



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

**CINÉTICA DE LISE MECÂNICA DE ERITRÓCITOS HUMANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS, HEMATOLÓGICAS E OXIDATIVAS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E  
EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Discente: **Lucas Moreira Cunha**

**UBERLÂNDIA, MG**

**2017**



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

**CINÉTICA DE LISE MECÂNICA DE ERITRÓCITOS HUMANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS, HEMATOLÓGICAS E OXIDATIVAS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E  
EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Discente: **Lucas Moreira Cunha**

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

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

**UBERLÂNDIA, MG**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na  
Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da  
UFU, MG, Brasil.

---

C972c  
2017

Cunha, Lucas Moreira, 1986

Cinética de lise mecânica de eritrócitos humanos e sua associação com variáveis bioquímicas, hematológicas e oxidativas em indivíduos saudáveis e em indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 / Lucas Moreira Cunha. - 2017.

75 p. : il.

Orientador: Nilson Penha Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2017.8>

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Eritrócitos - Teses. 3. Cinética - Teses. 4. Hemólise - Teses. I. Silva, Nilson Penha. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 577.1



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

**CINÉTICA DE LISE MECÂNICA DE ERITRÓCITOS HUMANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS, HEMATOLÓGICAS E OXIDATIVAS EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Estudante: **Lucas Moreira Cunha**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

<b>Presidente:</b>	<b>Prof. Dr. Nilson Penha-Silva</b>	[UFU]
<b>Examinador:</b>	<b>Prof. Dr. Miguel Júnior Sordi Bortolini</b>	[UFAC]
<b>Examinador:</b>	<b>Prof. Dr. Morun Bernardino Neto</b>	[USP]
<b>Examinador:</b>	<b>Prof. Dr. Elmiro Santos Resende</b>	[UFU]
<b>Examinador:</b>	<b>Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho</b>	[UFU]

Data da defesa: **06/09/2017**

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

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

Três verbos existem que, bem conjugados,  
serão lâmpadas luminosas em nosso caminho :  
aprender, servir e cooperar”

*(Chico Xavier )*

## DEDICATÓRIA

A Deus,  
por me conceder a vida e permitir que eu continue seguindo meus passos.

A todos meus familiares,  
em especial aos meus pais e minha irmã, pelo amor incondicional.

A todos meus professores,  
pela inspiração e ensinamentos transmitidos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de vivenciar esta experiência e poder citar e agradecer a todos que estiveram ao meu lado ao longo desta caminhada. Obrigado, Senhor, por colocar estas pessoas caprichosamente na minha vida.

A todos os membros da minha família, que sempre estiveram ao meu lado, fornecendo apoio e carinho.

A minha mãe, Chirlei de Fátima Cunha, por todos os momentos dedicados a mim, pelo amor e carinho de mãe.

Um agradecimento em especial ao meu pai, Ayrton Rodrigues da Cunha (*in memoriam*), pela sua presença espiritual constante, por ter sido um dos grandes incentivadores dessa minha trajetória, e por ter deixado tantos ensinamentos e bons sentimentos, sempre presentes na minha memória e no meu coração.

Aos meus avós, Djanira Maria Moreira e José Moreira Guimarães (*in memoriam*), pelo amor incondicional e por depositar todos os dias a benção sobre mim.

A minha irmã querida, Caroline Moreira Cunha, sem dúvida o melhor presente que eu recebi de Deus, uma dádiva, que desde os meus primeiros passos, me estendeu a mão e me convidou para caminhar ao seu lado de mãos dadas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nilson Penha Silva, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho e meu respeito e admiração pela sua serenidade, e pelo seu dom no ensino da ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

A todos meus amigos do Laboratório de Biofísicoquímica (LaBFiQ), em especial à Letícia Ramos de Arvelos e à Juliana Carla da Costa Huss, pessoas que me ensinaram os primeiros passos dentro desta área de pesquisa, com paciência e sempre dispostas a ajudar. Sou muito grato.

Agradeço ainda a todos os professores que me acompanharam ao longo da vida e contribuíram de maneira decisiva para minha formação.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao curso de Pós Graduação em Genética e Bioquímica e às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelos auxílios prestados, que foram determinantes para o desenvolvimento desta tese.

## SUMÁRIO

	Página
<b>Abreviaturas</b> .....	ix
<b>Lista de Figuras</b> .....	x
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xi
<b>Apresentação</b> .....	1
<b>Capítulo 1 [Fundamentação Teórica]</b> .....	2
Membrana biológica de eritrócitos .....	3
Deformabilidade de eritrócitos .....	5
Deformabilidade e composição de membranas.....	6
Deformabilidade e estresse oxidativo .....	8
<i>Diabetes mellitus</i> e membranas de eritrócitos .....	9
Cinética enzimática de Michaelis-Menten .....	11
Considerações finais .....	12
Referências .....	16
<b>Capítulo 2 [Influence of biochemical and hematologic variables on mechanical lysis kinetics of human erythrocytes]</b> .....	27
Resumo .....	28
Abstract .....	29
Introdução .....	30
Material e Métodos .....	31
Resultados .....	33
Discussão .....	34
Conclusões .....	36
Referências .....	42
<b>Capítulo 3 [Correlações entre variáveis cinéticas de lise mecânica de eritrócitos e variáveis bioquímicas, hematológicas e oxidativas no <i>diabetes mellitus</i> tipo 1]</b> .....	48
Resumo .....	49
Abstract .....	51
Introdução .....	53
Material e Métodos .....	56
Resultados .....	59
Discussão .....	60
Conclusões .....	64
Referências .....	69



## ABREVIATURAS

AE1	Anion exchanger 1
$A_{\max}$	Absorvância com percentual máximo de hemólise
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
HDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade
8-OHdG	8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina
ICAM-4	Proteína de membrana com função adesiva
$K_M$	Constante de meia saturação de uma enzima
IDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Densidade Intermediária
LDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade
MCV	Volume Corpuscular Médio
MCHC	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
MCH	Hemoglobina Corpuscular Média
MDA	Malondialdeído
O <sub>2</sub>	Oxigênio
RBC	Células Vermelhas do Sangue
RDW	Distribuição de volume das células vermelhas do sangue
SFA	Ácido Graxo Saturado
t	Tempo
$t_{1/2}$	Tempo transcorrido para ocorrência de metade da lise total
t-C	Colesterol total plasmático
TGC	Triglicérides
UFA	Ácido Graxo Insaturado
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
<b>Figura 1.1</b> Representação esquemática das proteínas de membrana e do citoesqueleto determinantes da estabilidade e deformabilidade de eritrócitos	13
<b>Figura 1.2</b> 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 $K_M$ )	14
<b>Figura 1.3</b> Dependência da formação de produto com o tempo em uma reação de catálise enzimática	15
<b>Figura 2.1</b> Schematic representation of the apparatus developed for analysis of the kinetics of mechanical lysis of erythrocytes.	37
<b>Figura 2.2</b> Kinetics of mechanical lysis of human erythrocytes under different rotation tensions	38
<b>Figura 2.3</b> Typical curve of the kinetics of mechanical lysis of erythrocytes, illustrating the meaning of the kinetic parameters $t_{1/2}$ and $A_{\max}$	39
<b>Figura 3.1</b> Representação esquemática do aparelho desenvolvido para análise da cinética da lise de eritrócitos por estresse mecânico	65
<b>Figura 3.2</b> Cinética de lise mecânica de suspensão de eritrócitos de dois participantes do estudo em solução de NaCl a 0,9 g/dL	66

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 2.1</b> Descriptive statistics of experimental data obtained for the study population (n=20)	40
<b>Tabela 2.2</b> Matrix of Spearman correlations (r) and significance (p) between pairs of variables	41
<b>Tabela 3.1</b> Características de base da população estudada	67
<b>Tabela 3.2</b> Coeficientes de correlação de Spearman entre variáveis de lise mecânica de eritrócitos e algumas variáveis sanguíneas	68

## APRESENTAÇÃO

Os eritrócitos são células que desempenham a função essencial de transporte dos gases respiratórios, determinante para a homeostase corporal. Durante a circulação sanguínea, estas células são submetidas a condições extremas de força mecânica durante sua passagem por pequenos capilares. Para se manterem íntegras, estas células devem ser capazes de sofrer deformações e recuperação de sua forma, propriedade esta denominada de deformabilidade. Diversas condições fisiológicas e patológicas podem promover alterações fisicoquímicas na membrana destas células, afetando sua deformabilidade e sua funcionalidade, comprometendo assim a microcirculação, o transporte dos gases respiratórios e, conseqüentemente, as funções de outras células e tecidos. Diante da importância de analisar as propriedades mecânicas dos eritrócitos, nosso grupo de pesquisa propôs a padronização de um método científico com a finalidade de analisar o perfil cinético de lise mecânica de eritrócitos. Este método foi criado com o objetivo de estudar e analisar a capacidade de deformabilidade das membranas dos eritrócitos, observando a resistência à lise em resposta a agressão mecânica. Estas análises foram realizadas utilizando um aparelho desenvolvido pelo nosso grupo e o método foi padronizado utilizando os princípios do formalismo cinético de Michaelis-Menten. Para cada indivíduo analisado foram geradas curvas cinéticas de lise mecânica de eritrócitos, com o objetivo de obter parâmetros matemáticos ( $t_{1/2}$  e  $A_{max}$ ) representativos do perfil de lise eritrocitária de cada indivíduo. Posteriormente à padronização e adequação do método, o mesmo foi aplicado em outro estudo para analisar o comportamento de eritrócitos em uma condição patológica, o diabetes mellitus tipo 1. Os valores de  $t_{1/2}$  e  $A_{max}$  foram correlacionados com parâmetros bioquímicos, hematológicos e oxidativos para entender as possíveis associações do comportamento de eritrócitos nesta doença, mas essencialmente para testar a validade do uso dos parâmetros da cinética de lise de eritrócitos para estudar o conjunto de variáveis que tem influência sobre o comportamento destas células sanguíneas.

# **Fundamentação Teórica**

## **Membrana biológica de eritrócitos**

As membranas biológicas são complexos organizacionais celulares que delimitam o meio interno da célula, separando-o do meio extracelular. A membrana celular atua 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 (Cooper, 1977), com presença de diversas outras moléculas, como glicolipídeos, colesterol e proteínas (Singer & Nicolson, 1972).

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

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).

Estas proteínas são essenciais para garantir a funcionalidade das membranas biológicas, promovendo o transporte seletivo de substâncias entre o meio intracelular e extracelular (proteínas transportadoras) (Campbell, 2000; Storry, 2000), além da captação de sinais externos (proteínas receptoras), dentre outras funções (Campbell, 2000).

As proteínas presentes na membrana do eritrócito também possuem papel relevante na manutenção de sua integridade física, principalmente as que estão ligadas ao citoesqueleto, contribuindo para caracterizar a propriedade de membrana definida como estabilidade (Campbell, 2000; Evans & Hochmuth, 1977; Fischer, Haest, Stohr, Kamp, & Deuticke, 1978; Liu & Palek, 1980; Mohandas, Chasis, & Shohet, 1983; Smith & Palek, 1983; van den Akker, Satchwell, Williamson, & Toye, 2010).

Nos eritrócitos, as proteínas que aparecem inseridas na membrana 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) e os co-transportadores  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ ,  $\text{Ca}^{+2}\text{ATPase}$  e  $\text{Na}^+\text{K}^+(\text{Cl}^-)_2$ , dentre outras (Mohandas & Gallagher, 2008). Dentre as proteínas com função adesiva destaca-se a ICAM-4, que interage com as integrinas de membranas, promovendo 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 extramembranar 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 (Gallager, Forget, & Lux, 1998).

As proteínas periféricas que formam o citoesqueleto da membrana eritrocitária são constituídas principalmente por espectrina, actina, anquirina e banda 4.1. O citoesqueleto presente na membrana das hemácias é constituído por tetrâmeros de espectrina, proteína considerada determinante da estabilidade, estrutura e forma da membrana celular (Naydenov & Ivanov, 2011).

A espectrina é encontrada ligada a outras proteínas intracelulares, formando uma rede de sustentação na membrana celular. Um destes sítios de ancoragem que podemos citar, ocorre pela sua ligação à anquirina, que, por sua vez, se encontra ligada à banda 3 "imobilizada" presente na bicamada lipídica. Outro ponto de ancoragem ocorre através da sua interação com a banda 4.1, que se encontra em contato com a actina e a glicoforina (Li & Lykotrafitis, 2014).

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, conseqüentemente, na sua funcionalidade. O eritrócito em especial, é uma célula que constantemente é submetida a condições adversas durante sua circulação pelo organismo; dessa forma, a manutenção de sua integridade físico-química é um fator determinante para que esta célula consiga desempenhar suas funções de forma eficaz.

## Deformabilidade de eritrócitos

O eritrócito é uma célula que possui forma discoide bicôncava e consistência flexível. Esta característica é essencial, pois para permanecerem íntegros durante sua circulação pelo corpo, os eritrócitos devem ser capazes de sofrer uma extensa deformação passiva, resistindo assim à fragmentação, principalmente durante a sua passagem pelos pequenos capilares e poros estreitos do sistema retículo-endotelial, especialmente no baço (Smith, Marks, & Lieberman, 2007). Esta propriedade é classificada como deformabilidade e refere-se à capacidade das membranas celulares de sofrer modificações morfológicas, com a recuperação completa de sua forma.

A função primordial dos eritrócitos, que é o transporte de oxigênio ( $O_2$ ) dos pulmões para os tecidos e a remoção de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) dos tecidos em direção aos pulmões, depende da deformabilidade destas células, para garantir a eficiência deste processo (Wang & Popel, 1993). A deformabilidade de eritrócitos é determinada principalmente por fatores geométricos, como a relação superfície-volume da célula, pela viscosidade do fluido intracelular (sobretudo pela presença de hemoglobina) e pelas propriedades da membrana (Tomaiuolo, 2014).

As membranas celulares dos eritrócitos possuem um sistema estrutural complexo envolvendo o citoesqueleto. Os principais componentes deste complexo são as proteínas esqueléticas, como a espectrina, a banda 3, a actina, a anquirina, a tropomiosina e as proteínas 4.1 e 4.9 (Cooper & Haussman, 1997) (**Figura 1.1**). Este complexo multiprotéico determina tanto a forma da célula, como sua mobilidade e deformabilidade, bem como o transporte de macromoléculas (Salmon, Cartron, & Rouger, 1984). Dessa forma, a composição estrutural da membrana de eritrócitos é fundamental para a deformabilidade e estabilidade destas células (Chasis & Mohandas, 1986; Evans & Hochmuth, 1977; Fischer et al., 1978; Liu & Palek, 1980; Smith & Palek, 1983).

Dentre estas proteínas merecem destaque a espectrina, que desempenha um papel importante na sustentação da membrana e caracteriza-se como uma proteína periférica responsável pelo fenômeno dos *ghosts* eritrocitários. A espectrina e os polipeptídeos associados são responsáveis tanto pelo formato das hemácias quanto pela sua deformabilidade, além de constituírem elementos estabilizadores da bicamada lipídica. Durante muito tempo, esta proteína foi considerada específica de glóbulos vermelhos; no



entanto, sabe-se que ela está presente em muitos outros tecidos (Murador & Deffune, 2007; Salmon et al., 1984).

Outra proteína que merece destaque é a banda 3 ou proteína de troca de íons (*anion exchanger 1*, AE1), que por interação com lipídeos e outras proteínas de membrana, confere aos eritrócitos propriedades mecânicas e elásticas, regulando a viscosidade sanguínea (Cooper & Haussman, 1997; Murador & Deffune, 2007).

### **Deformabilidade e composição de membranas**

A composição das membranas biológicas é outro fator determinante para a estabilidade (Cooper, Arner, Wiley, & Shattil, 1975; Schick & Schick, 1985a, 1985b) e a deformabilidade (Bryszewska, Watala, & Torzecka, 1986; Chabanel et al., 1983; Cooper, 1977; Dwight, Ribeiro, & Hendry, 1996; Kohno et al., 1997; Martínez et al., 1996; Muller, Ziegler, Donner, Drouin, & Stoltz, 1990) de eritrócitos.

Um dos principais componentes das membranas celulares, o colesterol é determinante para sua funcionalidade. O teor de colesterol nos eritrócitos está relacionado com as alterações do perfil lipídico do soro em determinadas condições fisiológicas (Calişkan, Calişkan, Kuralay, & Önvural, 2000; Dwight et al., 1996; Uydu et al., 2012; Uyuklu, Meiselman, & Baskurt, 2007), isto porque é comum a troca de colesterol entre eritrócitos e lipoproteínas plasmáticas (Mason, Walter, Day, & Jacob, 2006; Uydu et al., 2012). No caso dos eritrócitos, o aumento no teor de colesterol resulta na diminuição da sua deformabilidade e fluidez, podendo levar a comprometimento das propriedades reológicas e da fragilidade osmótica (Kanakaraj & Singh, 1989; Koter, Franiak, Strychalska, Broncel, & Chojnowska-Jezierska, 2004; Ramanadham & Kaplay, 1982; Uydu et al., 2012; Vaya et al., 2008).

Os eritrócitos possuem uma capacidade mínima de armazenamento de éster de colesterol e, como células anucleadas, carecem de meios para a síntese de colesterol. Como os eritrócitos não têm membranas intracelulares e sofrem trocas difusais inespecíficas de colesterol com seu meio (Gottlieb, 1980; Schick & Schick, 1985a, 1985b), o conteúdo de colesterol da membrana plasmática é particularmente susceptível ao colesterol sérico (Koter et al., 2004).

Em uma condição fisiológica de aumento de colesterol da LDL, uma parte do excesso deste colesterol é direcionado para a membrana celular (Martínez et al., 1996), diminuindo a fluidez e a deformabilidade do eritrócito (Cooper, 1977; Dwight et al., 1996; Muller et al., 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). Dessa forma, a hipercolesterolemia aumenta o teor de colesterol na membrana do eritrócito, afetando suas propriedades. Em contrapartida, a redução da colesterolemia determina efeitos contrários, uma vez que, tratamentos realizados com estatinas demonstraram uma redução no teor de colesterol na membrana de eritrócitos (Levy, Leibowitz, Aviram, Brook, & Cogan, 1992; Lijnen, Celis, Fagard, Staessen, & Amery, 1994; Martínez et al., 1996), determinando uma redução da viscosidade sanguínea e melhora na microcirculação (Martínez et al., 1996). Outros estudos realizados *in vitro* também demonstraram que a fluidez da membrana dos eritrócitos diminui e, conseqüentemente, a estabilidade aumenta de acordo com o aumento paralelo da proporção de colesterol/fosfolípideo na membrana, por indução exógena (Cooper, Leslie, Fischkoff, Shinitzky, & Shattil, 1978).

Em humanos, alguns casos clínicos estudados demonstraram uma relação entre a redução do colesterol sérico em pacientes que apresentavam anemias hemolíticas diversas, e têm sido propostos que este fato decorre do consumo de colesterol por uma ávida eritropoiese (Atac, Brahaj, Frishman, & Lerner, 2002). Estes estudos sugerem que, assim como o colesterol sérico pode afetar a população de eritrócitos, os eritrócitos também podem afetar reciprocamente os níveis de colesterol no soro. Dessa forma, em apoio a este e outros postulados, os eritrócitos humanos parecem atuar como um reservatório de colesterol para as lipoproteínas séricas (Chung et al., 1998; Nikolić et al., 2007).

A estabilidade e deformabilidade da membrana de eritrócitos dependem de um intervalo crítico de teor de colesterol acima do qual estas células ficam com suas propriedades comprometidas (De Freitas et al., 2010; Dole et al., 2008; Meurs et al., 2005). Portanto, o comportamento reológico do sangue e as propriedades dos eritrócitos podem ser influenciados pelas alterações na composição de membrana destas células, podendo assim afetar suas formas e funções, bem como as funções de outros sistemas.

## Deformabilidade e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição decorrente do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a ação de agentes antioxidantes, levando a uma quebra na homeostase oxi-redutora cuja manifestação é a agressão oxidativa de moléculas, células e tecidos (Halliwell & Whiteman, 2004).

A elevação não compensada destas substâncias oxidantes está relacionada a prejuízos estruturais e fisiológicos, tais como oxidação de grupos sulfidrilas de proteínas, peroxidação de lipídeos e mudança na permeabilidade iônica da membrana eritrocitária (Çimen, 2008; Snyder et al., 1988).

Uma condição crônica de estresse oxidativo tem implicações relevantes na etiologia de várias condições não transmissíveis crônicas, como obesidade, aterosclerose, *diabetes*, câncer, demência e parkinsonismo (Ferrari, 2004; Green & Kroemer, 2004).

No *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), o estresse oxidativo pode ser ocasionado por aumento na produção de substâncias oxidantes ou por depleção dos sistemas fisiológicos de defesa antioxidante, determinando, assim, aumento na geração de radicais livres (Zhao, 2001). Esse aumento na produção de agentes oxidantes está associado às alterações regulatórias e metabólicas determinantes da hiperglicemia, dislipidemia e elevação na produção de ácidos graxos livres (FFA) e de outros metabólitos (Evans, Goldfine, Maddux, & Grodsky, 2003; Giugliano, Ceriello, & Paolisso, 1996; Itani, Ruderman, Schmieder, & Boden, 2002), em consequência de resistência à insulina e/ou de deficiência na produção desse hormônio (Kuroki, Isshiki, & King, 2003).

Alguns estudos também apontam para a existência de associação entre estresse oxidativo e *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1). Em um destes estudos foi encontrado um aumento nas concentrações de malonaldeído (MDA) durante os estágios ainda precoces da doença, com potencial de manter-se elevado em seus estágios mais avançado, e níveis reduzidos de glutathione peroxidase nos estágios iniciais e um progressivo declínio no curso da doença (Domínguez, Ruiz, Gussinye, & Carrascosa, 1998).

Outros estudos também demonstraram a associação entre estresse oxidativo e DM1, determinados por outros marcadores de estresse oxidativo, como redução na capacidade antioxidante total do plasma (quantificada por quimioluminescência) (Vessby, Basu, Mohsen, Berne, & Vessby, 2002), aumento de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) e

presença de microalbuminúria (Domínguez et al., 1998; Hata et al., 2006; Huvers et al., 1999).

A geração de radicais livres ocorre, sobretudo, nas mitocôndrias, nas membranas celulares e no citoplasma. Nas membranas, o estresse oxidativo pode desencadear distúrbios funcionais e estruturais irreversíveis. Os radicais livres produzidos neste processo podem promover o ataque aos lipídios de membrana, processo conhecido como peroxidação lipídica. Outra alteração possível é a reação destes radicais livres com as proteínas da membrana, incluindo as com que possuem funções estruturais, de transporte de íons e outras proteínas envolvidas em vias de transdução de sinal (Koter et al., 2004; Kung, Tseng, & Wang, 2009; Mason et al., 2006; Uydu et al., 2012).

A membrana eritrócitária é altamente suscetível a alterações estruturais decorrentes da peroxidação lipídica, por causa de sua constante exposição ao oxigênio e de seu alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (Kolanjiappan, Manoharan, & Kayalvizhi, 2002). Como tem sido revelado em estudos desenvolvidos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kuypers, 1998), a peroxidação lipídica é capaz de promover alterações prejudiciais sobre a integridade das membranas eritrocitárias e sobre algumas propriedades estruturais e funcionais destas células, como permeabilidade, microviscosidade, deformabilidade, estabilidade e longevidade (Arslan, Metin Çomu, Küçük, Öztürk, & Yaylak, 2012; Sivilotti, 2004).

### ***Diabetes mellitus e membrana de eritrócitos***

O *diabetes mellitus*, assim como outras doenças, pode afetar as propriedades mecânicas de eritrócitos, com alteração na deformabilidade destas células e aumento na resistência ao fluxo sanguíneo (Chien, 1987).

No diabetes, a deformabilidade de eritrócitos se mostra diminuída quando comparada com indivíduos não diabéticos (Ernst & Matrai, 1986; Kunt et al., 1999; McMillan, Utterback, & La Puma, 1978). Estas alterações na deformabilidade e estabilidade de eritrócitos foram associadas a alterações glicêmicas (Zinchuk, 2001). Quando submetidos a altas concentrações de glicose, os eritrócitos apresentam menor deformabilidade (Kung et al., 2009) e maior fragilidade osmótica (Caimi et al., 1993; Igbokwe & Igbokwe, 2016; Jain, 1989; Lemos, Márquez-Bernardes, Arvelos, Paraíso, & Penha-Silva, 2011; Quan et al., 2008). A origem destas alterações seria a glicação de

proteínas estruturais de membrana (Kung et al., 2009). Shin e colaboradores, demonstraram que em diabéticos as proteínas do citoesqueleto de eritrócitos são fortemente glicadas e que a espectrina é oxidativamente danificada (Buys et al., 2013; Shin et al., 2007). Esta seria a razão pela qual a exposição destas células a concentrações plasmáticas elevadas de glicose é capaz de reduzir a deformabilidade eritrocitária em indivíduos diabéticos (Babu & Singh, 2004; Vague & Juhan, 1983).

Um estudo realizado com pacientes com DM2 mostrou que níveis elevados de hemoglobina glicada estão associados a aumento na fragilidade de eritrócitos (Kung et al., 2009). Este aumento na fragilidade pode ser justificado pelo aumento na rigidez da membrana eritrocitária desencadeado pelo efeito da ligação entre as moléculas de glicose e as proteínas intracelulares e de membrana, quando estas células são submetidas em meios com alta concentração de glicose (Igbokwe & Igbokwe, 2016; Traykov & Jain, 1987). Outros estudos mostraram que a incubação de eritrócitos em concentrações elevadas de glicose também promove aumento na peroxidação lipídica da membrana (Jain, 1989), redução de sua fluidez (Caimi et al., 1993), além de aumento de sua fragilidade osmótica.

Tanto no DM1 como no DM2, um mau controle glicêmico também pode estar associado a elevação intensa nos níveis séricos de triglicérides, VLDL-C e IDL-C, mas moderada nos níveis de LDL-C, além de redução de HDL-C (Feingold & Grunfeld, 2015). Este quadro dislipidêmico pode causar um desequilíbrio no teor de lipídios de membrana (Cooper, 1977; Miller, Gravallesse, & Bunn, 1980; Nigra et al., 2016), alterando sua fluidez (Nigra et al., 2016; Symeonidis et al., 2001) e, consequentemente, reduzindo a deformabilidade (Bryszewska et al., 1986; Kohno et al., 1997) e a longevidade destas células (Nigra et al., 2016; Umudum, Yücel, Şahin, & Bakan, 2002). Isto significa que é importante otimizar o controle glicêmico em indivíduos diabéticos, para que eles fiquem menos susceptíveis aos efeitos prejudiciais secundários associados à dislipidemia.

O DM1 e a deformabilidade já foram alvos de alguns estudos, que mostraram ocorrência de redução na deformabilidade de eritrócitos nesta população (Garnier et al., 1990; Juhan, Bayle, Vague, & Juhan, 1978; Kunt et al., 1999) e reversão dessa anormalidade 24 horas após infusão controlada de insulina (Garnier et al., 1990; Juhan et al., 1978). A redução na deformabilidade de eritrócitos está associada a alterações hemorreológicas, podendo desencadear complicações microvasculares (Simpson, 1985; Tsukada, Sekizuka, Oshio, & Minamitani, 2001) e ineficiência no transporte de oxigênio para os tecidos

(Dévéhat, Vimeux, Bondoux, & Khodabandehlou, 1991; Parthasarathi & Lipowsky, 1999; Tsukada et al., 2001).

Em suma, indivíduos diabéticos estão sujeitos a apresentar estresse oxidativo, estresse hiperglicêmico e dislipidemia, condições que podem determinar alterações nas propriedades de eritrócitos e nas características reológicas do sangue, comprometendo ainda mais sua saúde.

### Cinética enzimática de Michaelis-Menten

A análise cinética das reações enzimáticas é comumente determinada à partir da equação de Michaelis-Menten (Menten & Michaelis, 1913),

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

representada pela 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 1.2).

A cinética de Michaelis-Menten foi desenvolvida a partir de considerações fundamentadas no equilíbrio de estado estacionário de Briggs-Haldane (Briggs & Haldane, 1925),



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 ( $P$ ), com regeneração da enzima livre ( $E$ ), caracterizada pela constante cinética  $k_{+2}$ .

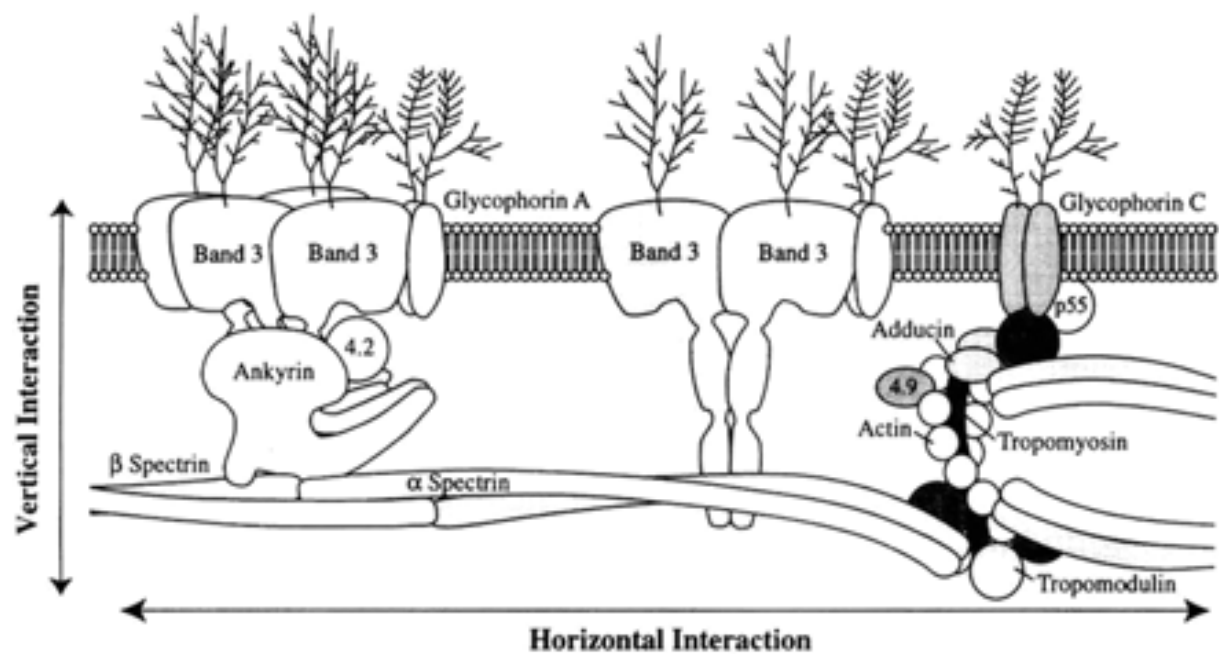
No curso da reação, a enzima é encontrada sob a forma livre ( $E$ ) e a forma ligada ao substrato ( $ES$ ). Em baixas concentrações de substrato, a maior quantidade de enzima está na forma livre. Sob estas condições, a velocidade inicial da reação ( $v_0$ ) (Figura 1.3) aumenta quase linearmente com o aumento de  $S$ , uma vez que há enzima livre para promover aumento na velocidade da reação. À medida que ocorre maior aumento na concentração de  $S$ , mas a concentração total da enzima no meio permanece constante, o aumento em  $v_0$  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  $V_{\max}$  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 1.2**) .

A cinética de Michaelis-Menten é um dos métodos utilizados para estudo da cinética de processos saturáveis em sistemas biológicos. Dessa forma, processos biológicos, como a cinética de lise de eritrócitos, que é ajustável por regressão não linear hiperbólica, pode ser analisada utilizando os princípios matemáticos do modelo cinético de Michaelis e Menten (Menten & Michaelis, 1913).

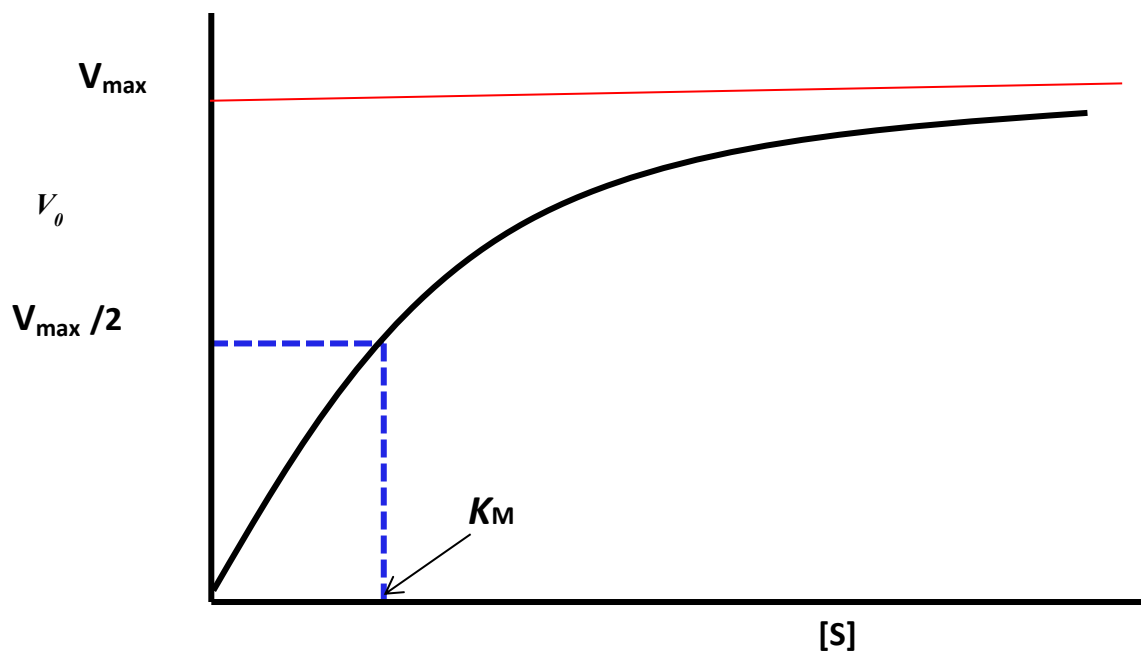
### **Considerações finais**

As propriedades fisicoquímicas das membranas de eritrócitos são essenciais na determinação da funcionalidade dessas células. Alterações nas propriedades viscoelásticas dos eritrócitos podem afetar a microcirculação e comprometer as funções de outros sistemas. Em nosso organismo, diversas condições patológicas podem afetar a estrutura e a composição dessas células, o que contribui para o agravamento destas condições. O amplo conjunto de fatores bioquímicos e fisiológicos envolvidos neste processo ainda não foi totalmente elucidado. Esta revisão da literatura objetivou instrumentar a compreensão de questões relevantes no estabelecimento de um novo método, capaz de analisar a resistência à lise de eritrócitos humanos por estresse mecânico, para aplicá-lo neste momento, no estudo de pacientes com diabetes tipo 1.

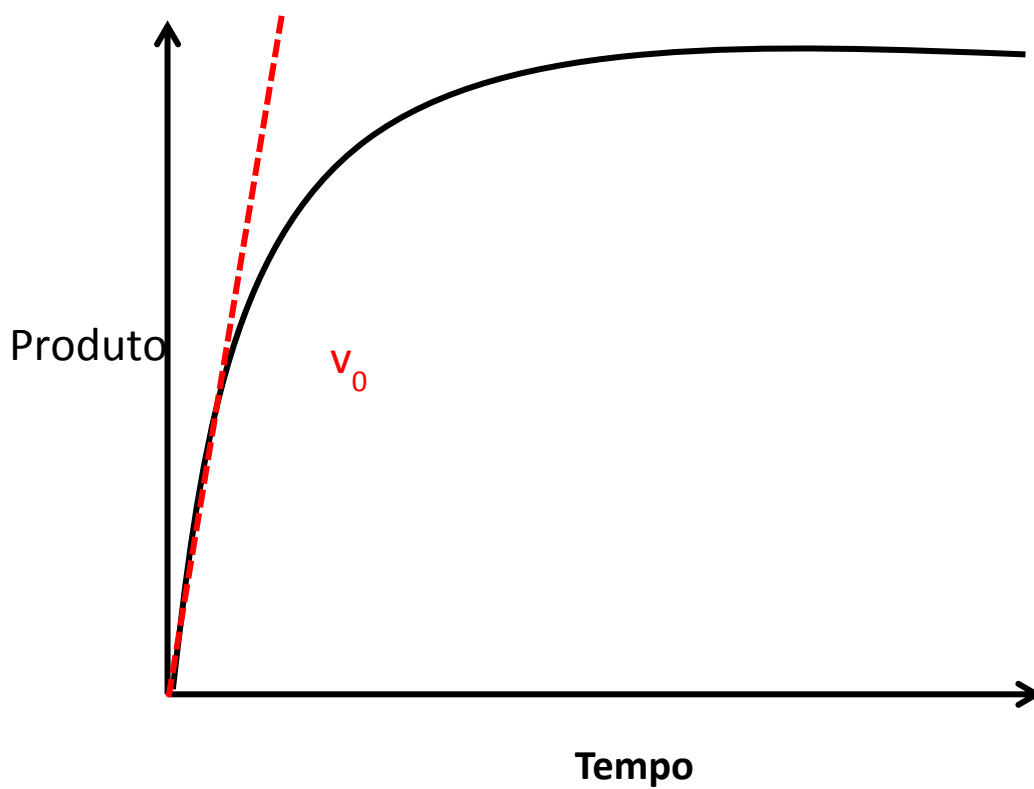


**Figura 1.1.** Representação esquemática das proteínas de membrana e do citoesqueleto determinantes da estabilidade e deformabilidade de eritrócitos. Fonte: Tse & Lux, 1999.





**Figura 1.2.** 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 1.3.** 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.

## Referências

- Arslan, M., Metin Çomu, F., Küçük, A., Öztürk, L., & Yaylak, F. (2012). Dexmedetomidine protects against lipid peroxidation and erythrocyte deformability alterations in experimental hepatic ischemia reperfusion injury. *Libyan Journal of Medicine*, 7(1), 18185.  
<https://doi.org/10.3402/ljm.v7i0.18185>
- Atac, B., Brahaj, D., Frishman, W. H., & Lerner, R. (2002). Anemia and hypocholesterolemia. *Heart disease (Hagerstown, Md.)*, 5(1), 65-71.  
<https://doi.org/10.1097/01.HDX.0000050420.79522.09>
- Babu, N., & Singh, M. (2004). Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 31(4), 273-280.
- Briggs, G. E., & Haldane, J. B. S. (1925). A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical journal*, 19(2), 338.  
<https://doi.org/10.1042/bj0190338>
- Bryszewska, M., Watala, C., & Torzecka, W. (1986). Changes in fluidity and composition of erythrocyte membranes and in composition of plasma lipids in type I diabetes. *British journal of haematology*, 62(1), 111-116.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1986.tb02906.x>
- Buys, A. V., Van Rooy, M.-J., Soma, P., Van Papendorp, D., Lipinski, B., & Pretorius, E. (2013). Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovascular diabetology*, 12(1), 25.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-25>
- Caimi, G., Serra, A., Lo Presti, R., Grifò, G., Romano, A., Catania, A., . . . Sarno, A. (1993). Red cell Ca<sup>2+</sup> content (total and cytosolic) and erythrocyte membrane fluidity in several clinical conditions. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 13(2), 227-235.
- Calışkan, S., Calışkan, M., Kuralay, F., & Önvural, B. (2000). Effect of simvastatin therapy on blood and tissue ATP levels and erythrocyte membrane lipid composition. *Research in Experimental Medicine*, 199(4), 189-194.
- Campbell, M. K. (2000). *Bioquímica* (3ª ed.). Porto Alegre, Brasil: Artmed.
- Cartron, J. P., & Colin, Y. (2001). Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol*, 8(3), 163-199.  
[https://doi.org/10.1016/S1246-7820\(01\)00142-2](https://doi.org/10.1016/S1246-7820(01)00142-2)

- Chabanel, A., Flamm, M., Sung, K., Lee, M., Schachter, D., & Chien, S. (1983). Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophysical journal*, 44(2), 171-176.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84288-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84288-X)
- Chasis, J. A., & Mohandas, N. (1986). Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *The Journal of cell biology*, 103(2), 343-350.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.103.2.343>
- Chien, S. (1987). Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annual review of physiology*, 49(1), 177-192.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.49.030187.001141>
- Chung, B. H., Franklin, F., Cho, B. S., Segrest, J., Hart, K., & Darnell, B. E. (1998). Potencies of lipoproteins in fasting and postprandial plasma to accept additional cholesterol molecules released from cell membranes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 18(8), 1217-1230.  
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.8.1217>
- Çimen, M. B. (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 390(1), 1-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.12.025>
- Cooper, G., & Haussman, R. (1997). *The cell surface. The Cell. A Molecular Approach*, ASM Press, Washington DC, 477.
- Cooper, R. A. (1977). Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital*, 297(7), 371-377.
- Cooper, R. A., Arner, E., Wiley, J., & Shattil, S. (1975). Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *Journal of Clinical Investigation*, 55(1), 115.  
<https://doi.org/10.1172/JCI107901>
- Cooper, R. A., Leslie, M. H., Fischkoff, S., Shinitzky, M., & Shattil, S. J. (1978). Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid. *Biochemistry*, 17(2), 327-331.  
<https://doi.org/10.1021/bi00595a021>
- Cullis, P. R., & de Kruijff, B. (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, 559(4), 399-420.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4157\(79\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0304-4157(79)90012-1)

- De Freitas, M. V., De Oliveira, M. R., Dos Santos, D. F., Netto, R. d. C. M., Fenelon, S. B., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *Journal of Membrane Biology*, 233(1-3), 127-134.  
<https://doi.org/10.1007/s00232-010-9232-y>
- Dévéhat, L., Vimeux, M., Bondoux, G., & Khodabandehlou, T. (1991). Effects of buflomedil on microvascular disorders in diabetic patients. *Journal of Vascular Research*, 28(Suppl. 1), 38-43.  
<https://doi.org/10.1159/000158919>
- Dole, V. S., Matuskova, J., Vasile, E., Yesilaltay, A., Bergmeier, W., Bernimoulin, M., . . . Krieger, M. (2008). Thrombocytopenia and platelet abnormalities in high-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(6), 1111-1116.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.162347>
- Domínguez, C., Ruiz, E., Gussinye, M., & Carrascosa, A. (1998). Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes care*, 21(10), 1736-1742.  
<https://doi.org/10.2337/diacare.21.10.1736>
- Dwight, J. S., Ribeiro, A. M., & Hendry, B. (1996). Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. *Clinica Chimica Acta*, 256(1), 53-63.  
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(96\)06412-1](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(96)06412-1)
- Ernst, E., & Matrai, A. (1986). Altered red and white blood cell rheology in type II diabetes. *Diabetes*, 35(12), 1412-1415.  
<https://doi.org/10.2337/diab.35.12.1412>
- Evans, E. A., & Hochmuth, R. M. (1977). A solid-liquid composite model of the red cell membrane. *J Membr Biol*, 30(4), 351-362.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction? *Diabetes*, 52(1), 1-8.  
<https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.1>
- Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2015). Role of Glucose and Lipids in the Cardiovascular Disease of Patients with Diabetes.
- Ferrari, C. K. (2004). Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*, 5(5), 275-289.  
<https://doi.org/10.1007/s10522-004-2566-z>
- Fischer, T. M., Haest, C. W. M., Stohr, M., Kamp, D., & Deuticke, B. (1978). Selective Alteration of Erythrocyte Deformability by Sh-Reagents - Evidence for an

- Involvement of Spectrin in Membrane Shear Elasticity. *Biochim Biophys Acta*, 510(2), 270-282. doi:Doi 10.1016/0005-2736(78)90027-5  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90027-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90027-5)
- Gallager, P. G., Forget, B. G., & Lux, S. E. (1998). Disorders of Erythrocyte Membrane. In N. DG, O. FA, & O. SH (Eds.), *Hematology of Infancy and Childhood* (5 ed., pp. 544-664). Philadelphia: WB Saunders.
- Garnier, M., Attali, J., Valensi, P., Delatour-Hanss, E., Gaudey, F., & Koutsouris, D. (1990). Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. *Metabolism*, 39(8), 794-798.  
[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(90\)90121-R](https://doi.org/10.1016/0026-0495(90)90121-R)
- Giugliano, D., Ceriello, A., & Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*, 19(3), 257-267.  
<https://doi.org/10.2337/diacare.19.3.257>
- Gottlieb, M. H. (1980). Rates of cholesterol exchange between human erythrocytes and plasma lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 600(2), 530-541.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90454-X)
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629.  
<https://doi.org/10.1126/science.1099320>
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hata, I., Kaji, M., Hirano, S., Shigematsu, Y., Tsukahara, H., & Mayumi, M. (2006). Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. *Pediatrics international*, 48(1), 58-61.  
<https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2006.02156.x>
- Huvers, F. C., De Leeuw, P. W., Houben, A., De Haan, C., Hamulyak, K., Schouten, H., . . . Schaper, N. C. (1999). Endothelium-dependent vasodilatation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1 diabetes under near-normoglycemic conditions. *Diabetes*, 48(6), 1300-1307.  
<https://doi.org/10.2337/diabetes.48.6.1300>
- Igbokwe, N. A., & Igbokwe, I. O. (2016). Phenotypic variations in osmotic lysis of Sahel goat erythrocytes in non-ionic glucose media. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 27(2), 147-154.  
<https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0036>

- Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmieder, F., & Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Diabetes*, 51(7), 2005-2011.  
<https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2005>
- Jain, S. K. (1989). Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(35), 21340-21345.
- Jarolim, P., Rubin, H. L., Zakova, D., Storry, J., & Reid, M. E. (1998). Characterization of seven low incidence blood group antigens carried by erythrocyte band 3 protein. *Blood*, 92(12), 4836-4843.
- Juhan, I., Bayle, J., Vague, P., & Juhan, C. (1978). Déformabilité des hématies chez les diabétiques. *Nouv Presse Med*, 7, 759.
- Kanakaraj, P., & Singh, M. (1989). Influence of hypercholesterolemia on morphological and rheological characteristics of erythrocytes. *Atherosclerosis*, 76(2), 209-218.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9150\(89\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0021-9150(89)90105-6)
- Kohno, M., Murakawa, K.-i., Yasunari, K., Yokokawa, K., Horio, T., Kano, H., . . . Yoshikawa, J. (1997). Improvement of erythrocyte deformability by cholesterol-lowering therapy with pravastatin in hypercholesterolemic patients. *Metabolism*, 46(3), 287-291.  
[https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90255-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90255-9)
- Kolanjiappan, K., Manoharan, S., & Kayalvizhi, M. (2002). Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 326(1), 143-149.  
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00300-5)
- Koter, M., Broncel, M., Chojnowska-Jezierska, J., Klikczynska, K., & Franiak, I. (2002). The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. *European journal of clinical pharmacology*, 58(8), 501-506.  
<https://doi.org/10.1007/s00228-002-0507-9>
- Koter, M., Franiak, I., Strychalska, K., Broncel, M., & Chojnowska-Jezierska, J. (2004). Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(2), 205-215.  
[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00195-X)
- Kung, C.-M., Tseng, Z.-L., & Wang, H.-L. (2009). Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 43(4), 345-351.

- Kunt, T., Schneider, S., Pfützner, A., Goitum, K., Engelbach, M., Schauf, B., . . . Forst, T. (1999). The effect of human proinsulin C-peptide on erythrocyte deformability in patients with type I diabetes mellitus. *Diabetologia*, 42(4), 465-471.  
<https://doi.org/10.1007/s001250051180>
- Kuroki, T., Isshiki, K., & King, G. L. (2003). Oxidative stress: the lead or supporting actor in the pathogenesis of diabetic complications. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(suppl 3), S216-S220.  
<https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000077405.07888.07>
- Kuypers, F. (1998). Red cell membrane damage. *The Journal of heart valve disease*, 7(4), 387-395.
- Lemos, G. S. D., Márquez-Bernardes, L. F., Arvelos, L. R., Paraíso, L. F., & Penha-Silva, N. (2011). Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell biochemistry and biophysics*, 61(3), 531-537.  
<https://doi.org/10.1007/s12013-011-9235-z>
- Levy, Y., Leibowitz, R., Aviram, M., Brook, J., & Cogan, U. (1992). Reduction of plasma cholesterol by lovastatin normalizes erythrocyte membrane fluidity in patients with severe hypercholesterolaemia. *British journal of clinical pharmacology*, 34(5), 427.
- Li, H., & Lykotrafitis, G. (2014). Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network. *Biophysical journal*, 107(3), 642-653.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.031>
- Lijnen, P., Celis, H., Fagard, R., Staessen, J., & Amery, A. (1994). Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and cationic transport system. *Journal of hypertension*, 12(1), 59-64.  
<https://doi.org/10.1097/00004872-199401000-00009>
- Liu, S. C., & Palek, J. (1980). Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. *Nature*, 285(5766), 586-588.  
<https://doi.org/10.1038/285586a0>
- Martínez, M., Vayá, A., Martí, R., Gil, L., Lluch, I., Carmena, R., & Aznar, J. (1996). Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. *Thrombosis research*, 83(5), 375-388.  
[https://doi.org/10.1016/0049-3848\(96\)00147-8](https://doi.org/10.1016/0049-3848(96)00147-8)
- Mason, R. P., Walter, M. F., Day, C. A., & Jacob, R. F. (2006). Active metabolite of atorvastatin inhibits membrane cholesterol domain formation by an antioxidant mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9337-9345.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M513000200>



- McMillan, D. E., Utterback, N. G., & La Puma, J. (1978). Reduced erythrocyte deformability in diabetes. *Diabetes*, 27(9), 895-901.  
<https://doi.org/10.2337/diab.27.9.895>
- Menten, L., & Michaelis, M. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z*, 49, 333-369.
- Meurs, I., Hoekstra, M., van Wanrooij, E. J., Hildebrand, R. B., Kuiper, J., Kuipers, F., . . . Van Eck, M. (2005). HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Experimental hematology*, 33(11), 1309-1319.
- Miller, J. A., Gravalles, E., & Bunn, H. F. (1980). Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. Relevance to diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 65(4), 896.
- Menten, L., & Michaelis, M. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z*, 49, 333-369.
- Meurs, I., Hoekstra, M., van Wanrooij, E. J., Hildebrand, R. B., Kuiper, J., Kuipers, F., . . . Van Eck, M. (2005). HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Experimental hematology*, 33(11), 1309-1319.  
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.07.004>
- Miller, J. A., Gravalles, E., & Bunn, H. F. (1980). Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. Relevance to diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 65(4), 896.  
<https://doi.org/10.1172/JCI109743>
- Mohandas, N., Chasis, J. A., & Shohet, S. B. (1983). The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin Hematol*, 20(3), 225-242.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948. doi:10.1182/blood-2008-07-161166  
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Muller, S., Ziegler, O., Donner, M., Drouin, P., & Stoltz, J. (1990). Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 83(2-3), 231-237.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9150\(90\)90168-I](https://doi.org/10.1016/0021-9150(90)90168-I)
- Murador, P., & Deffune, E. (2007). Structural aspects of the erythrocyte membrane. . *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 29, 168-178.
- Murray, R. K., & Granner, D. K. (2002). Membranas: estrutura, montagem e função. In D. K. Granner, P. A. Mayes, & V. W. Rodwell (Eds.), *Harper's Biochemistry*. São Paulo: Atheneu Editora.
- Naydenov, N., & Ivanov, A. Spectrin-adducin membrane skeleton: A missing link between epithelial junctions and the actin cytoskeleton? *Bioarchitecture* 2011; 1: 186-91; PMID: 22069512; Epub 2011/11/10. doi: 10.4161/bioa.1.4.17642 PMID: 22069512.

<https://doi.org/10.4161/bioa>

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

Nigra, A. D., Monesterolo, N. E., Rivelli, J. F., Amaiden, M. R., Campetelli, A. N., Casale, C. H., & Santander, V. S. (2016). Alterations of hemorheological parameters and tubulin content in erythrocytes from diabetic subjects. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 74, 109-120.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.016>

Nikolić, M., Stanić, D., Baričević, I., Jones, D. R., Nedić, O., & Niketić, V. (2007). Efflux of cholesterol and phospholipids derived from the haemoglobin-lipid adduct in human red blood cells into plasma. *Clinical biochemistry*, 40(5), 305-309.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.11.005>

Parthasarathi, K., & Lipowsky, H. H. (1999). Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(6), H2145-H2157.

Quan, G., Han, Y., Yang, C., Hu, W., Liu, M., Liu, A., . . . Wang, J. (2008). Inhibitory effect of trehalose on phosphatidylserine exposure, osmotic fragility and membrane lipid peroxidation damage of erythrocytes induced by high concentration of glucose. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi/Zhongguo bing li sheng li xue hui= Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology*, 16(6), 1442-1446.

Ramanadham, M., & Kaplay, S. S. (1982). Erythrocyte osmotic fragility in protein-energy malnutrition: Cholesterol, phospholipid, and Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> adenosine triphosphatase. *Biochemical medicine*, 27(2), 226-231.  
[https://doi.org/10.1016/0006-2944\(82\)90025-4](https://doi.org/10.1016/0006-2944(82)90025-4)

Reid, M. E., & Mohandas, N. (2004). Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol*, 41(2), 93-117.  
<https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2004.01.001>

Salmon, C., Cartron, J., & Rouger, P. (1984). The human blood groups part1. The human blood groups part1.

Schick, B. P., & Schick, P. K. (1985a). Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 833(2), 281-290.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90200-0](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90200-0)

Schick, B. P., & Schick, P. K. (1985b). The effect of hypercholesterolemia on guinea pig platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 833(2), 291-302.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90201-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90201-2)

- Shin, S., Ku, Y.-H., Ho, J.-X., Kim, Y.-K., Suh, J.-S., & Singh, M. (2007). Progressive impairment of erythrocyte deformability as indicator of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 36(3), 253-261.
- Simpson, L. (1985). Intrinsic stiffening of red blood cells as the fundamental cause of diabetic nephropathy and microangiopathy: a new hypothesis. *Nephron*, 39(4), 344-351.  
<https://doi.org/10.1159/000183403>
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023), 720-731.  
<https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Sivilotti, M. L. (2004). Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicological reviews*, 23(3), 169-188.  
<https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00004>
- Smith, C. M., Marks, A. D., & Lieberman, M. (2007). *Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica*: Artmed
- Smith, D. K., & Palek, J. (1983). Sulfhydryl reagents induce altered spectrin self-association, skeletal instability, and increased thermal sensitivity of red cells. *Blood*, 62(6), 1190-1196.
- Snyder, L., Fortier, N., Leb, L., McKenney, J., Trainor, J., Sheerin, H., & Mohandas, N. (1988). The role of membrane protein sulfhydryl groups in hydrogen peroxide-mediated membrane damage in human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 937, 229-240.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(88\)90245-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(88)90245-3)
- Storry, J. R. (2000). A review: modification of the red blood cell membrane and its application in blood group serology. *Immunohematology*, 16(3), 101-104.
- Symeonidis, A., Athanassiou, G., Psiroyannis, A., Kyriazopoulou, V., Kapatais-Zoumbos, K., Missirlis, Y., & Zoumbos, N. (2001). Impairment of erythrocyte viscoelasticity is correlated with levels of glycosylated haemoglobin in diabetic patients. *International Journal of Laboratory Hematology*, 23(2), 103-109.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2001.00366.x>
- Tomaiuolo, G. (2014). Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*, 8(5), 051501.  
<https://doi.org/10.1063/1.4895755>
- Traykov, T., & Jain, R. (1987). Effect of glucose and galactose on red blood cell membrane deformability. *International journal of microcirculation, clinical and experimental*, 6(1), 35-44.

- Tsukada, K., Sekizuka, E., Oshio, C., & Minamitani, H. (2001). Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with a transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system. *Microvascular research*, 61(3), 231-239.  
<https://doi.org/10.1006/mvre.2001.2307>
- Umudum, F. Z., Yücel, O., Şahin, Y. N., & Bakan, E. (2002). Erythrocyte membrane glycation and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  levels in NIDDM. *Journal of Diabetes and its Complications*, 16(5), 359-362.  
[https://doi.org/10.1016/S1056-8727\(01\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S1056-8727(01)00223-9)
- Uydu, H. A., Yıldırım, S., Örem, C., Calapoglu, M., Alver, A., Kural, B., & Örem, A. (2012). The effects of atorvastatin therapy on rheological characteristics of erythrocyte membrane, serum lipid profile and oxidative status in patients with dyslipidemia. *J Membr Biol*, 245(11), 697-705.  
<https://doi.org/10.1007/s00232-012-9441-7>
- Uyuklu, M., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2007). Effect of decreased plasma cholesterol by atorvastatin treatment on erythrocyte mechanical properties. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 36(1), 25-33.
- Vague, P., & Juhan, I. (1983). Red cell deformability, platelet aggregation, and insulin action. *Diabetes*, 32(Supplement 2), 88-91.  
<https://doi.org/10.2337/diab.32.2.S88>
- van den Akker, E., Satchwell, T. J., Williamson, R. C., & Toye, A. M. (2010). Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells Mol Dis*, 45(1), 1-8. doi:10.1016/j.bcmd.2010.02.019  
<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.02.019>
- Vaya, A., Martinez Triguero, M., Reganon, E., Vila, V., Martinez Sales, V., Sola, E., & Hernandez Mijares, A. (2008). Erythrocyte membrane composition in patients with primary hypercholesterolemia. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 40(4), 289-294.
- Vessby, J., Basu, S., Mohsen, R., Berne, C., & Vessby, B. (2002). Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *Journal of internal medicine*, 251(1), 69-76.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.00927.x>
- Wang, C.-H., & Popel, A. S. (1993). Effect of red blood cell shape on oxygen transport in capillaries. *Mathematical biosciences*, 116(1), 89-110.  
[https://doi.org/10.1016/0025-5564\(93\)90062-F](https://doi.org/10.1016/0025-5564(93)90062-F)
- Zhao, L. (2001). Effects of free radicals in diabetes. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 77, 222.

Zinchuk, V. (2001). Erythrocyte deformability: physiological aspects. Uspekhi fiziologicheskikh nauk, 32(3), 66-78.

## **Influence of biochemical and hematologic variables on mechanical lysis kinetics of human erythrocytes**

Lucas Moreira Cunha<sup>1</sup>, Wener Barbosa Resende<sup>1</sup>, Alice Vieira da Costa<sup>1</sup>, Ubirajara Coutinho Filho<sup>2</sup>, Marco Aurélio Ferreira de Jesus Leite<sup>1</sup>, Marcelo Costa Júnior<sup>1</sup>, Nilson Penha-Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Chemical Engineering, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

## Resumo

### Influência de variáveis bioquímicas e hematológicas na cinética de lise mecânica de eritrócitos humanos

O transporte de gases pelo eritrócito depende da sua capacidade de sofrer alterações de membrana durante a ação de forças externas, como ocorre durante sua passagem através de capilares de pequeno diâmetro. A capacidade do eritrócito em resistir a essas tensões é uma propriedade chamada estabilidade mecânica. Este estudo propõe um método, baseado no formalismo cinético de Michaelis-Menten, para determinar a estabilidade mecânica dos eritrócitos a partir da cinética da hemólise mecânica. Para isso, construímos um dispositivo constituído por um rotor de intensidade controlada e acoplado a uma hélice, capaz de transmitir forças de choque rotacional por contato com a solução teste e a agitação mecânica das moléculas de solução. Os testes foram realizados com uma velocidade fixa de 8.000 rpm. As curvas obtidas nestes testes foram ajustadas por uma curva hiperbólica não linear, a fim de determinar o tempo de meia-vida dos eritrócitos ( $t_{1/2}$ ) e a absorvância máxima ( $A_{\max}$ ) associada à hemólise completa. Para examinar se essas constantes, que apresentaram boa variabilidade inter-individual, têm significados fisiológicos, elas foram correlacionadas com as variáveis bioquímicas e hematológicas associadas à composição e ao comportamento de eritrócitos. Os valores de  $A_{\max}$  mostraram correlações positivas com RBC, Hb, Ht, MCV, MCH e MCHC. Os valores de  $t_{1/2}$  mostraram correlações positivas significativas com colesterol total (t-C) e triglicérides (TGC), uma correlação positiva limítrofe com os níveis de LDL-C e uma correlação significativa negativa com RDW.

**Palavras-chave:** cinética, lise mecânica, eritrócitos

## **Abstract**

### **Influence of biochemical and hematologic variables on mechanical lysis kinetics of human erythrocytes**

The transport of gases by the erythrocyte depends on its ability to undergo membrane changes before the action of external forces, as occurs during the passage through capillaries smaller than its diameter. The ability of the erythrocyte to resist to these tensions is a property called mechanical stability. This study proposes a method, based on kinetic formalism of Michaelis-Menten, for determining the erythrocyte mechanical stability from the kinetics of mechanical hemolysis. For this, we have built a device consisting of a controlled intensity rotor coupled to a propeller capable of transmitting rotational shock forces by contact with the test solution and the mechanical agitation of the solution molecules. The tests were performed with a fixed speed of 8,000 rpm. The curves obtained in these tests were adjusted by a non-linear hyperbolic curve, in order to determine the erythrocytes half-life time ( $t_{1/2}$ ) and the maximum absorbance ( $A_{\max}$ ) associated to complete hemolysis. To examine whether these constants, which showed good inter-subject variability, have physiological meanings, they were correlated with biochemical and hematologic variables that are associated with the composition and behavior of erythrocytes. The  $A_{\max}$  values showed positive correlations with RBC, Hb, Ht, MCV, MCH and MCHC. The  $t_{1/2}$  values showed significant positive correlations with total cholesterol (t-C) and triglycerides (TGC), a borderline positive correlation with the LDL-C levels, and a negative significant correlation with RDW.

**Keywords:** kinetics, mechanical lysis, erythrocytes



## Introduction

Erythrocytes are important agents of the metabolic homeostasis, since they transport oxygen and carbon dioxide through the bloodstream (Mohandas & Gallagher, 2008). Along their 120 days of life, the erythrocytes must pass through narrow capillaries, where they are subjected to mechanical stresses that can lead them to lysis (Picas, Rico, Deforet, & Scheuring, 2013). Therefore, its stability, which is the ability to maintain structural integrity, depends largely on their deformability, which is the ability to change reversibly before the action of external forces (Meiselman, 2009).

In erythrocytes, stability and deformability are properties that depend on a wide range of factors, such as the composition of the membrane and the complex interactions between membrane proteins and cytoskeleton (Discher, 2000; Popescu, Park, Dasari, Badizadegan, & Feld, 2007; Sun et al., 2007), the magnitude of the surface the cell relative to the volume, cell morphology, hemoglobin concentration and intracellular viscosity, among others (Reinhart, Piety, Goede, & Shevkoplyas, 2015; Stoltz, Singh, & Riha, 1999; Toth et al., 2014; Zhan, Loufakis, Bao, & Lu, 2012).

Several studies have shown changes in the deformability of erythrocytes in various pathological conditions, such as hypertension (Garnier et al., 1990), diabetes (Buys et al., 2013; Cahn et al., 2015), malaria (Hosseini & Feng, 2012; Tomaiuolo, 2014; Wu & Feng, 2013), myocardial infarction (Tomaiuolo, 2014; Vaya et al., 2015), sickle cell anemia (Hierso et al., 2014) and many other situations (Bazanovas et al., 2015; Da Costa, Galimand, Fenneteau, & Mohandas, 2013; Hardeman & Ince, 1999; Tomaiuolo, 2014).

The erythrocyte membrane stability has also been the subject of studies in many different conditions, such as aging (Penha-Silva et al., 2007), multiple sclerosis (de Freitas et al., 2010), dyslipidemia (Bernardino-Neto et al., 2013), malaria (Netto et al., 2014) and bariatric surgery (de Arvelos et al., 2013). But there is still a lot to study on the relations between the stability of erythrocytes and the intra- and extracellular physicochemical properties in physiological and pathological conditions.

The stability of red cell membrane can be studied before a gradient of salt concentration (osmotic stability), the hemolytic concentration of solutes (chemical stability) and mechanical stress (mechanical stability).

Although the osmotic stability is the most widely studied type of stability, extreme hypotonicity conditions that determine the osmotic lysis are not physiologically possible *in vivo*. But the mechanical stability of erythrocytes represents their behavior before mechanical forces to which they are quite vulnerable *in vivo*.

One way to study the biological complexes is the kinetic analysis, observing their changes over time before certain conditions. In biological complex, the most widely defined and studied kinetics is the enzymatic kinetics. The kinetic study of enzymatic reactions is commonly based on the equation of Michaelis-Menten, which represents the hyperbolic dependence of initial reaction rate with increasing substrate concentration (Menten & Michaelis, 1913).

The classical Michaelis-Menten kinetic formalism has been applied in various types of kinetic studies, such as the own osmotic lysis kinetics of erythrocytes, which proved to be a useful tool for use in kinetic studies of many biological processes (Cunha et al., 2014; Zhan et al., 2012). This study aims to evaluate the kinetics of mechanical lysis of human erythrocytes, by applying the kinetic formalism of Michaelis-Menten, and testing the validity of the obtained kinetic variables by correlation analysis with hematologic and biochemical variables that are associated with the behavior of red blood cells.

## **Material and Methods**

### *Blood Samples*

The blood samples used in this study consisted of discarded material coming from the internal routines of the Clinical Analyzes Laboratory of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

The blood samples belonged to patients over 18 years old that randomly covering a wide age range, without being restricted to a specific population, in order to represent the diversity found in different individuals, and observe its possible application in different biological and physiological occasions.

The laboratory routine usually collects the blood after an overnight fasting period from 8 to 12 hours, by intravenous puncture, directly into evacuated tubes containing 0.1 g/dL K<sub>3</sub>EDTA as an anticoagulant (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brazil).

### *Reagents*

The NaCl used was obtained from Labsynth (Diadema, SP, Brazil) with a purity of 99.5%, which was duly corrected for preparation of their solutions.

### *Equipments*

Volume measurements were performed using automatic pipettes (Labsystems, Finnpiquette Digital model, Helsinki, Finland). Mass measurements were made in a digital precision balance (AND, model 870, Japan).

The temperature control of the incubations was conducted in a thermostatically controlled bath (Marconi, MA 184 model, Piracicaba, SP, Brazil). Centrifugations were performed in a Hitachi Koki centrifuge (model CF15RXII, Hitachinaka, Japan) and the absorbance readings in a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, Model UV1650TC, Japan) with the use of the UV probe 2.21 software.

The mechanical tension on the erythrocytes was obtained in a 30 ml closed-cell by the action of a propeller attached to a rotor with a rotation intensity control ([Figure 2.1](#)).

### *Kinetic method to evaluate the mechanical lysis of erythrocytes*

The test-solutions were prepared by mixing 1 mL of whole blood with 200 mL of 0.9 g/dL NaCl solution. In all tests, always performed in duplicate, 15 mL of that mixture were subjected to different speeds (1,000, 2,500, 5,000, 7,500 and 10,000 rpm) in 12 different time intervals between 0 and 6 minutes. At the end of each time interval, 1 mL of the mixture was removed and added to minitube (Eppendorf™) and submitted to centrifugation for 10 minutes at 1,600 x g and 25 °C. Supernatants from these centrifugations were carefully removed with automatic pipette and subjected to reading of absorbance at 540 nm ( $A_{540}$ ). Hyperbolic curves of hemolysis were constructed by plotting the  $A_{540}$  values (A) as a function of the time intervals (t), according to equation

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

where  $A_{\max}$ , which is the maximum absorbance value reached at the curve plateau, represents the total lysis of the erythrocytes, and  $t_{1/2}$  is the time required for occurrence of half of the total hemolysis ( $A_{\max}/2$ ).

As the speed allowing a better definition of hemolysis kinetics was between 7,500 and 10,000, the speed of 8,000 rpm was selected for use in the subsequent tests, which were conducted under the same conditions mentioned above.

#### *Statistical analyzes, calculations and data editing*

The analyses of the erythrocytes lysis kinetics were performed using the applicative GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA), using an integrated kinetic model that has the same equation as the non-integrated model of Michaelis-Menten, with pre-selection of the automatic removal of possible outlier points. The other statistical analyzes (normality test and Spearman rank correlations) were made using the Origin 9.0 software (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, USA).

## **Results**

Initial tests for the study of the kinetics of mechanical lysis of erythrocytes were performed at different speeds (1,000, 2,500, 5,000, 7,500 and 10,000 rpm) in the apparatus shown in [Figure 2.1](#), at intervals of 0.5 minutes and final time 6 minutes. The obtained results were shown in [Figure 2.2](#). As the hemolysis curves at 7500 and 10,000 rpm were those that showed a better definition in that time interval, all subsequent assays were carried out at 8,000 rpm.

The study of the mechanical hemolysis for each patient by a hyperbolic fit allowed the determination of the values of  $A_{max}$ , which is the maximum absorbance value reached on the plateau of the curve and that represents the total erythrocytes lysis, and  $t_{1/2}$ , which is the interval time required to have half of total hemolysis ( $A_{max}/2$ ). The results that were obtained for the kinetic variables  $A_{max}$  and  $t_{1/2}$  demonstrated a good degree of variation between individuals, which suggests that the test has the sensitivity required to detect the variety of erythrocyte membranes behaviors that are present in different individuals ([Figure 2.3](#)).

The values of  $t_{1/2}$  and  $A_{max}$ , as well as the values of the hematological and biochemical variables, obtained for the study population ([Tabela 2.1](#)), were not normally distributed, according the statistical test of Shapiro-Wilk.

The existence of bivariate correlation between the kinetic variables  $t_{1/2}$  and  $A_{max}$  and each of the hematological and biochemical variables was investigated by the Spearman correlation test (**Tabela 2.2**). The  $t_{1/2}$  presented significant positive correlations with total cholesterol (t-C), triglycerides (TGC) and VLDL-C and a borderline correlation with the LDL-C levels. In turn, the  $A_{max}$  values showed significant positive correlations with the values of RBC, Hb, Ht, MCV, MCH and MCHC. The test also demonstrated that both  $t_{1/2}$  and  $A_{max}$  showed significant negative correlations with the RDW values.

## Discussion

As previously mentioned, an important feature of erythrocytes is their ability to undergo large reversible deformation when subjected to external forces without undergoing lysis. The purpose of this study was to evaluate the kinetics of erythrocyte lysis due to the action of direct forces, given by the collision with the propeller, and indirect, determined by shock during agitation. The application of mechanical stress to the red cells was achieved with the construction of the apparatus shown in **Figure 2.1**.

The results presented in this study were obtained from the standardization of methodological conditions compatible with the device developed. For this, various preliminary tests were performed, with modifications and adaptations, not only to standardize the method, but also to make it a practical and feasible tool to be used in other studies.

Speeds of 1000, 2500 and 5000 rpm were not sufficient to allow the lysis curves reach the maximum plateau ( $A_{max}$ ) over a sufficiently short time interval to make the method sufficiently practical to be used (**Figure 2.2**). But speeds of 7500 and 10000 rpm showed to be sufficient to allow the lysis curves to reach the maximum plateau ( $A_{max}$ ) during the interval of six minutes used in the tests. Therefore, the intermediary speed of 8000 rpm was chosen to be used in the analysis of erythrocyte lysis kinetics.

The erythrocyte lysis curves at 8000 rpm exhibited sufficiently different profiles between different individuals, with variation in values of  $t_{1/2}$  and  $A_{max}$ , which demonstrates that the test has the sensitivity required to allow their application in the analysis of different physiological and pathological conditions (**Figure 2.3**).

In order to demonstrate that the variables obtained from the kinetic of mechanical lysis of erythrocytes have a physiological significance, they were correlated with biochemical and hematological variables which are somehow related to the behavior of erythrocytes (Table 2).

The  $A_{\max}$  values, which represent the maximum hemolysis, showed positive correlations with RBC, Hb, Ht, MCV, MCH and MCHC (Table 2.2). Indeed, one would expect that the existence of higher values of  $A_{\max}$ , reflecting higher hemoglobin levels, is associated with higher values of Hb, RBC, Ht, MCV, MCH and MCHC, specifically.

The values of  $t_{1/2}$  showed significant positive correlations with total cholesterol (t-C), triglycerides (TGC) and VLDL-C and a borderline correlation with LDL-C levels.

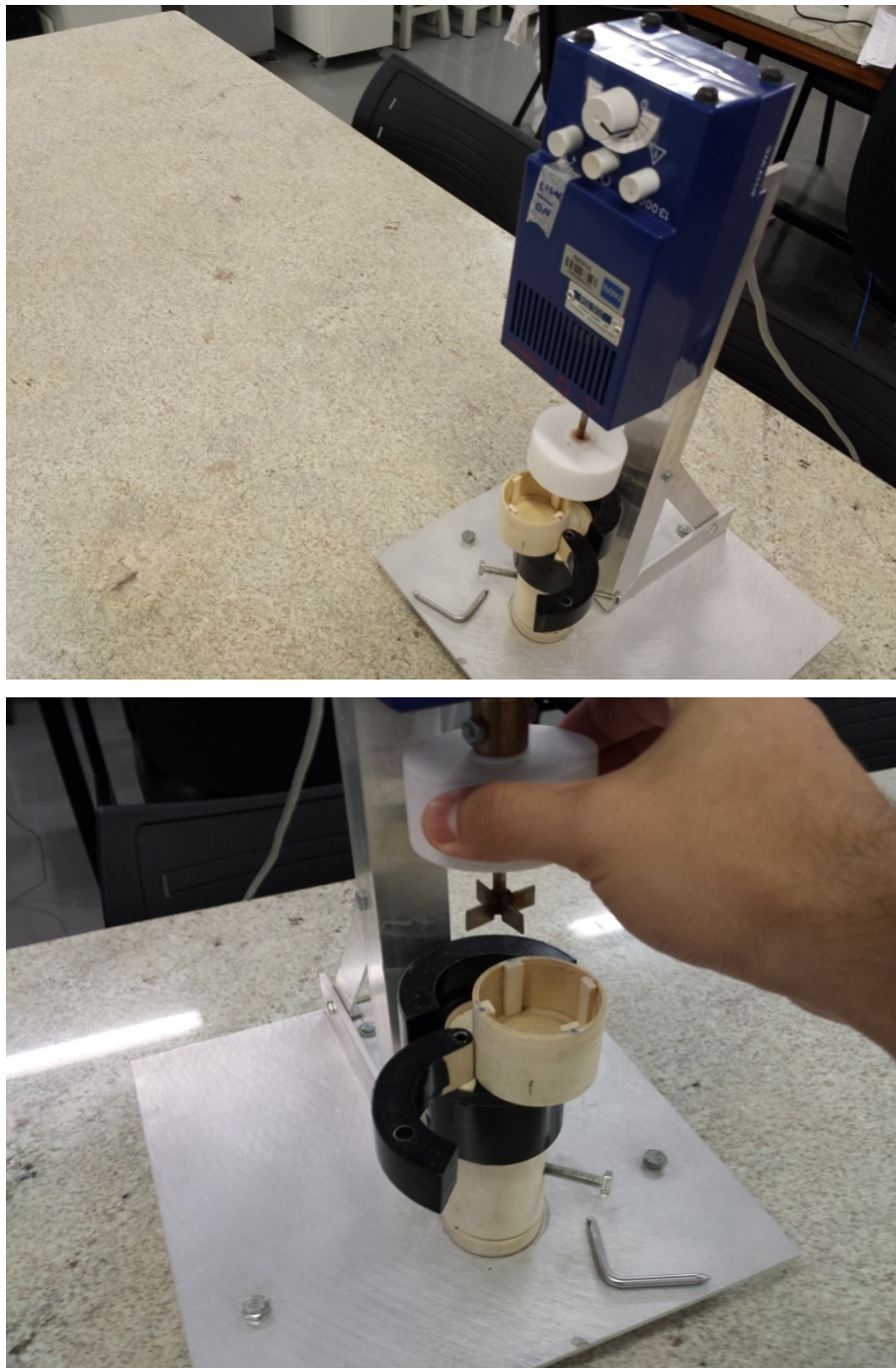
Blood lipid variables can be considered one of the main factors that can act as modulators of the dynamic behavior of cell membranes (Cooper, 1977), biological complexes formed by the association of lipid molecules with structural proteins that form the cytoskeleton and determine the deformability and stability of the cell (Chasis & Mohandas, 1986).

In erythrocytes, the cholesterol content in the membrane is a key factor in determining the degree of fluidity and deformation ability of this membrane (Sun et al, 2007). Erythrocytes are very sensitive to increase in the cholesterol concentration in the extracellular medium (Cooper, Arner, Wiley, & Shattil, 1975; Schick & Schick, 1985a, 1985b), which causes an increase in membrane cholesterol content (Michalska-Malecka, Slowinska, Dorecka, & Romaniuk, 2008; Spengler, Bertoluzzo, Catalani, & Rasia, 2008; Vayá, Martinez, R., & J., 1993). That is why the influence of plasma lipids in the blood rheology has been the subject of many studies (Henkelman et al., 2010; Hernandez et al., 2015; Maeda, Cicha, Tateishi, & Suzuki, 2006).

The kinetic variable  $t_{1/2}$  showed a significant negative correlation with RDW, indicating that an increase in RDW increases the vulnerability of the red blood cells to mechanical lysis. An increase in RDW, which is a variable that measures the heterogeneity of volume of red blood cells (RBC) (Montagnana, Cervellin, Meschi, & Lippi, 2012), has been strongly linked to an increased risk of death in vascular diseases (Zhang, Xu, Ni, & Deng, 2013), due to a decrease in the deformability of red blood cells (Vaya et al., 2015). Certainly, this decrease in deformability make red blood cells faster targets of a mechanical lysis, which makes perfect sense in light of the negative correlation observed here between RDW and  $t_{1/2}$ .

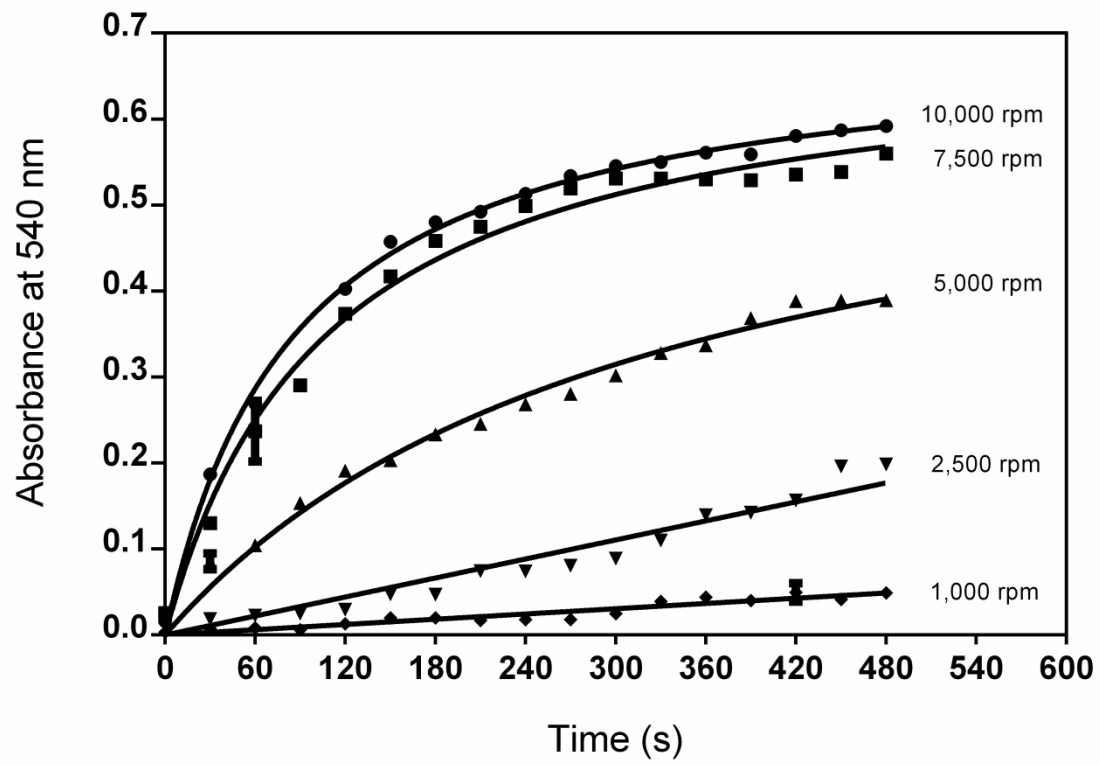
## **Conclusion**

Future research with a larger number of volunteers in different physiological and/or pathological conditions, using the method proposed here, could offer a much broader knowledge of the association of deformability of red blood cells with the hematologic and biochemical variables used in routine clinical practice.

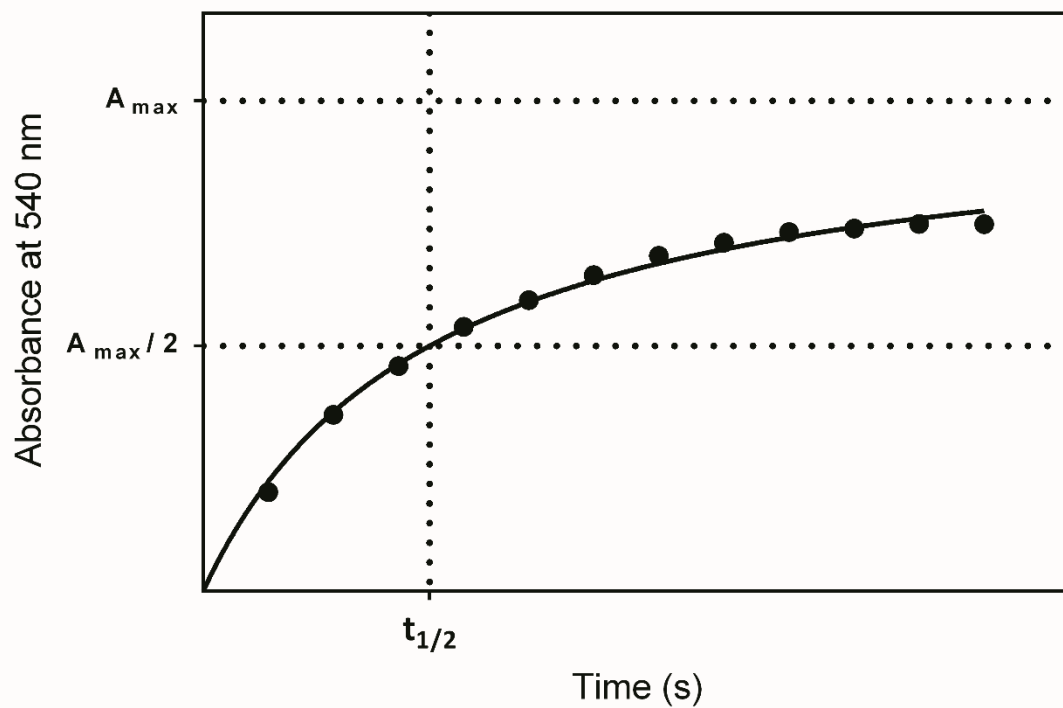


**Figure 2.1.** Apparatus developed for evaluation of the mechanical lysis kinetics of red blood cells.





**Figure 2.2** Kinetics of mechanical lysis of human erythrocytes under different rotation tensions



**Figure 2.3** Typical curve of the kinetics of mechanical lysis of erythrocytes, illustrating the meaning of the kinetic parameters  $t_{1/2}$  and  $A_{max}$

**Table 2.1** Descriptive statistics of experimental data obtained for the study population (n=20)

Parameters	Median (IQR)	Minimum	Maximum	<i>P</i>
$t_{1/2}$ (s)	79.79 (43.28)	38.83	140.60	0.8151
$A_{\max}$ (au)	0.71 (0.20)	0.51	0.89	0.0961
RBC ( $\times 10^6$ /mL)	4.71 (0.70)	3.69	6.15	0.8916
Hb (g/dL)	12.50 (3.25)	9.8	16.80	0.2382
Ht (%)	39.95 (10.50)	32.8	51.30	0.0891
MCV (fL)	84.90 (12.17)	70.9	103.60	0.4938
MCH (pg)	26.25 (4.12)	21	33.40	0.8155
MCHC (g/dL)	32.15 (2.30)	28.7	34.30	0.4185
RDW (%)	13.50 (2.0)	11	24	<0.0001*
t-C (mg/dL)	198.0 (63.0)	87	291	0.7204
TGC (mg/dL)	125.50 (86.25)	56	403	0.0084*
HDL-C (mg/dL)	52.10 (15.57)	36.8	79.3	0.4770
VLDL-C (mg/dL)	25.10 (17.25)	11.2	80.5	0.0085*
LDL-C (mg/dL)	111.10 (43.65)	29.1	205.8	0.9824

\* At the 0.05 level, the data were significantly associated with a non-normal distribution (Shapiro-Wilk test)

**Table 2.2** Matrix of Spearman correlations (r) and significance (p) between pairs of variables

		t <sub>1/2</sub>	A <sub>max</sub>	RBC	Hb	Ht	MCV	MCH	RDW	MCHC	t-C	TGC	HDL-C	VLDL-C	LDL-C
t <sub>1/2</sub>	r														
	p														
A <sub>max</sub>	r	0.6195*													
	p	0.0035													
RBC	r	0.3031	0.5987*												
	p	0.1939	0.0052												
Hb	r	0.3860 <sup>§</sup>	0.9134*	0.6386*											
	p	0.0927	<0.001	0.0024											
Ht	r	0.2573	0.8540*	0.7760*	0.9220*										
	p	0.2733	<0.001	<0.001	<0.001										
MCV	r	0.0736	0.4782*	-0.1842	0.5086*	0.4078 <sup>§</sup>									
	p	0.7575	0.0329	0.4367	0.0220	0.0742									
MCH	r	0.1016	0.5128*	-0.1951	0.5855*	0.3775 <sup>§</sup>	0.9134*								
	p	0.6697	0.0207	0.4097	0.0066	0.1007	<0.001								
MCHC	r	0.4019 <sup>§</sup>	0.5022*	0.0022	0.5264*	0.2181	0.2549	0.5721*							
	p	0.0789	0.0240	0.9924	0.0171	0.3555	0.2781	0.0083							
RDW	r	-0.4533*	-0.6540*	-0.2861	-0.7004*	-0.5039*	-0.2802	-0.4820*	-0.7858*						
	p	0.0446	0.0017	0.2213	<0.001	0.0234	0.2313	0.0313	<0.001						
t-C	r	0.4736*	0.40301 <sup>§</sup>	0.2572	0.3265	0.2851	-0.0165	0.0587	0.3393	-0.4035 <sup>§</sup>					
	p	0.0348	0.07809	0.2735	0.1599	0.2229	0.9448	0.8057	0.1432	0.0776					
TGC	r	0.4708*	0.16472	0.1324	-0.0015	-0.0150	-0.2271	-0.1401	0.0735	-0.0574	0.5881*				
	p	0.0361	0.48768	0.5778	0.9949	0.9497	0.3354	0.5557	0.7579	0.8098	0.0063				
HDL-C	r	0.0632 <sup>§</sup>	0.11827	0.2223	0.0686	0.1805	-0.0760	-0.1109	-0.0049	0.0191	0.4956*	-0.0489			
	p	0.7909	0.61947	0.3461	0.7738	0.4462	0.7498	0.6415	0.9836	0.9360	0.0262	0.8375			
VLDL-C	r	0.4708*	0.16472	0.1324	-0.0015	-0.0150	-0.2271	-0.1401	0.0735	-0.0574	0.5881*	1*	-0.0489		
	p	0.0361	0.48768	0.5778	0.9949	0.9497	0.3354	0.5557	0.7579	0.8098	0.0063	--	0.8375		
LDL-C	r	0.43459 <sup>§</sup>	0.36391	0.2271	0.2912	0.2550	-0.0601	0.0150	0.3604	-0.4349 <sup>§</sup>	0.9398*	0.4400 <sup>§</sup>	0.4753*	0.4400 <sup>§</sup>	1*
	p	0.05552	0.11472	0.3354	0.2129	0.2777	0.8011	0.9497	0.1184	0.0552	<0.001	0.0522	0.0341	0.0522	--

\* Statistically significant correlations (p&lt;0.05)

<sup>§</sup> Borderline correlations (0.05<p<0.10)

## References

- Bazanovas, A. N., Evstifeev, A. I., Khaiboullina, S. F., Sadreev, I., Skorinkin, A. I., & Kotov, N. V. (2015). Erythrocyte: A systems model of the control of aggregation and deformability. *Biosystems*, 131, 1-8. doi: 10.1016/j.biosystems.2015.03.003  
<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2015.03.003>
- Buys, A. V., Van Rooy, M. J., Soma, P., Van Papendorp, D., Lipinski, B., & Pretorius, E. (2013). Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovasc Diabetol*, 12, 25. doi: 10.1186/1475-2840-12-25  
<https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-25>
- Cahn, A., Livshits, L., Srulovich, A., Raz, I., Yedgar, S., & Barshtein, G. (2015). Diabetic foot disease is associated with reduced erythrocyte deformability. *Int Wound J*. doi: 10.1111/iwj.12466  
<https://doi.org/10.1111/iwj.12466>
- Chasis, J. A., & Mohandas, N. (1986). Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. *J Cell Biol*, 103(2), 343-350.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.103.2.343>
- Cooper, R. A. (1977). Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med*, 297(7), 371-377. doi: 10.1056/NEJM197708182970707  
<https://doi.org/10.1056/NEJM197708182970707>
- Cooper, R. A., Arner, E. C., Wiley, J. S., & Shattil, S. J. (1975). Modification of Red-Cell Membrane Structure by Cholesterol-Rich Lipid Dispersions - Model for Primary Spur Cell Defect. *Journal of Clinical Investigation*, 55(1), 115-126. doi: Doi 10.1172/Jci107901  
<https://doi.org/10.1172/JCI107901>
- Cunha, L. M., Bernardino-Neto, M., Garrote, M. D., Avelar, C. B., de Freitas, M. V., Netto, R. D. M., . . . Penha-Silva, N. (2014). Kinetics of hypotonic lysis of human erythrocytes. *Analytical Methods*, 6(5), 1377-1383. doi: 10.1039/c3ay41404c  
<https://doi.org/10.1039/c3ay41404c>

Da Costa, L., Galimand, J., Fenneteau, O., & Mohandas, N. (2013). Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev*, 27(4), 167-178. doi: 10.1016/j.blre.2013.04.003

<https://doi.org/10.1016/j.blre.2013.04.003>

de Arvelos, L. R., Rocha, V. C. A., Felix, G. P., da Cunha, C. C., Neto, M. B., Filho, M. D. G., . . . Penha-Silva, N. (2013). 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. *Journal of Membrane Biology*, 246(3), 231-242. doi: 10.1007/s00232-013-9524-0

<https://doi.org/10.1007/s00232-013-9524-0>

de Freitas, M. V., de Oliveira, M. R., dos Santos, D. F., Mascarenhas, R. D., Fenelon, S. B., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the Use of Statin on the Stability of Erythrocyte Membranes in Multiple Sclerosis. *Journal of Membrane Biology*, 233(1-3), 127-134. doi: 10.1007/s00232-010-9232-y

<https://doi.org/10.1007/s00232-010-9232-y>

Discher, D. E. (2000). New insights into erythrocyte membrane organization and microelasticity. *Curr Opin Hematol*, 7(2), 117-122.

<https://doi.org/10.1097/00062752-200003000-00008>

Domínguez, C., Ruiz, E., Gussinye, M., & Carrascosa, A. (1998). Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes care*, 21(10), 1736-1742.

<https://doi.org/10.2337/diacare.21.10.1736>

Garnier, M., Attali, J. R., Valensi, P., Delatour-Hanss, E., Gaudey, F., & Koutsouris, D. (1990). Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. *Metabolism*, 39(8), 794-798.

[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(90\)90121-R](https://doi.org/10.1016/0026-0495(90)90121-R)

Hardeman, M. R., & Ince, C. (1999). Clinical potential of in vitro measured red cell deformability, a myth? *Clin Hemorheol Microcirc*, 21(3-4), 277-284.

- Henkelman, S., Dijkstra-Tiekstra, M. J., de Wildt-Eggen, J., Graaff, R., Rakhorst, G., & van Oeveren, W. (2010). Is red blood cell rheology preserved during routine blood bank storage? *Transfusion*, 50(4), 941-948. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02521.x  
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02521.x>
- Hernandez, G., Bollini, A., Mengarelli, G., Rasia, M., Casco, C., Ruiz, M. F., . . . Bazzoni, G. (2015). Protective effect of quercetin against in vitro erythrocyte rheology alterations produced by arsenic. *Clin Hemorheol Microcirc*, 59(4), 355-364. doi: 10.3233/Ch-141849  
<https://doi.org/10.3233/CH-141849>
- Hierso, R., Waltz, X., Mora, P., Romana, M., Lemonne, N., Connes, P., & Hardy-Dessources, M. D. (2014). Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. *Br J Haematol*, 166(4), 601-606. doi: 10.1111/bjh.12912  
<https://doi.org/10.1111/bjh.12912>
- Hosseini, S. M., & Feng, J. J. (2012). How malaria parasites reduce the deformability of infected red blood cells. *Biophys J*, 103(1), 1-10. doi: 10.1016/j.bpj.2012.05.026  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.05.026>
- Maeda, N., Cicha, I., Tateishi, N., & Suzuki, Y. (2006). Triglyceride in plasma: prospective effects on microcirculatory functions. *Clin Hemorheol Microcirc*, 34(1-2), 341-346.
- Meiselman, H. J. (2009). Red blood cell aggregation: 45 years being curious. *Biorheology*, 46(1), 1-19. doi: 10.3233/BIR-2009-0522
- Michalska-Malecka, K., Slowinska, L., Dorecka, M., & Romaniuk, W. (2008). Correlations in some pathogenetic factors and values of hemorheological parameters in age-related macular degeneration. *Clin Hemorheol Microcirc*, 38(3), 209-216.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166  
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>

- Montagnana, M., Cervellin, G., Meschi, T., & Lippi, G. (2012). The role of red blood cell distribution width in cardiovascular and thrombotic disorders. *Clin Chem Lab Med*, 50(4), 635-641. doi: 10.1515/cclm.2011.831  
<https://doi.org/10.1515/cclm.2011.831>
- Bernardino Neto, M., Arantes, T. S., Jordão, I. A., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M. T., de Souza Penha, V. A., ... & Penha-Silva, N. (2013). Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*, 50(5-6), 305-320.
- Netto, R. D. M., Fabbri, C., de Freitas, M. V., Netto, M. B., Garrote, M. S., Lacerda, M. V. G., . . . Penha-Silva, N. (2014). Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitology Research*, 113(3), 863-874. doi: 10.1007/s00436-013-3717-4  
<https://doi.org/10.1007/s00436-013-3717-4>
- Penha-Silva, N., Firmino, C. B., Reis, F. G. D., Huss, J. C. D., de Souza, T. M. T., de Freitas, M. V., & Netto, R. D. M. (2007). Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(7-8), 444-449. doi: 10.1016/j.mad.2007.06.007  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.06.007>
- Picas, L., Rico, F., Deforet, M., & Scheuring, S. (2013). Structural and mechanical heterogeneity of the erythrocyte membrane reveals hallmarks of membrane stability. *Acs Nano*, 7(2), 1054-1063. doi: 10.1021/nn303824j  
<https://doi.org/10.1021/nn303824j>
- Popescu, G., Park, Y., Dasari, R. R., Badizadegan, K., & Feld, M. S. (2007). Coherence properties of red blood cell membrane motions. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 76(3 Pt 1), 031902.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.76.031902>
- Reinhart, W. H., Piety, N. Z., Goede, J. S., & Shevkoplyas, S. S. (2015). Effect of osmolality on erythrocyte rheology and perfusion of an artificial microvascular network. *Microvascular Research*, 98, 102-107. doi: 10.1016/j.mvr.2015.01.010



<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.01.010>

Schick, B. P., & Schick, P. K. (1985a). Cholesterol Exchange in Platelets, Erythrocytes and Megakaryocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 833(2), 281-290. doi: Doi 10.1016/0005-2760(85)90200-0

[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90200-0](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90200-0)

Schick, B. P., & Schick, P. K. (1985b). The Effect of Hypercholesterolemia on Guinea-Pig Platelets, Erythrocytes and Megakaryocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 833(2), 291-302. doi: Doi 10.1016/0005-2760(85)90201-2

[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90201-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90201-2)

Spengler, M. I., Bertoluzzo, S. M., Catalani, G., & Rasia, M. L. (2008). Study on membrane fluidity and erythrocyte aggregation in equine, bovine and human species. *Clin Hemorheol Microcirc*, 38(3), 171-176.

Stoltz, J. F., Singh, M., & Riha, P. (1999). *Hemorheology in practice* (Vol. 30), IOS Press, Amsterdam, Netherlands.

Sun, M., Northup, N., Marga, F., Huber, T., Byfield, F. J., Levitan, I., & Forgacs, G. (2007). The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J Cell Sci*, 120(Pt 13), 2223-2231. doi: 10.1242/jcs.001370

<https://doi.org/10.1242/jcs.001370>

Tomaiuolo, G. (2014). Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*, 8(5), 051501. doi: 10.1063/1.4895755

<https://doi.org/10.1063/1.4895755>

Toth, C., Kiss, F., Klarik, Z., Gergely, E., Toth, E., Peto, K., . . . Nemeth, N. (2014). Following-up changes in red blood cell deformability and membrane stability in the presence of PTFE graft implanted into the femoral artery in a canine model. *Korea-Australia Rheology Journal*, 26(2), 209-215. doi: 10.1007/s13367-014-0023-3

<https://doi.org/10.1007/s13367-014-0023-3>

- Vayá, A., Martinez, M., R., C., & J., A. (1993). The lipid composition of red blood cells and their hemorheological behavior in patients with primary hyperlipoproteinemia. *Clinical Hemorheology*, 13, 447-457.
- Vaya, A., Rivera, L., de la Espriella, R., Sanchez, F., Suescun, M., Hernandez, J. L., & Facila, L. (2015). Red blood cell distribution width and erythrocyte deformability in patients with acute myocardial infarction. *Clin Hemorheol Microcirc*, 59(2), 107-114. doi: 10.3233/CH-131751
- Wu, T., & Feng, J. J. (2013). Simulation of malaria-infected red blood cells in microfluidic channels: Passage and blockage. *Biomicrofluidics*, 7(4), 44115. doi: 10.1063/1.4817959  
<https://doi.org/10.1063/1.4817959>
- Zhan, Y., Loufakis, D. N., Bao, N., & Lu, C. (2012). Characterizing osmotic lysis kinetics under microfluidic hydrodynamic focusing for erythrocyte fragility studies. *Lab Chip*, 12(23), 5063-5068. doi: 10.1039/c2lc40522a  
<https://doi.org/10.1039/c2lc40522a>
- Zhang, Z., Xu, X., Ni, H., & Deng, H. (2013). Red cell distribution width is associated with hospital mortality in unselected critically ill patients. *J Thorac Dis*, 5(6), 730-736. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.11.14

## **Correlações entre variáveis cinéticas de lise mecânica de eritrócitos e variáveis bioquímicas, hematológicas e oxidativas no *diabetes mellitus* tipo 1**

Lucas Moreira Cunha<sup>1</sup>, Ricardo Rodrigues<sup>1</sup>, Lara Ferreira Paraiso<sup>1</sup>, Wener Barbosa Resende<sup>1</sup>, Alice Vieira da Costa<sup>1</sup>, Ubirajara Coutinho Filho<sup>2</sup>, Nilson Penha-Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Chemical Engineering, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

## Resumo

### Correlações entre variáveis cinéticas de lise mecânica de eritrócitos e variáveis bioquímicas, hematológicas e oxidativas no *diabetes mellitus* tipo 1

[**Introdução**] O comportamento reológico do sangue é frequentemente alterado no *diabetes mellitus* (DM), com aumento acentuado na viscosidade do plasma e do sangue total e redução na deformabilidade de eritrócitos, gerando resistência ao fluxo sanguíneo, o que contribui para o desenvolvimento das complicações microvasculares e das sequelas características dessa doença, tais como insuficiências retiniana e renal e isquemia de membros inferiores. Por isso, conhecer o amplo conjunto de fatores que pode influenciar a reologia do sangue é extremamente importante para auxiliar no diagnóstico, tratamento e prevenção das complicações dessas doenças. A maioria dos estudos disponíveis na literatura sobre a relação entre DM e reologia do sangue lida com DM2, e por isso este estudo utilizou uma população de indivíduos com DM1. [**Objetivo**] Como excessos de glicose, colesterol, triglicérides e radicais livres, em decorrência de deficiência de insulina, podem afetar constituintes da membrana de eritrócitos, o presente estudo teve como objetivo testar a validade do uso da cinética de lise mecânica dessas células para avaliar a influência daqueles fatores. [**Métodos**] A lise mecânica de eritrócitos foi promovida em um equipamento constituído por um rotor acoplado a uma hélice com velocidade controlada e inserida em uma célula onde era colocada a suspensão de sangue a ser analisada. A cinética de lise mecânica dos eritrócitos foi representada por uma hipérbole retangular construída para a relação entre a variação na absorvância (**A**) da hemoglobina liberada na lise e o tempo, com a determinação de **A<sub>max</sub>**, que é a absorvância média atingida no platô da curva e que representa a lise da população total da amostra de eritrócitos, e **t<sub>1/2</sub>**, que é o intervalo de tempo capaz de promover metade da hemólise total. [**Resultados**] Houve correlações negativas significantes entre valores de **t<sub>1/2</sub>** e níveis de hemoglobina glicada e de glicemia estimada média (**eAG**), e limítrofe entre **t<sub>1/2</sub>** e média de glicemia do sistema de monitoramento contínuo ou capilar de glicose (**CGM\_mean/AMGC**). Por sua vez, **A<sub>max</sub>** apresentou correlação negativa significativa com os níveis de colesterol total e limítrofe com **LDL-colesterol**, além de correlações positivas significantes com **gênero**, **hemoglobina**, **hematócrito**, **ferro** e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (**TBARS**), e correlação

limítrofe com **RBC**. **[Conclusão]** As variáveis obtidas na análise da cinética de lise de eritrócitos de indivíduos com *diabetes mellitus* do tipo 1 apresentaram potencial de detecção das alterações na glicemia, lipidemia e status oxidativo descritas nesta doença, e poderão ser utilizadas no estudo do impacto de alterações nas propriedades reológicas de eritrócitos no comprometimento do estado de saúde desta população.

**Palavras-chave:** eritrócitos, cinética, lise mecânica, estresse oxidativo, *diabetes mellitus* tipo

1

## Abstract

### Correlations between kinetic variables of mechanical lysis of erythrocytes and biochemical, hematologic and oxidative variables in type 1 *diabetes mellitus*

**[Introduction]** The rheological behavior of blood is frequently altered in *diabetes mellitus* (DM), with a marked increase in plasma and total blood viscosity and a reduction in the erythrocyte deformability, generating resistance to blood flow, which contributes to the development of complications and of the characteristic sequelae of this disease, such as retinal and renal insufficiencies and lower limb ischemia. Therefore, knowing the wide range of factors that can influence blood rheology is extremely important to aid in the diagnosis, treatment and prevention of complications of these diseases. Most of the studies available in the literature on the relationship between DM and blood rheology deals with type 2 DM, and so this study used a population of individuals with type 1 DM. **[Objective]** As the excess of glucose, cholesterol, triglycerides and free radicals, due to insulin deficiency, can affect erythrocyte membrane constituents, the present study aimed to test the validity of the use of mechanical lysis kinetics of these cells to evaluate the influence of those factors. **[Methods]** Mechanical lysis of erythrocytes was promoted in an equipment consisting of a rotor coupled to a propeller with controlled speed and inserted into a cell where the blood suspension to be analyzed was placed. The mechanical lysis kinetics of erythrocytes was represented by a rectangular hyperbola constructed for the relation between the variation in the absorbance (**A**) of the hemoglobin released in the cell lysis and the time, with the determination of **A<sub>max</sub>**, which is the mean absorbance in the plateau of the curve and which represents the lysis of the total population of the erythrocyte sample, and **t<sub>1/2</sub>**, which is the time interval capable of promoting half of the total hemolysis. **[Results]** There were significant negative correlations between the values of **t<sub>1/2</sub>** and the glycated hemoglobin and estimated average glucose (**eAG**) levels, and a borderline negative correlation between the values of **t<sub>1/2</sub>** and the mean glucose values of the continuous or capillary glucose monitoring (**CGM\_mean/AMGC**) system. In turn, **A<sub>max</sub>** showed a negative significant correlation with the levels of total cholesterol and a negative borderline correlation with LDL-cholesterol, as well as significant positive correlations with gender, hemoglobin, hematocrit, iron and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and a positive borderline correlation with

**RBC. [Conclusion]** The results obtained in the analysis of the lysis kinetics of erythrocytes of individuals with type 1 DM presented a potential for detecting alterations in glycaemia, lipidemia and oxidative status described in this disease, and could be used to evaluate the impact of changes in rheological properties of erythrocytes in compromising the health status of this population.

**Keywords:** erythrocytes, kinetics, mechanical lysis, oxidative stress, type 1 *diabetes mellitus*

## Introdução

O eritrócito é uma célula que é constantemente submetida a condições adversas durante sua circulação pelo organismo, principalmente durante sua passagem pelos pequenos capilares e poros estreitos do sistema reticuloendotelial, especialmente no baço (Smith, Marks, & Lieberman, 2007). Para isso, os eritrócitos devem ser capazes de sofrer extensa deformação passiva, resistindo assim à fragmentação (Guo et al., 2014; Smith, Marks, & Lieberman, 2007).

O *diabetes mellitus*, assim como outras doenças, pode alterar as propriedades mecânicas dos eritrócitos e determinar uma maior resistência ao fluxo sanguíneo (Chien, 1987). No diabetes, a deformabilidade de eritrócitos se mostra reduzida quando comparada com indivíduos não diabéticos (Ernst & Matrai, 1986; Kunt et al., 1999; McMillan, Utterback, & La Puma, 1978). Essa redução na deformabilidade de eritrócitos está associada a alterações hemoreológicas que podem desencadear complicações microvasculares (Simpson, 1985; Tsukada, Sekizuka, Oshio, & Minamitani, 2001) e ineficiência no transporte de oxigênio para os tecidos (Le Devehat, Khodabandehlou, & Vimeux, 2001; Parthasarathi & Lipowsky, 1999; Tsukada et al., 2001).

Os parâmetros hemoreológicos frequentemente prejudicados nos indivíduos diabéticos (Barnes, Locke, Dormandy, & Dormandy, 1977; Cho, Mooney, & Cho, 2008; Dintenfass, 1977; Schmid-Schönbein & Volger, 1976; Skovborg, Nielsen, Schlichtkrull, & Ditzel, 1966; Ziegler et al., 1994) podem determinar a progressão de outras complicações secundárias, como insuficiência retiniana e renal (Cho et al., 2008), e agravo de isquemia de membros inferiores, podendo levar a amputação (Cho et al., 2008; Dévéhat, Vimeux, Bondoux, & Khodabandehlou, 1991).

As alterações na deformabilidade e estabilidade de eritrócitos foram associadas a elevações na glicemia (Zinchuk, 2001) e promoção de glicação de proteínas de membrana responsáveis pela estrutura, forma e estabilidade destas células (Kung, Tseng, & Wang, 2009).

Mas a estabilidade (Cooper, Arner, Wiley, & Shattil, 1975; Schick & Schick, 1985) e a deformabilidade de eritrócitos (Bryszewska, Watala, & Torzecka, 1986; Cooper, Durocher, & Leslie, 1977; Dwight, Ribeiro, & Hendry, 1996; Kohno et al., 1997; Muller, Ziegler, Donner, Drouin, & Stoltz, 1990) dependem também da composição lipídica de sua membrana. Nos



eritrócitos, o teor de colesterol de membrana está relacionado com as alterações do perfil lipídico do soro em determinadas condições fisiológicas (Calişkan, Calişkan, Kuralay, & Önvural, 2000; Dwight et al., 1996; Uydu et al., 2012; Uyklu, Meiselman, & Baskurt, 2007), em resposta à ocorrência de troca de colesterol entre a membrana do eritrócito e as lipoproteínas plasmáticas (Mason, Walter, Day, & Jacob, 2006; Uydu et al., 2012).

Tanto no DM1 como no DM2, um mau controle glicêmico pode estar associado a dislipidemia (Feingold & Grunfeld, 2015) e, assim, promover alterações no teor de lipídios de membrana (Miller, Gravalles, & Bunn, 1980; Nigra et al., 2016), alterando propriedades reológicas dos eritrócitos, como a deformabilidade (Bryszewska et al., 1986; Kohno et al., 1997), em decorrência de diminuição na fluidez de membrana (Nigra et al., 2016; Symeonidis et al., 2001), o que também afeta a própria longevidade destas células (Nigra et al., 2016; Umudum, Yücel, Şahin, & Bakan, 2002).

O excesso de glicose, triglicérides, ácidos graxos livres (FFA) e outros metabólitos, em decorrência da deficiência e/ou resistência à insulina (Kuroki, Isshiki, & King, 2003) pode também levar a aumento na produção de agentes oxidantes (Evans, Goldfine, Maddux, & Grodsky, 2003; Giugliano, Ceriello, & Paolisso, 1996; Itani, Ruderman, Schmieder, & Boden, 2002). Além disso, a depleção de sistemas de defesa antioxidante é outro processo que pode determinar aumento na geração de radicais livres em pacientes diabéticos (Zhao, 2001).

Nas membranas, o estresse oxidativo pode desencadear distúrbios funcionais e estruturais irreversíveis. A membrana do eritrócito, particularmente, é mais largamente suscetível a esses danos, em decorrência de sua constante exposição à tensão de oxigênio e pelo seu alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (Kolanjiappan, Manoharan, & Kayalvizhi, 2002).

O ataque oxidativo aos lipídios de membrana determina o processo conhecido como lipoperoxidação, capaz de promover alterações prejudiciais sobre a integridade e funcionalidade da membrana do eritrócito (Kuypers, 1998).

O presente estudo analisa o potencial da cinética de lise mecânica de eritrócitos em refletir as alterações na glicemia, lipidemia e status oxidativo presentes no *diabetes mellitus* tipo 1, no intuito de entender melhor as influência dessas alterações nas propriedades reológicas dessas células, o que é muito relevante, uma vez que o comprometimento destas propriedades tem grande impacto no estado de saúde de indivíduos diabéticos. Além disso,

o estudo dessas relações em população de diabéticos do tipo 1 é muito pertinente, uma vez que a maioria dos estudos reportados na literatura sobre o tema lida com populações de diabéticos do tipo 2.

## Material e Métodos

### *Critérios de seleção*

O estudo foi aprovado e autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo número 294.635/2013).

Uma análise transversal foi realizada com pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 atendidos nos ambulatórios do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) e no Centro Municipal de Atenção ao Diabético (CMAD). As coletas foram executadas durante um período consecutivo de dois anos.

Os critérios de exclusão foram: diagnóstico impreciso da doença, sinais de complicações crônicas graves (como quadro de insuficiência renal crônica), quadro febril recente, alterações cutâneas que impossibilitassem o uso do sensor ou realização de glicemias capilares, discrasias sanguíneas, e utilização de medicamentos como corticoides, heparina, anticoagulantes orais e suplementos de vitamina E. Os pacientes que não realizaram a quantidade mínima de avaliações de glicemia capilar necessária para a avaliação da variabilidade glicêmica também foram excluídos da pesquisa.

### *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 no preparo de suas soluções.

### *Coleta de amostras de sangue*

As amostras de sangue foram coletadas após jejum de 8 a 12 horas no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia, MG, Brasil, por punção intravenosa, diretamente em tubos evacuados contendo K<sub>3</sub>EDTA a 1 g/dL como anticoagulante (Vacutainer™, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil) e conservadas em refrigerador a temperaturas entre 0 e 4 °C até a hora de realização dos ensaios.

### *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 (Shimadzu™, model AW220, Kyoto, Japan). O controle de temperatura das incubações foi realizado em banho termostatzado (Marconi, modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil). A centrifugação foi feita em centrífuga com controle de temperatura (Hitachi Koki™, modelo CF15RXII, Hitachinaka, Japão) e as leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu™, modelo UV1650TC, Japão) com utilização do programa UV Probe 2.21.

A lise mecânica de eritrócitos foi promovida em equipamento desenvolvido pelo próprio grupo de trabalho, constituído por um rotor acoplado a uma hélice com velocidade controlada que opera em uma célula com 30 mL de capacidade, onde é colocada a suspensão de sangue a ser analisada após ser hermeticamente fechada (**Figura 3.1**).

#### *Avaliação da variabilidade glicêmica e da glicemia média*

A glicemia média foi determinada durante período de 24 horas, através de sensor, fixado no tecido subcutâneo com monitorização contínua da glicose intersticial (Guardian™ Real-Time, Medtronic, Northridge, CA, EUA), que permite o cálculo da média do monitoramento contínuo de glicose (**CGM\_mean**). A glicemia média também foi estimada através da automonitorização da glicemia média capilar (**AMGC**) com registro em software de gerenciamento (Accu-Chek 360, Roche, Indianapolis, IN, EUA). Os valores obtidos de **CGM\_mean** e **AMGC** foram utilizados para o cálculo do desvio padrão total dos valores de glicemia (**SD-GV**) e coeficiente de variabilidade (**CV**), calculado pela razão entre o **SD-GV** e **CGM\_mean** e **AMGC** no intuito de estimar a variabilidade glicêmica.

A utilização destas tecnologias, **CGM\_mean** (Hill et al., 2011; Rodbard, 2009) e **AMGC** são comuns em pesquisas científicas e na prática clínica para aferição da glicemia média e da variação glicêmica (Baghurst, Rodbard, & Cameron, 2010; Bragd et al., 2008; Monnier et al., 2017; Rodbard, 2009).

#### *Status oxidativo do plasma*

A atividade antioxidante e a quantificação de substâncias oxidantes foram realizadas a partir da dosagem no plasma da atividade da glutathiona redutase (GR) e das substâncias oxidantes reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), com a utilização de kits específicos (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, EUA).

### *Dosagens bioquímicas e hematológicas*

O hemograma completo foi realizado com a utilização de sistema automatizado (Sysmex K4500, Sysmex Corporation, Mundelein, IL, EUA).

As dosagens de colesterol total (t-C), HDL-colesterol (HDL-C), LDL-colesterol (LDL-C), VLDL-colesterol (VLDL-C) e triglicérides (TGC) foram feitas em analisador automático (Hitachi 917, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA).

A fração da hemoglobina glicada HbA1c foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japan), com faixa de referência de normalidade entre 4,5 e 5,2%. Os valores obtidos de hemoglobina glicada foram convertidos em glicemia estimada média (eAG), dada em mg/dL.

### *Cinética de lise mecânica de eritrócitos*

Inicialmente foram realizados diversos testes para estabelecimento de condições e rotinas mais adequadas para padronização do ensaio para estudo da cinética de lise mecânica de eritrócitos.

Os testes foram realizados utilizando 15 mL de uma suspensão preparada pela adição de 1 mL da amostra de sangue a ser analisada em 200 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9 g/dL. Após homogeneização, a suspensão de sangue foi submetida a estresse mecânico por agitação a 8.000 rpm durante seis minutos, com interrupção a cada 0,5 min para transferência de alíquotas duplicadas de 1 mL para minitubos de ensaio (Eppendorf™, Hamburg, Alemanha). A alíquota retirada antes do início da agitação mecânica foi utilizada como controle. Ao final dos seis minutos, as alíquotas retiradas foram centrifugadas a 1.600 x g e 25 °C de temperatura durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram, então, cuidadosamente removidos com pipeta automática e submetidos a leitura de absorvância a 540 nm.

### *Análise da cinética de lise mecânica dos eritrócitos*

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

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

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

#### *Análises estatísticas, cálculos e edição de resultados*

As análises da cinética de lise de eritrócitos foram feitas com a utilização do aplicativo GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), a partir do modelo cinético integrado (que tem a mesma equação que o modelo de Michaelis-Menten na forma não integrada), com a utilização, pré-selecionada, de rotina para remoção automática de possíveis pontos 'outlier'. A existência de normalidade na distribuição de dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Como não houve normalidade na distribuição de dados de algumas das variáveis analisadas, a existência de correlações significantes entre as variáveis foi analisada pelo teste de Spearman. O teste de normalidade e a análise de correlações de Spearman foram feitos com a utilização do programa Origin 9.0 (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, EUA). A existência de significância estatística em todas as análises foi aceita quando o valor de  $p$  foi menor que 0,05.

### **Resultados**

A utilização do protocolo experimental desenvolvido no presente estudo revelou uma possível aplicação do teste para avaliação do comportamento de membrana de eritrócitos. A lise mecânica dos eritrócitos de cada paciente foi representada matematicamente por uma hipérbole retangular que permitiu a determinação dos valores de dois parâmetros importantes para caracterização do processo, a  $A_{\max}$ , que é a absorvância máxima atingida no platô da curva e que representa a lise da população total da amostra de eritrócitos analisada, e  $t_{1/2}$ , que é o intervalo de tempo capaz de promover metade da hemólise total ( $A_{\max}/2$ ).

Os pontos experimentais da cinética de hemólise mecânica obtidos para cada indivíduo se ajustaram muito bem à curva de regressão hiperbólica retangular utilizada para analisar os resultados experimentais. Além disso, as curvas apresentadas por diferentes

indivíduos, bem como os parâmetros  $A_{\max}$  e  $t_{1/2}$ , apresentaram boa variabilidade entre diferentes indivíduos, o que representa uma importante prerrogativa para sua utilização no sentido de entender a influência dos diferentes fatores responsáveis pelas diferenças individuais do comportamento de membrana de eritrócitos (**Figura 3.2**).

A **Tabela 3.1** apresenta as características de base da população estudada. Como não houve normalidade na distribuição de dados de algumas das variáveis analisadas, elas foram caracterizadas pela média  $\pm$  desvio-padrão e também pela mediana e valores máximo e mínimo de cada variável.

Os coeficientes de correlação de Spearman entre todos os pares de variáveis analisadas foram apresentados na **Tabela 3.2**. Houve correlações negativas significantes de  $t_{1/2}$  com **HbA1c** e com **eAG** (glicemia estimada média) e limítrofe com **CGM\_mean/AMCG** (média de glicose obtida por monitoramento contínuo de glicose ou automonitoramento capilar, respectivamente). Por sua vez,  $A_{\max}$  apresentou correlação negativa significativa com **t-C** e correlação limítrofe com **LDL-C**, bem como correlações positivas significantes com **gênero**, **Hb**, **Ht**, **ferro** e **TBARS** e limítrofe com **RBC**. Não foram encontradas correlações significantes entre a variabilidade glicêmica e parâmetros de lise mecânica.

## Discussão

O formalismo matemático clássico utilizado na análise da cinética de catálise enzimática por Michaelis e Menten (Menten & Michaelis, 1913) mostrou-se também apropriado para análise da cinética de lise mecânica de eritrócitos humanos. Os parâmetros  $A_{\max}$  e  $t_{1/2}$ , obtidos neste tipo de análise, podem fornecer informações relevantes para avaliar o comportamento de membranas de eritrócitos sujeitos a estresse mecânico, por meio de análise de correlação daquelas variáveis com outros parâmetros, como as variáveis bioquímicas, hematológicas e oxidativas, determinadas no presente estudo para uma população de indivíduos com diabetes do tipo 1.

Os parâmetros  $A_{\max}$  e  $t_{1/2}$  apresentaram correlações significativas que corroboram resultados encontrados em outros estudos e permitem sustentar a eficiência e aplicabilidade do método aqui utilizado. Embora outras correlações significativas também tenham sido encontradas, a ênfase aqui será dada nas correlações apresentadas pelas

variáveis cinéticas  $A_{\max}$  e  $t_{1/2}$ , que constituíram o alvo principal da investigação apresentada neste estudo.

As correlações negativas significantes encontradas entre os valores de  $t_{1/2}$  e os níveis de **HbA1c** e de **eAG**, e limítrofe entre  $t_{1/2}$  e **CGM\_mean/AMCG**, mostram que os eritrócitos da população de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 aqui estudada apresentaram menor resistência à lise induzida por estresse mecânico quanto maiores eram os níveis de hemoglobina glicada e da média glicêmica obtida por monitoramento contínuo da glicose ou pelo automonitoramento capilar. Estes resultados encontrados corroboram outros achados descritos na literatura, em que o nível elevado de hemoglobina glicada e glicose do meio foram associadas a aumento na fragilidade osmótica (Kung et al., 2009; Lemos, Márquez-Bernardes, Arvelos, Paraíso, & Penha-Silva, 2011) e diminuição na deformabilidade de eritrócitos (Shin et al., 2007; Shin, Ku, Suh, & Singh, 2008).

A base molecular para essas anormalidades não é bem conhecida, possivelmente deve estar associada à glicação e oxidação de proteínas (Bailey, Robins, & Tanner, 1976; King & Brownlee, 1996; Kunt et al., 1999). A glicação de proteínas como a espectrina e sua consequente oxidação pode resultar em alterações na viscoelasticidade de eritrócitos de indivíduos diabéticos (Buys et al., 2013; Schwartz, Madsen, Rybicki, & Nagel, 1991; Shin et al., 2007). Redução na deformabilidade de eritrócitos leva a alterações prejudiciais na reologia dessas células, desencadeando complicações microvasculares (Simpson, 1985; Tsukada et al., 2001) e prejuízos no transporte de oxigênio para os tecidos (Dévéhat et al., 1991; Parthasarathi & Lipowsky, 1999; Tsukada et al., 2001). Outro resultado que corrobora para esta hipótese

Os valores de  $A_{\max}$ , que representam a absorvância máxima na cinética de hemólise, apresentaram correlações significativas positivas previsíveis com algumas variáveis, como **Ht**, **Ferro**, **Hb**, e limítrofe com o **RBC**, as quais estão relacionadas com a quantidade de eritrócitos e o teor de hemoglobina.

As correlações negativas observadas entre  $A_{\max}$  e **t-C** (significante) e entre  $A_{\max}$  e **LDL-C** (limítrofe) devem refletir a influência dos níveis de colesterol total e LDL-C sobre a manutenção da população sanguínea de eritrócitos. De fato, a composição das membranas de eritrócitos pode ser influenciada pelos níveis de lipídeos plasmáticos (Bhandaru, Srinivasan, Radhakrisnamurthy, & Berenson, 1982; Richard A Cooper et al., 1977; Cunha et al., 2014; Hui & Harmony, 1979), isto porque estas células são capazes de interagir com as



lipoproteínas plasmáticas, ganhando e perdendo colesterol, como ocorre através da interação com o LDL-C e HDL-C, respectivamente (da Silva Garrote-Filho, Bernardino-Neto, & Penha-Silva, 2017; Quarfordt & Hilderman, 1970). Estas trocas lipídicas são importantes na determinação da fluidez e estabilidade da membrana destas células (da Silva Garrote-Filho et al., 2017).

Os níveis séricos de lipídeos podem afetar as propriedades viscoelásticas de eritrócitos (Ejima et al., 2000; Martínez et al., 1996; Yoshida et al., 1992). Em indivíduos diabéticos do tipo 1, foi encontrada redução na deformabilidade de eritrócitos, estimada pela diminuição na taxa de filtração dessas células, associada a aumento nos níveis sanguíneos de triglicérides e de colesterol (Garnier et al., 1990). Em nosso estudo, é possível que as relações negativas de  $A_{max}$  com **t-C** e **LDL-C** sejam decorrentes da existência de redução na estabilidade *in vivo* de eritrócitos associada a aumento na concentração de colesterol, uma vez que menores valores de  $A_{max}$  devem significar a existência de menor quantidade de hemoglobina e menores contagens de eritrócitos. De fato, na população estudada os valores de  $A_{max}$  aumentaram com os níveis de **Fe<sup>++</sup>**, **Hb**, **Ht** e **RBC**, o que é bastante óbvio.

É importante destacar que a estabilidade de membrana de eritrócitos não apresenta uma dependência linear continua com o teor de colesterol de membrana e, consequentemente, com os níveis de **t-C** e **LDL-C** (da Silva Garrote-Filho et al., 2017). O teor de colesterol na membrana de eritrócitos varia de acordo com os níveis de colesterol na **LDL**, devido à difusão de colesterol livre da lipoproteína para a membrana dessas células, em um processo que constitui um importante mecanismo de controle da fluidez de membrana (Cooper, 1977; Cooper et al., 1975; Cooper et al., 1977; Cooper, Leslie, Fischkoff, Shinitzky, & Shattil, 1978; Meurs et al., 2005). Na extensão em que esta inclusão de colesterol contribua para a membrana atingir sua fluidez crítica, este processo leva à estabilização destas células e certamente a aumento no seu tempo de permanência no sangue, com consequente aumento na população das células vermelhas do sangue. É por isso que alguns estudos reportam diminuição na fragilidade osmótica de eritrócitos com aumento na concentração plasmática daquele esteróide (Sasaki, 1976). Mas uma inclusão excessiva de colesterol na membrana além do teor necessário para determinar a fluidez crítica leva a sua rigidificação, com elevação na variabilidade de volume (RDW) das células (Tziakas et al., 2012) e perda na deformabilidade e na estabilidade (M V De Freitas et al.,

2010; Martínez et al., 1996; Oyabu, Tsumoto, & Kageyama, 1982; Yoshida et al., 1992). De fato, no presente trabalho o teor de LDL-C apresentou correlação positiva significativa ( $r = 0.3582$ ) com os valores de RDW (dados não mostrados). Além disso, a estabilidade de eritrócitos estava diminuída em uma população de mulheres com esclerose múltipla que apresentava altos níveis de colesterol, mas aumentou após tratamento com estatinas (De Freitas et al., 2010). É também por isso que populações cujos níveis de colesterol são excessivamente altos tendem a apresentar anemia hemolítica (Akahane, Furuhashi, & Onodera, 1986) ou anemia 'spur-cell' (R. A. Cooper, Leslie, Knight, & Detweiler, 1980), o que mostra que os níveis de colesterol estão também associados à contagem de células vermelhas no sangue.

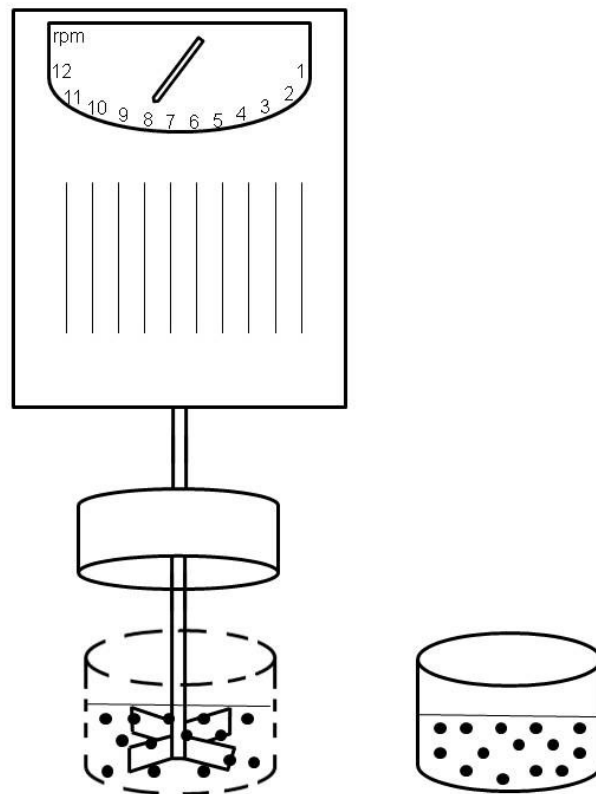
No diabetes, o estado de estresse oxidativo pode ser ocasionado por aumento na produção de substâncias oxidantes ou pela depleção de sistemas fisiológicos de defesa antioxidante, resultando em aumento na quantidade de radicais livres (Zhao, 2001). Em indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 1, aumento na quantidade de produtos de lipoperoxidação, como o malondialdeído (MDA), foi evidenciado durante estágios precoces da doença, com potencial de se manter elevada em seus estágios mais avançados (Dominguez et al, 1998). No nosso estudo, a correlação positiva observada entre  $A_{max}$  e **TBARS** deve refletir a relação existente entre os níveis de ferro nos eritrócitos e a formação de radicais livres pela reação de Fenton. A existência de associação entre níveis de ferro e quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico deve ser forte, especialmente diante de existência de incapacidade de atenuar os efeitos dos radicais livres formados com a utilização das defesas antioxidantes. Isto sugere que a relação observada entre  $A_{max}$  e **TBARS** deva de alguma forma refletir o aumento na produção de espécies oxidantes, como malondialdeído (Rizvi, Zaid, Anis, & Mishra, 2005), e/ou declínio na capacidade antioxidante (Vessby, Basu, Mohsen, Berne, & Vessby, 2002), reportados em pacientes com diabetes. Embora os valores de  $t_{1/2}$  não tenham apresentado correlação significativa com os valores de TBARS, é possível que a diminuição no tempo de meia-vida de eritrócitos associada a aumento nos níveis de HbA1c esteja associada a manifestação de um estado de estresse oxidativo, resultante de produção de radicais livres não compensada pelas defesas antioxidantes, com exacerbação da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é capaz de promover alterações prejudiciais sobre a integridade e funcionalidade da membrana de eritrócitos (Kuypers, 1998), afetando significativamente a permeabilidade da membrana, a

microviscosidade, a deformabilidade, a hemólise e a longevidade dos eritrócitos (Arslan, Metin Çomu, Küçük, Öztürk, & Yaylak, 2012; Sivilotti, 2004).

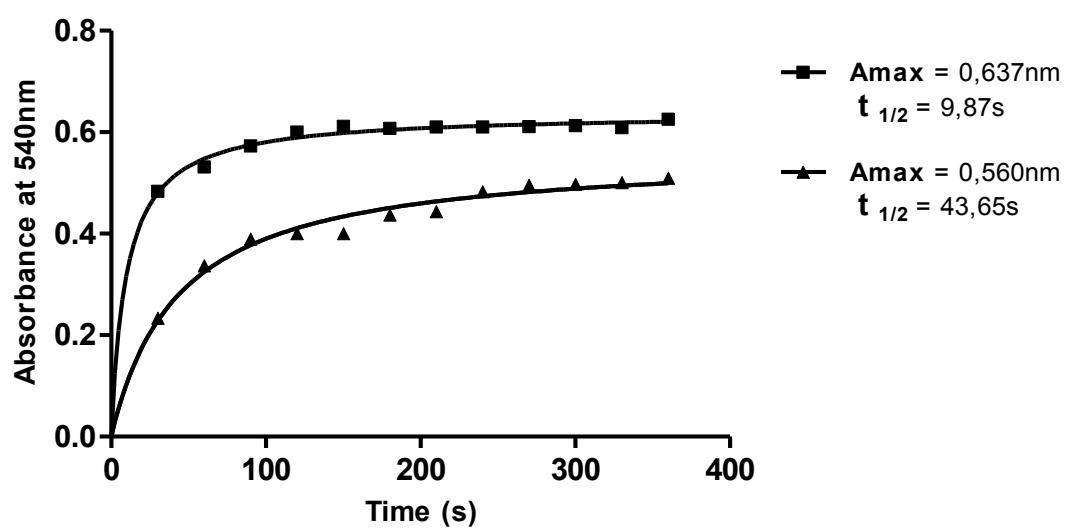
## CONCLUSÃO

Em suma, os resultados desse trabalho confirmam a validade da análise da cinética de lise de eritrócitos na detecção de fatores sanguíneos que determinam o comportamento dessas células.

As variáveis obtidas na análise da cinética de lise de eritrócitos de indivíduos com *diabetes mellitus* do tipo 1 apresentaram potencial de detecção das alterações na glicemia, lipidemia e status oxidativo descritas nesta doença, e poderão ser utilizadas para estudar a influência de alterações nas propriedades reológicas de eritrócitos no comprometimento do estado de saúde desta população.



**Figura 3.1** Representação esquemática do aparelho desenvolvido para análise da cinética da lise de eritrócitos por estresse mecânico



**Figura 3.2** Cinética de lise mecânica de suspensão de eritrócitos de dois participantes do estudo em solução de NaCl a 0,9 g/dL. Houve grande variação nos valores de  $A_{\max}$  e  $t_{1/2}$  entre os dois voluntários.

**Tabela 3.1** Características de base da população estudada

Characteristics	N	Mean	±	SD	Median	Minimum	Maximum
t <sub>1/2</sub> (s)	33	103.59	±	130.18	79.03	5.6	789
A <sub>max</sub> (au)	33	0.77	±	0.24	0.75	0.56	2.09
Age (years)	33	26.60	±	9.93	23	14	55
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	33	23.08	±	4.11	23	18	36.3
DM duration (years)	33	11.9	±	7.32	11	3	30
Hb (g/dL)	33	14.48	±	1.74	14.7	9.2	17.4
Ht (%)	33	41.74	±	6.87	43.9	19	50.5
RBC (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	33	4.99	±	0.48	5.05	4.11	5.8
MCV (fL)	33	83.45	±	11.81	84.83	35.05	96.97
RDW (%)	33	13.2	±	1.28	13	11.5	19.2
MCH (pg)	33	29.91	±	6.25	29.73	4.5	33.25
MCHC (g /dL)	32	33.98	±	1.59	33.88	29.28	36.77
Reticulocytes (%)	32	1.41	±	0.73	1.25	0.5	2.8
Glicemia (mg/dL)	33	171.39	±	94.57	141	46	383
HbA1c_current (%)	33	8.73	±	1.44	8.4	6.24	12.25
eAG (mg/dL)	33	203.6	±	41.46	194	132	304
CGM_mean (mg/dL)	33	193.57	±	58.95	189	116	371
SD_GV (mg/dL)	33	93.6	±	27.4	90	54.9	153
TG (mg/dL)	33	106.94	±	72.68	83.5	38	308
VLDL (mg/dL)	33	20	±	13.67	16.7	3.8	61.6
LDL-C (mg/dL)	33	95.96	±	28.30	97	44.7	167
HDL-C (mg/dL)	33	52.57	±	16.42	49	25	94
t-C (mg/dL)	33	170.96	±	37.95	167	95.1	282
UA (mg/dL)	33	3.95	±	0.98	3.9	2.3	6.2
MicroALB (g/dL)	33	14.66	±	37.01	4.8	0.6	205.9
Creatinina (mg/dL)	33	0.90	±	0.21	0.87	0.61	1.75
TSH (mU/L)	33	3.99	±	3.64	2.62	0.74	16
Iron (µg/dL)	31	83.13	±	24.3	80	35	140
CV (%)	31	50.36	±	13.46	47.4	28.39	90
GR (µM/L)	25	175.58	±	162.34	143.26	10.18	598.52
TBARS (nmol/L)	25	2.46	±	1.17	2.28	0.94	6.53

**Table 3.2** Coeficientes de correlação de Spearman entre variáveis de lise mecânica de eritrócitos e algumas variáveis sanguíneas

Parameter	(n=33)	$t_{1/2}$	$A_{max}$
HbA1c_current (%)	R	-0.3585*	-0.3242
eAG (mg/dL)	R	-0.3478*	-0.3224
CGM_mean/AGMC (mg/dL)	R	-0.3417 <sup>§</sup>	-0.2396
t-C (mg/dL)	R	-0.1086	-0.3674*
LDL-C (mg/dL)	R	-0.1624	-0.3344 <sup>§</sup>
Gender	R	-0.2833	0.3831*
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	R	-0.0158	0.3267 <sup>§</sup>
Hb (g/dL)	R	-0.1058	0.3461*
Ht (%)	R	0.0444	0.3757*
Iron ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )	R	-0.1610	0.5864*
TBARS (nmol/L)	R	0.3831	0.3701*

\* Correlações estatisticamente significantes ( $p < 0.05$ )

<sup>§</sup> Correlações limítrofes ( $0.05 < p < 0.1$ )

## Referências

- Akahane, K., Furuhashi, K., & Onodera, T. (1986). Simultaneous occurrence of hypercholesterolemia and hemolytic anemia in rats fed cholesterol diet. *Life Sci*, 39(6), 499-505.  
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(86\)90505-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(86)90505-9)
- Arslan, M., Metin Çomu, F., Küçük, A., Öztürk, L., & Yaylak, F. (2012). Dexmedetomidine protects against lipid peroxidation and erythrocyte deformability alterations in experimental hepatic ischemia reperfusion injury. *Libyan Journal of Medicine*, 7(1), 18185.  
<https://doi.org/10.3402/ljm.v7i0.18185>
- Baghurst, P. A., Rodbard, D., & Cameron, F. J. (2010). The minimum frequency of glucose measurements from which glycemic variation can be consistently assessed. *Journal of diabetes science and technology*, 4(6), 1382-1385.  
<https://doi.org/10.1177/193229681000400612>
- Bailey, A., Robins, S., & Tanner, M. (1976). Reducible components in the proteins of human erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 434(1), 51-57.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2795\(76\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(76)90034-9)
- Barnes, A., Locke, P., Dormandy, T., & Dormandy, J. (1977). *Blood viscosity and metabolic control in diabetes mellitus*: Portland Press Limited.
- Bhandaru, R., Srinivasan, S. R., Radhakrishnamurthy, B., & Berenson, G. S. (1982). Effects of diabetes and high fat-high cholesterol diet on plasma lipid levels and on erythrocyte membrane composition. *Atherosclerosis*, 42(2-3), 263-272.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9150\(82\)90156-3](https://doi.org/10.1016/0021-9150(82)90156-3)
- Bragd, J., Adamson, U., Bäcklund, L. B., Lins, P. E., Moberg, E., & Oskarsson, P. (2008). Can glycaemic variability, as calculated from blood glucose self-monitoring, predict the development of complications in type 1 diabetes over a decade? *Diabetes Metab*, 34(6 Pt 1), 612-616.  
doi:10.1016/j.diabet.2008.04.005  
<https://doi.org/10.1016/j.diabet.2008.04.005>
- Bryszewska, M., Watala, C., & Torzecka, W. (1986). Changes in fluidity and composition of erythrocyte membranes and in composition of plasma lipids in type I diabetes. *British journal of haematology*, 62(1), 111-116.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1986.tb02906.x>
- Buys, A. V., Van Rooy, M.-J., Soma, P., Van Papendorp, D., Lipinski, B., & Pretorius, E. (2013). Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovascular diabetology*, 12(1), 25.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-25>
- Calışkan, S., Calışkan, M., Kuralay, F., & Önvural, B. (2000). Effect of simvastatin therapy on blood and tissue ATP levels and erythrocyte membrane lipid composition. *Research in Experimental Medicine*, 199(4), 189-194.



- Chien, S. (1987). Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annual review of physiology*, 49(1), 177-192.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.49.030187.001141>
- Cho, Y. I., Mooney, M. P., & Cho, D. J. (2008). Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *Journal of diabetes science and technology*, 2(6), 1130-1138.  
<https://doi.org/10.1177/193229680800200622>
- Cooper, R. A. (1977). Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. . *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital*, 297(7), 371-377.
- Cooper, R. A., Arner, E., Wiley, J., & Shattil, S. (1975). Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *Journal of Clinical Investigation*, 55(1), 115.  
<https://doi.org/10.1172/JCI107901>
- Cooper, R. A., Durocher, J. R., & Leslie, M. H. (1977). Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. *Journal of Clinical Investigation*, 60(1), 115.  
<https://doi.org/10.1172/JCI108747>
- Cooper, R. A., Leslie, M. H., Fischkoff, S., Shinitzky, M., & Shattil, S. J. (1978). Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid. *Biochemistry*, 17(2), 327-331.  
<https://doi.org/10.1021/bi00595a021>
- Cooper, R. A., Leslie, M. H., Knight, D., & Detweiler, D. K. (1980). Red cell cholesterol enrichment and spur cell anemia in dogs fed a cholesterol-enriched atherogenic diet. *J Lipid Res*, 21(8), 1082-1089.
- Cunha, L. M., Bernardino-Neto, M., da Silva Garrote-Filho, M., Avelar, C. B., de Freitas, M. V., Netto, R. d. C. M., . . . Penha-Silva, N. (2014). Kinetics of hypotonic lysis of human erythrocytes. *Analytical Methods*, 6(5), 1377-1383.  
<https://doi.org/10.1039/c3ay41404c>
- Da Silva Garrote-Filho, M., Bernardino-Neto, M., & Penha-Silva, N. (2017). Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*, 19(4), 17.  
<https://doi.org/10.1007/s11883-017-0653-2>
- De Freitas, M. V., De Oliveira, M. R., Dos Santos, D. F., Netto, R. d. C. M., Fenelon, S. B., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *Journal of Membrane Biology*, 233(1-3), 127-134.  
<https://doi.org/10.1007/s00232-010-9232-y>
- Dévéhat, L., Vimeux, M., Bondoux, G., & Khodabandehlou, T. (1991). Effects of buflomedil on microvascular disorders in diabetic patients. *Journal of Vascular Research*, 28(Suppl. 1), 38-43.  
<https://doi.org/10.1159/000158919>
- Dintenfass, L. (1977). Blood viscosity factors in severe nondiabetic and diabetic retinopathy. *Biorheology*, 14(4), 151.  
<https://doi.org/10.3233/BIR-1977-14401>

- Dwight, J. S., Ribeiro, A. M., & Hendry, B. (1996). Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. *Clinica Chimica Acta*, 256(1), 53-63.  
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(96\)06412-1](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(96)06412-1)
- Ejima, J. i., Ijichi, T., Ohnishi, Y., Maruyama, T., Kaji, Y., Kanaya, S., . . . Ohmura, T. (2000). Relationship of high-density lipoprotein cholesterol and red blood cell filterability: cross-sectional study of healthy subjects. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 22(1), 1-7.
- Ernst, E., & Matrai, A. (1986). Altered red and white blood cell rheology in type II diabetes. *Diabetes*, 35(12), 1412-1415.  
<https://doi.org/10.2337/diab.35.12.1412>
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are oxidative stress- activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction? *Diabetes*, 52(1), 1-8.  
<https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.1>
- Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2015). Role of Glucose and Lipids in the Cardiovascular Disease of Patients with Diabetes.
- Garnier, M., Attali, J., Valensi, P., Delatour-Hanss, E., Gaudoy, F., & Koutsouris, D. (1990). Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. *Metabolism*, 39(8), 794-798.  
[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(90\)90121-R](https://doi.org/10.1016/0026-0495(90)90121-R)
- Giugliano, D., Ceriello, A., & Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*, 19(3), 257-267.  
<https://doi.org/10.2337/diacare.19.3.257>
- Guo, Q., Duffy, S. P., Matthews, K., Santoso, A. T., Scott, M. D., & Ma, H. (2014). Microfluidic analysis of red blood cell deformability. *Journal of biomechanics*, 47(8), 1767-1776.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.03.038>
- Hill, N. R., Oliver, N. S., Choudhary, P., Levy, J. C., Hindmarsh, P., & Matthews, D. R. (2011). Normal reference range for mean tissue glucose and glycemic variability derived from continuous glucose monitoring for subjects without diabetes in different ethnic groups. *Diabetes technology & therapeutics*, 13(9), 921-928.  
<https://doi.org/10.1089/dia.2010.0247>
- Hui, D. Y., & Harmony, J. A. (1979). Interaction of plasma lipoproteins with erythrocytes. I. Alteration of erythrocyte morphology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 550(3), 407-424.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(79\)90145-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90145-7)
- Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmieder, F., & Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B- $\alpha$ . *Diabetes*, 51(7), 2005-2011.  
<https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2005>

- King, G. L., & Brownlee, M. (1996). The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 25(2), 255-270.  
[https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70324-8](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70324-8)
- Kohno, M., Murakawa, K.-i., Yasunari, K., Yokokawa, K., Horio, T., Kano, H., . . . Yoshikawa, J. (1997). Improvement of erythrocyte deformability by cholesterol-lowering therapy with pravastatin in hypercholesterolemic patients. *Metabolism*, 46(3), 287-291.  
[https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90255-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90255-9)
- Kolanjiappan, K., Manoharan, S., & Kayalvizhi, M. (2002). Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 326(1), 143-149.  
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00300-5)
- Kung, C.-M., Tseng, Z.-L., & Wang, H.-L. (2009). Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 43(4), 345-351.
- Kunt, T., Schneider, S., Pfützner, A., Goitum, K., Engelbach, M., Schauf, B., . . . Forst, T. (1999). The effect of human proinsulin C-peptide on erythrocyte deformability in patients with type I diabetes mellitus. *Diabetologia*, 42(4), 465-471.  
<https://doi.org/10.1007/s001250051180>
- Kuroki, T., Isshiki, K., & King, G. L. (2003). Oxidative stress: the lead or supporting actor in the pathogenesis of diabetic complications. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(suppl 3), S216-S220.  
<https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000077405.07888.07>
- Kuypers, F. (1998). Red cell membrane damage. *The Journal of heart valve disease*, 7(4), 387-395.
- Le Devehat, C., Khodabandehlou, T., & Vimeux, M. (2001). Impaired hemorheological properties in diabetic patients with lower limb arterial ischaemia. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 25(2), 43-48.
- Lemos, G. S. D., Márquez-Bernardes, L. F., Arvelos, L. R., Paraíso, L. F., & Penha-Silva, N. (2011). Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell biochemistry and biophysics*, 61(3), 531-537.  
<https://doi.org/10.1007/s12013-011-9235-z>
- Martínez, M., Vayá, A., Martí, R., Gil, L., Lluch, I., Carmena, R., & Aznar, J. (1996). Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. *Thrombosis research*, 83(5), 375-388.  
[https://doi.org/10.1016/0049-3848\(96\)00147-8](https://doi.org/10.1016/0049-3848(96)00147-8)
- Mason, R. P., Walter, M. F., Day, C. A., & Jacob, R. F. (2006). Active metabolite of atorvastatin inhibits membrane cholesterol domain formation by an antioxidant mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9337-9345.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M513000200>
- McMillan, D. E., Utterback, N. G., & La Puma, J. (1978). Reduced erythrocyte deformability in diabetes. *Diabetes*, 27(9), 895-901.

<https://doi.org/10.2337/diab.27.9.895>

Menten, L., & Michaelis, M. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z*, 49, 333-369.

Meurs, I., Hoekstra, M., van Wanrooij, E. J., Hildebrand, R. B., Kuiper, J., Kuipers, F., . . . Van Eck, M. (2005). HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Experimental hematology*, 33(11), 1309-1319.  
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.07.004>

Miller, J. A., Gravalles, E., & Bunn, H. F. (1980). Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. Relevance to diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 65(4), 896.  
<https://doi.org/10.1172/JCI109743>

Monnier, L., Colette, C., Wojtuszczyk, A., Dejager, S., Renard, E., Molinari, N., & Owens, D. R. (2017). Toward Defining the Threshold Between Low and High Glucose Variability in Diabetes. *Diabetes care*, 40(7), 832-838.  
<https://doi.org/10.2337/dc16-1769>

Muller, S., Ziegler, O., Donner, M., Drouin, P., & Stoltz, J. (1990). Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 83(2-3), 231-237.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9150\(90\)90168-I](https://doi.org/10.1016/0021-9150(90)90168-I)

Nigra, A. D., Monesterolo, N. E., Rivelli, J. F., Amaden, M. R., Campetelli, A. N., Casale, C. H., & Santander, V. S. (2016). Alterations of hemorheological parameters and tubulin content in erythrocytes from diabetic subjects. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 74, 109-120.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.016>

Oyabu, H., Tsumoto, S., & Kageyama, T. (1982). Clinical investigation on the osmotic fragility of erythrocytes in cirrhosis of the liver. *Bulletin of the Osaka Medical School*, 28(1), 33.

Parthasarathi, K., & Lipowsky, H. H. (1999). Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(6), H2145-H2157.

Quarfordt, S. H., & Hilderman, H. L. (1970). Quantitation of the in vitro free cholesterol exchange of human red cells and lipoproteins. *Journal of lipid research*, 11(6), 528-535.

Rizvi, S. I., Zaid, M. A., Anis, R., & Mishra, N. (2005). Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(1-2), 70-75.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04160.x>

Rodbard, D. (2009). Interpretation of continuous glucose monitoring data: glycemic variability and quality of glycemic control. *Diabetes technology & therapeutics*, 11(S1), S-55-S-67.  
<https://doi.org/10.1089/dia.2009.0077>

Sasaki, S. (1976). Red cell lipids in patients with end-stage renal failure: relationship to osmotic fragility. *Osaka city medical journal*, 23(1), 85-98.

- Schick, B. P., & Schick, P. K. (1985). Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 833(2), 281-290.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90200-0](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90200-0)
- Schmid-Schönbein, H., & Volger, E. (1976). Red-cell aggregation and red-cell deformability in diabetes. *Diabetes*, 25(2 SUPPL), 897-902.
- Schwartz, R. S., Madsen, J. W., Rybicki, A. C., & Nagel, R. L. (1991). Oxidation of spectrin and deformability defects in diabetic erythrocytes. *Diabetes*, 40(6), 701-708.  
<https://doi.org/10.2337/diab.40.6.701>
- Shin, S., Ku, Y.-H., Ho, J.-X., Kim, Y.-K., Suh, J.-S., & Singh, M. (2007). Progressive impairment of erythrocyte deformability as indicator of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 36(3), 253-261.
- Shin, S., Ku, Y.-H., Suh, J.-S., & Singh, M. (2008). Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 38(3), 153-161.
- Simpson, L. (1985). Intrinsic stiffening of red blood cells as the fundamental cause of diabetic nephropathy and microangiopathy: a new hypothesis. *Nephron*, 39(4), 344-351.  
<https://doi.org/10.1159/000183403>
- Sivilotti, M. L. (2004). Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicological reviews*, 23(3), 169-188.  
<https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00004>
- Skovborg, F., Nielsen, A., Schlichtkrull, J., & Ditzel, J. (1966). Blood-viscosity in diabetic patients. *The Lancet*, 287(7429), 129-131.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(66\)91264-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(66)91264-5)
- Smith, C. M., Marks, A. D., & Lieberman, M. (2007). *Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica*: Artmed.
- Symeonidis, A., Athanassiou, G., Psiroyannis, A., Kyriazopoulou, V., Kapatais-Zoumbos, K., Missirlis, Y., & Zoumbos, N. (2001). Impairment of erythrocyte viscoelasticity is correlated with levels of glycosylated haemoglobin in diabetic patients. *International Journal of Laboratory Hematology*, 23(2), 103-109.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2001.00366.x>
- Tsukada, K., Sekizuka, E., Oshio, C., & Minamitani, H. (2001). Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with a transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system. *Microvascular research*, 61(3), 231-239.  
<https://doi.org/10.1006/mvre.2001.2307>
- Tziakas, D., Chalikias, G., Grapsa, A., Gioka, T., Tentis, I., & Konstantinides, S. (2012). Red blood cell distribution width—a strong prognostic marker in cardiovascular disease—is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 51(4), 243-254.

- Umudum, F. Z., Yücel, O., Şahin, Y. N., & Bakan, E. (2002). Erythrocyte membrane glycation and  $Na^{+}$ – $K^{+}$  levels in NIDDM. *Journal of Diabetes and its Complications*, 16(5), 359-362.  
[https://doi.org/10.1016/S1056-8727\(01\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S1056-8727(01)00223-9)
- Uydu, H. A., Yıldırım, S., Örem, C., Calapoglu, M., Alver, A., Kural, B., & Örem, A. (2012). The effects of atorvastatin therapy on rheological characteristics of erythrocyte membrane, serum lipid profile and oxidative status in patients with dyslipidemia. *The Journal of membrane biology*, 245(11), 697-705.  
<https://doi.org/10.1007/s00232-012-9441-7>
- Uyuklu, M., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2007). Effect of decreased plasma cholesterol by atorvastatin treatment on erythrocyte mechanical properties. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 36(1), 25-33.
- Vessby, J., Basu, S., Mohsen, R., Berne, C., & Vessby, B. (2002). Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. *Journal of internal medicine*, 251(1), 69-76.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.00927.x>
- Yoshida, H., Takamatsu, S., Satoh, K., Imaizumi, T., Hiramoto, M., & Shoji, B. (1992). Participation of serum albumin and LDL-cholesterol in impaired blood cell-filterability affected by white blood cells in patients with cerebral thrombosis. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 52(7), 641-646.  
<https://doi.org/10.3109/00365519209115507>
- Zhao, L. (2001). Effects of free radicals in diabetes. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 77, 222.
- Ziegler, O., Guerci, B., Muller, S., Candiloros, H., Mejean, L., Donner, M., . . . Drouin, P. (1994). Increased erythrocyte aggregation in insulin-dependent diabetes mellitus and its relationship to plasma factors: a multivariate analysis. *Metabolism*, 43(9), 1182-1186.  
[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(94\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(94)90063-9)
- Zinchuk, V. (2001). Erythrocyte deformability: physiological aspects. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, 32(3), 66-78.