; LANG et al., 1998; De LOECKER et al., 1993; BAKALTCHEVA; ODEYALE; SPARGO, 1996), isto indica a existência de um equilíbrio entre dois (ou mais) estados morfológicos, um estado expandido ou relaxado (**R**), presente nas condições naturais do sangue, e um estado condensado ou tenso (**T**), presente em altas concentrações de osmólitos.

Este trabalho estuda o efeito do etanol sobre os estados **R** e **T** de eritrócitos humanos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue (3 ml) foram coletadas, com seringas contendo heparina, da veia antecubital direita de voluntários humanos do gênero masculino (n=12, 20-28 anos), em jejum de 8 a 12 horas. O sangue coletado foi distribuído em frascos de Eppendorf contendo soluções com 0 a 34 g/dl de etanol na presença de 0,9 % de NaCl. Após homogeneização dos frascos, eles foram incubados a 37 °C por 30 minutos e, posteriormente, centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. A ocorrência de hemólise nas diferentes concentrações de etanol foi analisada pela detecção espectrofotométrica (540 nm) da presença de hemoglobina livre. As amostras de sangue também foram preparadas em lâminas histológicas para a visualização dos estados dos eritrócitos humanos, previamente tratados com o corante May-Grünwald-Giemsa, em microscópio Olympus (modelo BX40-F4) acoplado a uma câmera Olympus (modelo Oly-200).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a existência três transições de hemólise em eritrócitos humanos em função da concentração de etanol entre 0 e 34 g.dl⁻¹.

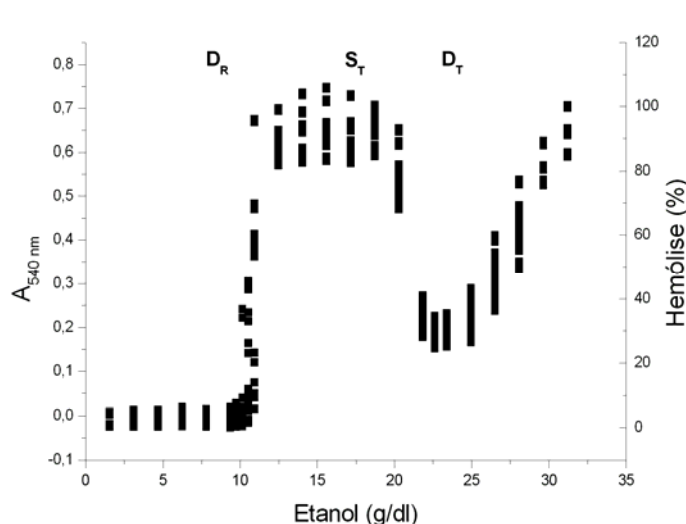


Figura 1: Dependência da porcentagem de hemólise do sangue humano com a concentração de etanol em 0,9% de NaCl, mostrando 1) uma transição de desnaturação do estado **R** (**D_R**), entre 10 e 15 g/dl de etanol, 2) uma transição de estabilização do estado **T** (**S_T**), entre 20 e 25 g/dl de etanol, e 3) uma transição de desnaturação do estado **T** (**D_T**), entre 25 e 34 g/dl de etanol.

A concentração de etanol do ponto médio da primeira transição ($11,17 \pm 0,078$ g/dl) representa a hemólise do estado **R**, que foi designada como **D_R**. A concentração de etanol do ponto médio da segunda transição ($20,73 \pm 0,056$ g/dl) representa a osmoestabilização dos eritrócitos, foi denominada de **S_T**. Por fim, a concentração de etanol para o terceiro ponto médio da transição hemolítica ($27,20 \pm 0,097$ g/dl) caracteriza a hemólise do estado **T**, designada de **D_T**.

Os estados **R** e **T** podem ser visualizados na Figura 2, onde podemos notar que no início da primeira transição os eritrócitos estão intactos e expandidos (Fig. 2A). Contudo, próximo ao ponto de transição da segunda para a terceira transição os eritrócitos apresentam-se contraídos (Fig. 2B).

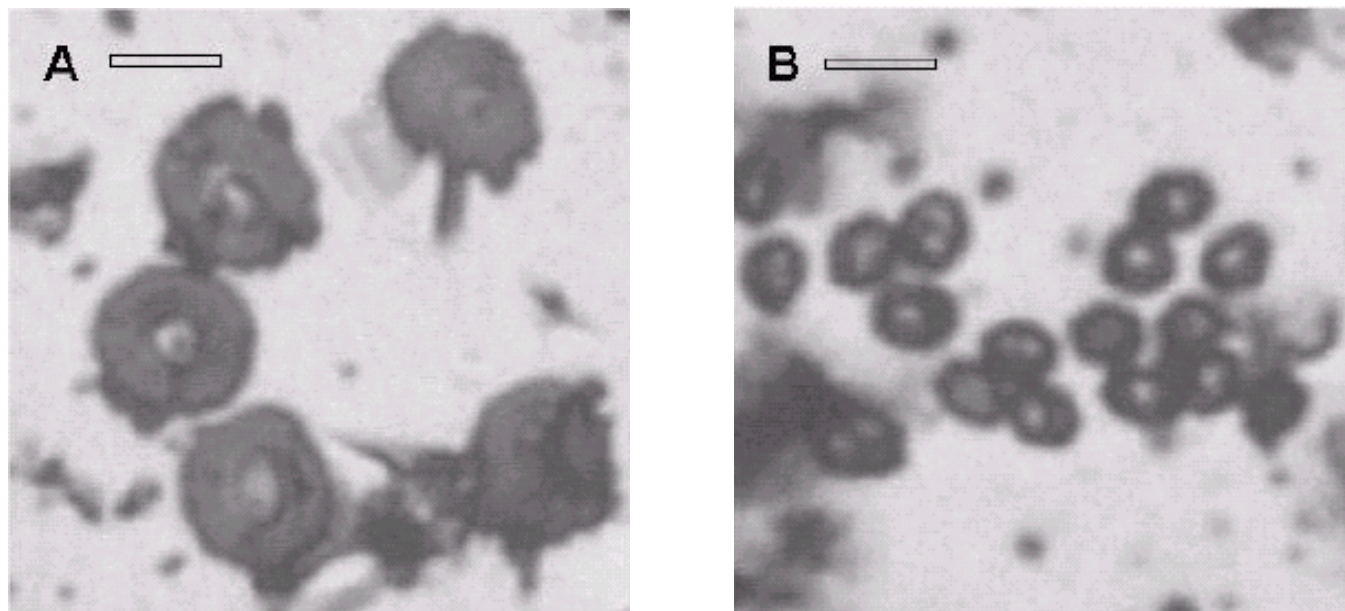


Figura 2. Imagens de microscopia de luz dos eritrócitos humanos em solução de 0,9 % de NaCl com 1,56 g/dl (A) e 25,0 g/dl (B) de etanol. A barra de magnificação em cada micrografia representa 8 μm .

4- CONCLUSÃO

Concluimos que os eritrócitos foram visualizados em um estado intacto e expandido (**R**) em 1,56 g/dl de etanol e em um estado contraído (**T**) em 25,0 g/dl de etanol, embora algumas estruturas tenham aparecido rompidas a esta concentração de etanol. Encontramos três transições sigmóides na faixa de 0 a 34 $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ de etanol a 0,9 % de NaCl, uma desnaturação (primeira transição), uma estabilização (segunda transição) e outra desnaturação (terceira transição).

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, abr. 1996.

BOUSTRON, P.; ARNAUD, F. Comparison of the cryoprotection of red blood cells by 1,2-propanediol and glycerol. *Cryobiology*. v. 21, n. 3, p. 348-358, jun. 1984.

De LOECKER, R. et al. Osmotic effects of dilution on erythrocytes after freezing and thawing in glycerol-containing buffer. *Cryobiology*. v. 30, n. 3, p. 279-285, jun. 1993.

LANG, F. et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, v. 78, n. 1, p. 247-306, jan. 1998.

PELLERIN-MENDES, C. et al. In vitro study of the effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen. *Cryobiology*. v. 35, n. 2, p. 173-186, set. 1997.

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

WAGNER, C.T. et al. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. *Cryobiology*. v. 45, n. 2, p. 153-166, out. 2002.