



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

**CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E
VARIÁVEIS OXIDATIVAS, INFLAMATÓRIAS E ANTROPOMÉTRICAS EM
ADOLESCENTES OBESOS**

Estudante: **Jacqueline Aimê dos Reis Vilela**

UBERLÂNDIA, MG
2017



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

**CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E
VARIÁVEIS OXIDATIVAS, INFLAMATÓRIAS E ANTROPOMÉTRICAS EM
ADOLESCENTES OBESOS**

Estudante: **Jacqueline Aimê dos Reis Vilela**
Orientador: **Dr. Nilson Penha-Silva**
Co-orientadora: **Dra. Nádia Carla Cheik**

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

UBERLÂNDIA, MG
2017

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

V699c

Vilela, Jacqueline Aimê dos Reis, 1986

2017

Correlações entre estabilidade de membrana de eritrócitos e variáveis oxidativas, inflamatórias e antropométricas em adolescentes obesos [recurso eletrônico] / Jacqueline Aimê dos Reis Vilela. - 2017.

Orientador: Nilson Penha-Silva.

Coorientadora: Nádia Carla Cheik.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.805>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. 2. Eritróцитos. 3. Stress oxidativo. 4. Obesidade. I. Penha-Silva, Nilson, , (Orient.). II. Cheik, Nádia Carla, , (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

Palavras-chave: Eritrócito, membrana, estabilidade, estresse oxidativo, inflamação, obesidade



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

**CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E
VARIÁVEIS OXIDATIVAS, INFLAMATÓRIAS E ANTROPOMÉTRICAS EM
ADOLESCENTES OBESOS**

Estudante: **Jacqueline Aimê dos Reis Vilela**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:	Prof. Dr. Nilson Penha-Silva	[UFU]
Examinador:	Prof. Dr. Mario da Silva Garrote Filho	[UFU]
Examinador:	Prof. Dr. Miguel Júnior Sordi Bortolini	[UFAC]

Data da defesa:

UBERLÂNDIA, MG
2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
José Edward Pádua Vilela Junior
e Vera Lúcia Batista dos Reis Vilela.

AGRADECIMENTOS

A Deus, misericordioso, por me amparar todos os dias de minha vida e me permitir ter pessoas tão especiais ao lado.

Aos meus pais, José Edward e Vera Lúcia, pelo amor incondicional, por me proporcionarem valores e princípios, além de educação e paixão pelos estudos, e por estarem sempre ao meu lado, me estimulando a seguir em frente.

Ao meu orientador, professor Nilson Penha-Silva, mestre generoso que ensina com simplicidade, por seu apoio, amizade, paciência, dedicação, competência e orientação. Com você, adquiri muito mais que conhecimentos acadêmicos, descobri importantes valores humanos. Obrigada por me inspirar a aprender e ser melhor.

A minha co-orientadora, professora e amiga, Nadia Carla Cheik, por me ajudar com o banco de dados, mas, principalmente, por me mostrar os primeiros passos da pesquisa científica, acreditar em meu potencial e pelos ensinamentos oferecidos em momentos diversos.

Ao amigo Mario Garrote Filho, por doar seu tempo e conhecimento, me auxiliando não só no tratamento estatístico dos resultados, mas também colaborando em dúvidas e dando sugestões para a este trabalho.

Ao meu irmão, simplesmente por sua presença em minha vida.

À Luna, minha companheira de quatro patas, por fazer mais doce os meus dias.

Aos meus avós paternos (*in memorian*), fontes de inspiração e esperança, pelo legado de ternura.

Aos meus avós maternos pelas vibrações e todas as preces. Sobretudo, por me despertarem os mais sublimes sentimentos, além de serem primorosos exemplos de afeto, coragem e fé.

Ao Tio Fausto e à Tia Ivanilde, pelo amor e carinho. A distância não nos separa, seus corações estão comigo e o meu com vocês.

Ao Lúcio Alberto Nakagawa, pelo persistente cuidado e atenção.

A todos os parentes que me incentivaram e torceram pela minha vitória.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biofísicoquímica – LaBFiQ (Alice Vieira da Costa, Carla Cristina, Flaviana Gomes, Lucas Moreira Cunha, Lucas Tadeu Andrade, Kely Raspante, Luciana Medeiros, Marcelo Costa Júnior, Marcia

Aires, Marco Aurélio Leite, Maria Aparecida Knychala, Mario Garrote Filho, Mateus Bergamo, Rodney Paixão, Rosiane Soares Saturnino, Professor Ubirajara Coutinho Filho, Wener Barbosa Resende), pelos momentos divididos, pela ajuda e conhecimentos partilhados.

Aos amigos, colegas e alunos da Prefeitura Municipal de Uberlândia (PMU), que, mesmo de longe, enviaram energias positivas.

Aos amigos em geral, pelo companheirismo, respeito, amizade. Obrigada por tornarem mais leve minha jornada.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, seus colaboradores e professores, pela formação.

Aos demais colegas do programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia pela convivência e saberes divididos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Mestrado.

APOIO

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR



CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU)



SUMÁRIO

	Página
Abreviaturas	viii
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	14
Obesidade	15
Obesidade e inflamação	16
Obesidade e estresse oxidativo	17
Tratamento multiprofissional da obesidade	20
Composição e estrutura das membranas biológicas	21
Estabilidade das membranas biológicas	23
Composição e estabilidade de eritrócitos	24
Análise da estabilidade de membranas de eritrócitos	26
Objetivos	28
Material e Métodos	29
Participantes	29
Coleta de dados	30
Análise estatística	32
Resultados	33
Discussão	34
Conclusão	40
Referências	51

ABREVIATURAS

A ou Abs	Absorvância
A_{540 nm}	Absorvância em comprimento de onda de 540 nm
AC^{ase}	Acetilcolinesterase
A_{max}	Absorvância com percentual máximo de hemólise
A_{min}	Absorvância com percentual mínimo de hemólise
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
dX	Variação na concentração de NaCl capaz de promover 100% de hemólise
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
FAEFI	Faculdade de Educação Física
FOE	Fragilidade Osmótica de Eritróцитos
FRAP	<i>Ferric-Ion Reducing Antioxidant Power</i> (Potencial Antioxidante Redutor do Íon Férrico)
Glu	Glicose
GSH-Px	Glutationa Peroxidase
H₅₀	Concentração de NaCl capaz de provocar 50% de hemólise
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade
IL-1	Interleucina 1
IL-18	Interleucina 18
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de Massa Corporal
IP-10	Proteína Inflamatória 10
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade
MDA	Malondialdeído
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro.
NADPH	Forma reduzida da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NO	Óxido Nítrico
PCR	Proteína C Reativa
PTMAO	Programa de Tratamento Multidisciplinar do Adolescente Obeso
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i> (Distribuição de Volume das Células Vermelhas do Sangue)
RE	Retículo Endoplasmático
ROS	<i>Reactive Oxigen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
t-C	Colesterol plasmático total
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VCM	Volume Corpúscular Médio
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Influência da composição lipídica e do calor sobre a estabilidade e a funcionalidade de uma membrana biológica	40
Figura 2 Curva típica de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos	41
Figura 3 Relação dos parâmetros de fragilidade eritrocitária H ₀ , H ₅₀ e H ₁₀₀ com o índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal (CA) de adolescentes obesos	42
Figura 4 A) Relação do índice de estabilidade eritrocitária dX/H ₅₀ com os níveis sanguíneos da atividade da superóxido dismutase (SOD) em adolescentes obesos. B) Relação do índice de estabilidade eritrocitária dX/Amin com os níveis sanguíneos de NaNO ₂ em adolescentes obesos	43

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Características de base dos participantes deste estudo	44
Tabela 2 Correlações entre variáveis de estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos e parâmetros de estresse oxidativo, inflamatórios e antropométricos	45
Tabela 3 Matriz de correlações simples entre todas as variáveis mensuradas	46

RESUMO

CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E VARIÁVEIS OXIDATIVAS, INFLAMATÓRIAS E ANTROPOMÉTRICAS EM ADOLESCENTES OBESOS

[Introdução] A obesidade é considerada um importante problema de saúde pública da atualidade e vem ganhando destaque no cenário epidemiológico mundial. Ela está relacionada a um estado inflamatório sistêmico de baixa intensidade. Além disso, danos celulares relacionados a radicais livres se encontram acentuados em pessoas obesas e predispõem a comorbidades. A estabilidade de uma membrana biológica depende de influências genéticas, alimentação e estilo de vida e parece sofrer alterações decorrentes da obesidade e do estresse oxidativo. **[Objetivo]** Este estudo teve como objetivo investigar a existência de relações entre estabilidade osmótica de eritrócitos e parâmetros de estresse oxidativo, inflamatórios e antropométricos em adolescentes obesos. **[Amostra]** A amostra foi constituída de 32 adolescentes de 14 a 19 anos. **[Métodos]** Os parâmetros antropométricos utilizados foram massa corporal (MC), índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal (CA). A estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos foi determinada por meio do teste de fragilidade osmótica eritrocitária (FOE). O estresse oxidativo foi avaliado por meio do potencial de redução do ferro (FRAP), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividades da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e o conteúdo de nitrito de sódio (NaNO_2). O estado inflamatório foi verificado medindo-se a proteína C reativa (PCR), adiponectina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). **[Resultados]** Correlações positivas foram encontradas entre composição corporal (MC, IMC e CA) e fragilidade osmótica de eritrócitos (H_0 , H_{50} e H_{100}). Correlações positivas também foram encontradas entre SOD e NaNO_2 e índices de estabilidade osmótica de eritrócitos (dX/H_{50} e dX/A_{\min} , respectivamente). **[Conclusões]** As análises de correlação mostraram que a estabilidade de membrana de eritrócitos é sensível a alterações na composição corporal e nos níveis séricos de SOD e NaNO_2 em adolescentes obesos.

Palavras-chave: Eritrócito, estabilidade, estresse oxidativo, inflamação, obesidade.

ABSTRACT

CORRELATIONS BETWEEN ERYTHROCYTES MEMBRANE STABILITY AND OXIDATIVE, INFLAMMATORY AND ANTHROPOMETRIC VARIABLES IN OBESE ADOLESCENTS

[Introduction] Obesity is considered an important public health problem today and has been gaining prominence in the world epidemiological scenario. It is related to a systemic low-grade inflammation. In addition, cell damage related to free radicals is accentuated in obese individuals and predisposes to comorbidities. The stability of a biological membrane depends on genetic, food and lifestyle influences, and seems to suffer alterations due to obesity and oxidative stress. **[Objective]** This study aimed to investigate the existence of correlations between osmotic stability of erythrocytes and inflammatory, anthropometric, and oxidative stress parameters in obese adolescents. **[Sample]** The sample consisted of 32 adolescents aged 14 to 19 years. **[Methods]** The anthropometric parameters used were body mass (BM), body mass index (BMI) and waist circumference (WC). Determination of erythrocyte membrane stability was performed using the erythrocyte osmotic fragility (EOF) test. Oxidative stress was evaluated by means of ferric reducing antioxidant power (FRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, and sodium nitrite (NaNO_2) content. The inflammatory state was verified by measuring C-reactive protein (CRP), adiponectin and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). **[Results]** Positive correlations were found between body composition parameters (BM, BMI and WC) and membrane stability variables (H_0 , H_{50} and H_{100}). Positive correlations were also found between the serum levels of SOD and NaNO_2 and erythrocyte osmotic stability indices (dX/H_{50} and dX/A_{\min} , respectively) **[Conclusions]** Correlation analyzes showed that erythrocyte membrane stability is sensitive to changes in body composition and serum levels of SOD and NaNO_2 in obese adolescents.

Keywords: Erythrocyte, stability, oxidative stress, inflammation, obesity.

INTRODUÇÃO

Durante séculos, a obesidade foi considerada sinônimo de beleza, bem-estar físico, riqueza e poder. Atualmente, ela representa um importante problema de saúde pública, não só pelo seu impacto negativo na expectativa de vida, mas também pela piora que acarreta em sua qualidade (Repetto, Rizzolli et al. 2003). Já é a principal causa evitável de morte, junto ao tabaco (Dâmaso 2009).

Nas últimas décadas tem-se verificado, principalmente nos países em desenvolvimento, um fenômeno chamado “inversão epidemiológica”. As doenças infectocontagiosas, que eram anteriormente consideradas os principais problemas de saúde pública, vêm sendo superadas pelas enfermidades crônico-degenerativas, tais como diabetes tipo II, dislipidemias, doenças cardiovasculares e hipertensão arterial. Todas essas doenças possuem relação direta com o excesso de peso (Dâmaso 2009). A questão torna-se ainda mais preocupante quando se observa a proporção de obesidade na população infantil e juvenil (Nunes 2015).

Este estudo faz parte de um projeto maior, intitulado Programa de Tratamento Multidisciplinar do Adolescente Obeso (PTMAO), desenvolvido na cidade de Uberlândia, por iniciativa da Faculdade de Educação Física (FAEFI) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). No PTMAO, ofereceu-se um tratamento multiprofissional para adolescentes obesos, que incluiu reeducação alimentar com nutricionistas, terapia em grupo com psicólogos, treinamento personalizado com professores de educação física e acompanhamento do estado geral de saúde com endocrinologista e pediatra.

Um estudo anterior mostrou que o PTMAO, feito durante 6 meses, foi eficaz na melhoria das respostas anti-inflamatórias e das defesas antioxidantes em adolescentes obesos (Nunes 2015). Outro estudo avaliou a estabilidade de eritrócitos antes e depois do PTMAO. Ao final do estudo, encontrou-se aumento na estabilidade de eritrócitos dos adolescentes obesos, associado a aumento dos valores de RDW e dos níveis de Hb1AC, embora o declínio de Hb1AC após o programa de treinamento não tenha sido estatisticamente significante (Huss 2012).

O presente trabalho, em complemento às pesquisas anteriormente citadas, analisa a existência de relações entre a estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos e parâmetros de estresse oxidativo, inflamatórios e antropométricos nos adolescentes obesos.

Obesidade

A obesidade é considerada um importante problema de saúde pública da atualidade e vem ganhando destaque no cenário epidemiológico mundial. Pode ser definida, de uma maneira simples, como o acúmulo excessivo de gordura corporal em proporção tal, que é capaz de provocar prejuízos à saúde dos indivíduos (WHO, 2004). É um importante fator de risco para o desenvolvimento de diversas comorbidades de elevada morbimortalidade, tais como dislipidemia, aterosclerose, hipertensão arterial, resistência à insulina, síndrome metabólica, *diabetes mellitus*, esteatose hepática e doença hepática não alcoólica entre outras (Dâmaso, 2009).

A prevalência de obesidade aumentou muito nas últimas décadas, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde anteriormente predominavam problemas relacionados à desnutrição (2004). Este aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade vem ocorrendo em idades cada vez mais precoces, atingindo, além dos adultos, crianças e adolescentes. Tal fato tem despertado a preocupação de pesquisadores e profissionais da área de saúde, sobretudo em razão dos danos e agravos à saúde provocados pelo excesso de peso (Lee 2009).

Dados globais da OMS (2015), apontam que em 2014 mais de 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso, dos quais 600 milhões eram obesos, correspondendo a 13% da população adulta do planeta. Nos Estados Unidos, 67% da população sofrem de sobrepeso ($IMC \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$) enquanto 34% apresentam obesidade ($IMC \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$), representando um aumento de 75% em relação a 1991 (Statistics 2007). No Brasil, dados da Pesquisa de Orçamento Familiar de 2008-2009, revelaram que o excesso de peso afeta 50,1% dos homens e 48% das mulheres, dentre os quais são considerados obesos 12,4% dos homens e 8% das mulheres (2010).

Em relação à obesidade infantil, segundo o relatório da Comissão pelo Fim da Obesidade Infantil (ECHO), da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2016) a prevalência de sobrepeso entre menores de 5 anos aumentou de 4,8% para 6,1% entre 1990 e 2014, passando de 31 milhões para 41 milhões de crianças afetadas durante esse período. Já a obesidade juvenil, nos EUA, entre 1965 e 1995, esta aumentou 106% em meninas de 6 a 11 anos, 108% em meninos de 6 a 11 anos, 69% em meninas de 12 a 17 anos e 148% em meninos de 12 a 17 anos (Bar-Or

2003). Já no Brasil, a prevalência de excesso de peso na população adolescente (10 a 19 anos), passou de 3,7% em 1974-1975 para 21,7% em 2008-2009 para meninos e de 7,6% em 1974-1975 para 19,4% em 2008-2009 (2010).

A etiologia da obesidade é multifatorial, envolvendo aspectos endógenos e exógenos que se inter-relacionam e se potencializam mutuamente. Os fatores endógenos estão relacionados a componentes genéticos, neuropsicológicos, endócrinos e metabólicos, enquanto os exógenos são influenciados por questões externas de origem comportamental, dietética e ambiental. As influências exógenas, tais como padrão alimentar e atividade física, são reconhecidamente as determinantes que mais contribuem para o aumento do excesso de peso, sendo responsáveis por provavelmente 95% dos casos de obesidade (Dâmaso 2009).

Transformações significativas têm ocorrido nos padrões dietéticos e nutricionais das populações. Essas mudanças são parte de um processo designado como transição nutricional e convergem para uma alimentação rica em gorduras, especialmente de origem animal, açúcar refinado, além de reduzida ingestão de carboidratos complexos e fibras. A adoção desses hábitos alimentares, conhecidos como “ocidentais”, aliado ao declínio na atividade física dos indivíduos, leva a alterações na composição corporal, particularmente ao aumento de gordura corporal (Monteiro, Mondini et al. 1995). Além disso, a falta de informação associada à ausência de políticas de saúde que atendam adequadamente a população torna ainda mais grave e preocupante a epidemia de obesidade instalada no Brasil (Oliveira, Cerqueira et al. 2003).

Obesidade e inflamação

A obesidade, já considerada uma doença, está relacionada a um estado inflamatório sistêmico de baixa intensidade, observado tanto em adultos como em crianças e adolescentes (Visser, Bouter et al. 2001). Este estado inflamatório está relacionado a desordens como hiperlipidemia, hipertensão arterial, aterogênese, síndrome metabólica, resistência insulínica e *diabetes mellitus* (Trayhurn and Wood 2004).

O tecido adiposo, outrora considerado mero e passivo estoque de energia na forma de triacilgliceróis, hoje é entendido como um relevante órgão endócrino e secretor, produzindo diversas substâncias pró-inflamatórias (Mazurek, Zhang et al. 2003). No processo de diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros,

estes apresentam a capacidade de produção de várias proteínas: enzimas, citocinas, fatores de crescimento e hormônios envolvidos em vários eventos metabólicos (Lau, Dhillon et al. 2005). Nesse sentido, o tecido adiposo é fonte de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para a inflamação sistêmica de baixo grau, que está associada à injúria vascular, resistência insulínica e aterogênese. As chamadas adipocinas incluem: TNF- α , IL-6, leptina, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), angiotensinogênio, resistina e proteína C-reativa (PCR). Algumas atuam de modo a proteger contra inflamação vascular e resistência insulínica, dentre as quais se destacam a adiponectina e o óxido nítrico (Bergman and Mittelman 1998).

Acredita-se, também, que a hipertrofia dos adipócitos leve à compressão dos vasos sanguíneos, o que impede o suprimento adequado de oxigênio, levando à hipóxia local e consequente morte de adipócitos. Tal quadro desencadeia a cascata da resposta inflamatória, além do processo de angiogênese (Wood, de Heredia et al. 2009). Assim, a elevação dos marcadores inflamatórios que levam à inflamação crônica de baixo grau característica da obesidade é proveniente não só da produção destes pelos próprios adipócitos, mas também pelos macrófagos infiltrados em resposta à hipóxia (Leite, de Medeiros Rocha et al. 2009).

Obesidade e estresse oxidativo

Danos celulares, como peroxidação lipídica, se encontram acentuados em pessoas obesas e predispõem a comorbidades, como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, eventos tromboembólicos, diabetes mellitus, além de neoplasias (Alves, Alves et al. 2011).

A peroxidação lipídica consiste em uma reação em cadeia dos ácidos graxos polinsaturados de membranas celulares, gerando radicais livres que modificam a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (Mahattanatawhee, Manthey et al. 2006).

Radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell 1992). Embora eles sejam essenciais para funções como sinalização celular e defesa contra micro-organismos, por atuarem como mediadores para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas, a produção excessiva deles pode levar a lesões oxidativas em importantes moléculas (Barbosa, Costa et al. 2010). Os radicais livres

cujo elétron desemparelhado se encontra no átomo de oxigênio ou de nitrogênio pertencem respectivamente às categorias das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) ou Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), as quais também compreendem outros compostos de natureza não radicalar, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um ERO capaz de gerar o radical hidroxila (Pietta 2000).

As ERO são produtos instáveis, decorrentes da redução tetravalente sofrida pela molécula de oxigênio, acceptora final de elétrons, durante a produção de energia na etapa de fosforilação oxidativa (Halliwell and Gutteridge 2015). As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Buchwald 2005). Alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando apenas lipídios, outros são reativos também com carboidratos, proteínas e DNA (Santos, Tanaka et al. 2009).

As fontes geradoras de espécies reativas são as que se seguem: mitocôndria (redução incompleta do O_2); macrófagos e neutrófilos; endotélio; epitélio; sistemas enzimáticos (mieloperoxidase; xantina oxidase, NADPH-oxidase, NADPH:citocromo P450 oxirredutase, ciclo-oxigenase, óxido nítrico sintetase); reações de Fenton e de Haber-Weiss, que ocorrem com íons metálicos, como Fe^{++} e Cu^{++} ; e reação não enzimática entre os radicais superóxido e óxido nítrico, resultando na geração de peroxinitrito (Touyz and Schiffrin 2004).

Concomitantemente à produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos, há mecanismos de defesa antioxidante, que têm o objetivo de reduzir os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (Barbosa, Costa et al. 2010).

A instauração do processo de estresse oxidativo decorre do desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em prejuízo da velocidade de remoção desses. Tal desequilíbrio do sistema redox conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Halliwell and Whiteman 2004).

Os antioxidantes possuem elevada estabilidade oxidativa em função de sua estrutura molecular, desempenhando papel fundamental na prevenção da oxidação

resultante da ação dos radicais livres (Andrade-Wartha 2007). Os sistemas antioxidantes podem ser compostos enzimáticos ou não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GSH-Px), glutationa redutase (GSHRd) e a catalase (CAT) (Pietta, 2000). A superóxido dismutase catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é subsequentemente convertido em H_2O e O_2 , pela catalase, ou somente em H_2O , pela glutationa peroxidase, enzima esta que requer a ação da coenzima de oxirredução glutationa reduzida (GSH), em um processo que forma glutationa oxidada (GSSG). A redução da forma oxidada da glutationa é então realizada pela glutationa redutase via ciclo da glutationa, às expensas do poder redutor do NADPH, normalmente produzido pela via das pentoses (Codoñer-Franch, Valls-Bellés et al. 2011).

Já o sistema antioxidante não enzimático refere-se a antioxidantes que podem ser produzidos *in vivo*, como a glutationa, a ubiquinona e o ácido úrico, ou que podem ser obtidos diretamente da dieta, tais como o α-tocoferol (vitamina-E), β-caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (Halliwell and Gutteridge 2015).

O estresse oxidativo, como mencionado, acontece quando a magnitude da produção de espécies reativas supera a capacidade antioxidante, o que resulta em oxidação de lipídios (lipoperoxidação), proteínas (carbonilação e/ou nitratação), carboidratos (carbonilação) e DNA (oxidação de bases nitrogenadas). A lesão desses importantes componentes celulares leva à alteração da estrutura química, da função e degeneração e morte celular. A lipoperoxidação corresponde a uma reação autolimitada, contudo, a produção excessiva de espécies reativas pode reiniciar o processo, resultando em descontrole e geração de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA) (Yagi 1998).

A lesão oxidativa em DNA pode ocorrer nas bases púricas e pirimídicas na presença de HO^{\bullet} , o qual retirando um átomo de hidrogênio das ligações C-H (carboidrato-hidrogênio) gera falsas bases (chamadas de aductos de bases de DNA), que podem ser produzidas na presença ou na ausência de O_2 . As bases falsas geradas podem atuar como oxidantes ou como redutoras (dependendo do local onde foi retirado o átomo de hidrogênio) e comprometem a replicação e a transcrição, o que, consequentemente, leva a prejuízo do processamento da informação genética (Cooke, Evans et al. 2003).

A nitração de proteínas é resultado da ação indesejável do peroxinitrito levando a prejuízo da função da proteína em questão. A carbonilação de proteínas ocorre como resultado da ação de produtos de lipoperoxidação avançada, como MDA, gioxal, acroleína e 4-hidroxinonenal (4-HNE), e de produtos de glicação avançada, como gioxal e metilgioxal, sobre sítios nucleofílicos de aminofosfolipídeos, peptídeos e proteínas (cisteína, lisina e histidina) e de DNA (Pacher, Beckman et al. 2007).

Os pacientes obesos comumente possuem um desequilíbrio entre gordura, peso corporal, lipoproteínas e lipídios, o que interfere na suscetibilidade do organismo a lesões oxidativas (Nunes 2015).

Existem pelo menos três mecanismos através dos quais a obesidade pode ocasionar peroxidação lipídica (Olusi 2002). A obesidade eleva a necessidade metabólica do miocárdio, com consequente aumento no consumo de oxigênio. Assim, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como os superóxidos e os peróxidos de hidrogênio também aumenta, já que há maior respiração mitocondrial. Se a produção dessas espécies de oxigênio exceder a capacidade antioxidante da célula, dá-se o estresse oxidativo, resultando em peroxidação lipídica (Turrens 1997). Outro mecanismo por meio do qual a obesidade pode aumentar a peroxidação lipídica é a lesão celular progressiva e cumulativa devido à pressão exercida pela avantajada massa corporal. A injúria celular libera citocinas como o TNF- α que, por sua vez, gera espécies reativas de oxigênio (Lechleitner, Koch et al. 2000). O último mecanismo relaciona-se com o consumo de dietas hiperlipídicas. Este tipo de dieta altera o metabolismo do oxigênio, pois as moléculas de ácidos graxos com duplas ligações são vulneráveis a reações oxidativas e, por conseguinte, podem levar a peroxidação lipídica (Neves 2011).

Variadas providências, como intervenções farmacológicas, cirúrgicas, prática de atividade física, restrição calórica e mudanças comportamentais têm sido propostas para o tratamento da obesidade e consequente redução do estresse oxidativo. Essas intervenções favorecem a perda de peso, que se associa a uma redução na produção de espécies oxidantes e a uma maior capacidade antioxidante, contribuindo, assim, com a redução dos fatores de risco e a melhoria das comorbidades (Manson, Stampfer et al. 1987).

Tratamento multiprofissional da obesidade

A obesidade é uma doença desencadeada por múltiplos fatores. O controle e tratamento da obesidade favorecem a melhoria de qualidade de vida e concomitante redução dos fatores de riscos mórbidos associados a essa doença (Dâmaso 2009).

Assim, tendo em vista a associação entre obesidade e as alterações metabólicas, estruturais e psicológicas decorrentes de um padrão alimentar inadequado e hipoatividade, torna-se evidente que um programa de intervenção deve ser alicerçado em ação multiprofissional com a finalidade de auxiliar o tratamento ou diminuição dos problemas relacionados a essa doença (Dâmaso 2009).

A maior parte dos profissionais da área da saúde pode trabalhar no tratamento da obesidade. Além dos médicos, que são aptos a tratar a obesidade por meio de medicamentos ou cirurgias, é essencial a atuação integrada de, pelo menos, três categorias profissionais: profissionais de educação física, nutricionistas e psicólogos. Outros profissionais, como fisioterapeutas, enfermeiros, terapeutas ocupacionais e fonoaudiólogos, entre outros, também podem participar da equipe de intervenção junto ao paciente obeso (Dâmaso 2009).

O tratamento multidisciplinar apresenta vantagens no controle e redução da obesidade tais como diagnósticos mais precisos e completos e enfrentamento dos problemas psicossociais do paciente. Além disso, há uma maior compreensão, por parte do obeso, em relação à natureza complexa da obesidade, já que, neste tipo de tratamento, são realizados processos educativos com os pacientes. Tudo isso, facilita o trabalho de cada um dos profissionais envolvidos no tratamento da obesidade, aumentando a probabilidade de sucesso no tratamento (García 2004).

A combinação de avaliação, prescrição e acompanhamento regular feito por uma equipe multidisciplinar tem-se mostrado mais eficaz no tratamento da obesidade do que intervenções isoladas de dieta e/ou exercício físico (García 2004). Muitos estudos apontam significativas melhorias com o tratamento multidisciplinar da obesidade (Dalton 1998, Frank 1998, Sothern, Loftin et al. 1999, Vansant, Hulens et al. 1999, Nunes 2015).

Composição e estrutura das membranas biológicas

As membranas biológicas são finas películas (espessura de cerca de 5 nanômetros) constituídas, principalmente, por proteínas e fosfolipídios, que circundam as células vivas e delimitam as organelas no seu interior, tornando

possível a interação de uma célula com outras e com moléculas do meio (Alberts, Johnson et al. 2002).

Embora sejam muito finas, as membranas biológicas são altamente versáteis e complexas, exercendo uma grande variedade de funções nas células. Uma de suas funções é o controle da passagem de substâncias, permitindo o acesso de determinados compostos químicos através delas e impedindo o acesso de outros, o que conserva o meio celular interno apropriado às necessidades de cada célula. Isso significa que as membranas biológicas possuem permeabilidade seletiva (Alberts, Johnson et al. 2002).

As proteínas de membrana, responsáveis por diversas funções celulares, podem ser integrais (imersas na bicamada) ou periféricas (na superfície interna ou externa da bicamada). Algumas proteínas, integrais, funcionam como bombas seletivas, que regulam a passagem de íons e moléculas menores tanto para dentro quanto para fora da célula. Tais proteínas geram gradientes de prótons muito importantes para a produção de ATP. Outras, periféricas, são capazes de identificar determinadas substâncias no meio, estimulando-a a reagir, como é o caso dos receptores hormonais. Além disso, certas proteínas atuam como enzimas, catalisando diversas reações metabólicas (Alberts, Johnson et al. 2002).

Os lipídios, por sua vez, se apresentam em camada dupla, sendo responsáveis por conferir forma física às membranas biológicas. Estas moléculas são relativamente pequenas, com regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. A região hidrofílica corresponde à “cabeça” da molécula do lipídio, eletricamente carregada e, por isso, tem afinidade com moléculas de água. Já a região hidrofóbica corresponde à “cauda” da molécula, formada pelas cadeias alquílicas de ácidos graxos, as quais não se dissolvem em água. Na dupla camada lipídica da membrana, as porções polares dos lipídios ficam expostas no meio aquoso, seja no ambiente citoplasmático ou no ambiente extracelular, enquanto as porções apolares se dirigem para o interior anidro da membrana (Boon and Smith 2002).

Dentre os principais lipídios presentes nas membranas biológicas estão os fosfolipídios, os esfingolipídios e os esteróis (Cascio 2005). Um importante esterol constituinte das membranas é o colesterol, composto orgânico que influencia relevantes processos biológicos, tais como permeabilidade de membrana, organização lateral de lipídios, transdução de sinais e passagem de substâncias através da membrana (Wüstner 2007). Quanto maior a quantidade de esteróis,

maior é a rigidez da membrana, devido à presença do núcleo rígido do anel esteroide, que diminui a liberdade de rotação das ligações carbono-carbono (Murray, Rodwell et al. 2006).

Os fosfolipídios, dispostos lado a lado na bicamada, podem mover-se lateralmente, embora, não percam o contato uns com os outros. Isto faz com que as membranas sejam estruturas dinâmicas e fluidas (Alberts, Johnson et al. 2002). Esse modelo de estrutura de membrana, originalmente formulado por Singer and Nicolson (1972), recebe o nome de mosaico fluido.

Estabilidade das membranas biológicas

As membranas celulares devem combinar estabilidade e funcionalidade, propriedades dependentes de seu nível de fluidez. A fluidez é uma propriedade da matéria que se eleva à medida que se vai do estado sólido para o estado gasoso. A organização de uma membrana biológica requer um grau intermediário de fluidez, chamado de fluidez crítica (Figura 1), que é essencial para numerosas funções celulares (Bernardino Neto 2011).

A estrutura fluida das membranas se deve ao fato de seus componentes não ocuparem posições definidas, podendo sofrer difusão lateral e rotação através de cada monocamada (Singer 1974, Alberts, Johnson et al. 2002). Isso acontece por não haver ligações fortes (covalentes) entre as moléculas, mas sim ligações fracas (ligações de Van der Walls e de hidrogênio) (Murray, Rodwell et al. 2009).

A manutenção da fluidez crítica depende de alguns fatores. A consistência das membranas altera com o comprimento e com o grau de insaturação das cadeias acílicas de seus fosfolipídeos. Além disso, a fluidez de membrana também é influenciada pela temperatura; como a temperatura corporal dos animais homeotermos é sempre maior que a temperatura de fusão de seus lipídeos de membrana, ela se mantém fluida à temperatura corporal (Marzzoco and Torres 1999).

O colesterol constitui um fator adicional de regulação da fluidez das membranas. Suas moléculas interpõem-se na bicamada lipídica, a hidroxila interagindo com os grupos polares dos fosfolipídios. Nesta posição, os anéis esteroidais rígidos interagem e parcialmente imobilizam as regiões das cadeias de hidrocarboneto mais próximas aos grupos das cabeças polares. Por meio da redução da mobilidade de alguns poucos primeiros grupos metilênicos das cadeias

de hidrocarboneto das moléculas de fosfolipídios, o colesterol torna a bicamada lipídica menos sujeita a deformações nesta região. Apesar de o colesterol apresentar a tendência de tornar a bicamada lipídica menos fluida, nas altas concentrações encontradas na maioria das membranas plasmáticas de eucariotos, também impede as cadeias de hidrocarboneto de se aproximarem e cristalizarem (Alberts, Johnson et al. 2002).

Diversas condições fisiológicas parecem estar relacionadas com alterações na estabilidade e funcionalidade das membranas. No alcoolismo crônico, por exemplo, há aumento no teor de colesterol de membrana das hemárias, levando a aumento na viscosidade da membrana. Estas células adquirem um formato anormal, dificultando sua passagem por capilares menores, o que leva a sua destruição prematuramente (Marzzoco and Torres 1999). O estresse oxidativo também tem efeitos danosos sobre as membranas. As espécies reativas de oxigênio (EROs), quando em excesso, ativam cascatas de lipoperoxidação nas membranas, provocando alterações em sua estabilidade e funcionalidade (Begum and Terao 2002).

Composição e estabilidade de eritrócitos

A membrana eritrocitária é uma das membranas mais conhecidas em termos de estrutura, função e genética. Como qualquer membrana plasmática, media transportes e, ainda, fornece ao eritrócito resistência e maleabilidade. Sua composição é semelhante à composição das membranas de outras células do organismo humano, sendo constituída essencialmente de lipídeos e proteínas estruturados no modelo de mosaico lipídico e fluídico proposto por Singer e Nicolson em 1972 (Singer and Nicolson 1972).

A bicamada fosfolipídica representa em torno de 50% da massa total da membrana eritrocitária e forma uma barreira entre os compartimentos intra e extracelular (Cooper, 1997). As trocas entre estes compartimentos são feitas através de bombas, canais de trocas de íons e transporte molecular como o da glicose (Wajcman et. al., 1984). Além disso, a deformabilidade e a interação da superfície da membrana com o meio intracelular garantem as funções de transporte de O₂ dos pulmões e remoção do CO₂ dos tecidos para os pulmões (Cooper and Ganem 1997).

As proteínas de membrana do eritrócito podem ser periféricas ou integrais. Essas proteínas estão associadas ao citoesqueleto, que é responsável pela forma bicôncava normal ou pelas formas anormais (em caso de defeitos genéticos) dos glóbulos vermelhos, e representam 60% da massa proteica de toda a membrana (Wajcman, Lantz et al. 1992).

As proteínas integrais atravessam a bicamada lipídica e interagem com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas. Fazem parte destas as proteínas de transporte, como a banda 3, denominada proteína transportadora de íons, e as glicoforinas A, B, C e D, que possuem receptores de membrana e抗ígenos que participam do reconhecimento célula-célula na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana (Orkin, Nathan et al. 2008).

A banda 3 ou *anion exchanger 1* (AE1), uma proteína transmenbranar multipassagem, é a mais abundante proteína integral da membrana do eritrócito e tem como principal função mediar a troca de cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-) através da membrana plasmática, assegurando a remoção de CO_2 dos tecidos para os pulmões (Alberts, Johnson et al. 2002). Ela regula, também, o metabolismo da glicose, mantém a forma do eritrócito e está envolvida na remoção da célula quando ela se torna senescente. Além disso, por interação com lipídeos e proteínas, a banda 3 multifuncional une o complexo multiprotéico do citoesqueleto e confere aos eritrócitos propriedades mecânicas e elásticas, regulando a viscosidade sanguínea (Murador and Deffune 2007).

As glicoforinas, em geral, têm três domínios: um externo, onde estão presentes oligossacarídeos, um segmento incluído no interior da bicamada e um segmento no interior do citoplasma. A sialoglicoproteína glicoforina A (GPA) é a segunda proteína integral mais abundante e tem um alto conteúdo de ácido siálico, contribuindo, assim, com a rede de cargas negativas na superfície da membrana do eritrócito, minimizando a interação célula-célula e prevenindo sua agregação. Já a glicoforina C (GPC), menor componente protéico da membrana eritrocitária, funciona como receptor para PfEBP-2 (baebl, EBA-140), constituindo um local de ligação para o *Plasmodium falciparum* (Murador and Deffune 2007).

Outras proteínas maiores têm sido descritas na membrana do eritrócito. São receptores enzimáticos ou hormonais, como o receptor de insulina e o transportador de glicose, o qual corresponde a uma proteína da banda 4.5. As proteínas

periféricas que formam o citoesqueleto compreendem principalmente a espectrina, a actina, a anquirina e a proteína 4.1(Murador and Deffune 2007).

A espectrina é a mais abundante proteína periférica do citoesqueleto. Ela serve de sustentação à membrana e é a proteína periférica responsável pelo fenômeno dos *ghosts* eritrocitários. A espectrina e polipeptídios associados são responsáveis pelo formato bicôncavo do glóbulo vermelho e pela sua deformabilidade, além de constituírem elementos estabilizadores da bicamada lipídica (Salmon, Cartron et al. 1984). Dímeros de espectrinas ligados entre si associam-se com outras proteínas (principalmente actina e 4.1R) formando um complexo de junção, que define a rede do citoesqueleto da membrana do eritrócito e é, ainda, responsável pela determinação de sua estabilidade diante mecanismos de estresse e pressão (Alberts, Johnson et al. 2002).

A anquirina é a maior ponte para o citoesqueleto espectrina-actina. Ela interage com a espectrina e com a banda 3 e tem um domínio regulador que controla a função daquelas proteínas.

A banda 4.1 é uma proteína do citoesqueleto com genética e localização típicas e diversas. Faz parte de uma família de proteínas definidas sobre a membrana do eritrócito como "organizadores" do sistema de aderência. Os mecanismos de adesão celular são importantes não só para o mecanismo em si, mas também para a manutenção da morfogênese do tecido. Na membrana do eritrócito, o maior ponto de ligação da banda 4.1 é com as glicoforinas C (GPC) e D (GPD) (Hemming, Anstee et al. 1995).

A banda 5 ou actina é o maior componente protéico do citoesqueleto da maioria das células eucariontes. É abundante e localiza-se logo abaixo da membrana citoplasmática. Forma o denominado complexo juncional, composto por 12 moléculas de actina associadas à banda 4.1, aducina e tropomiosina. Este complexo fortalece a ligação da actina com a espectrina. Existem dois tipos de actina, a actina G (globular) e actina F (funcional), sendo esta última a que se compacta para formar o complexo juncional (Mandal, Baudin-Creusa et al. 2003).

Análise da estabilidade de membrana de eritrócitos

Os eritrócitos são considerados bons modelos para estudo das membranas biológicas, pois não possuem núcleo ou organelas internas, podendo a membrana plasmática ser isolada sem contaminação de membranas internas (Alberts, Johnson

et al. 2002). Em relação à sua estabilidade, a hemólise provocada por qualquer fator de estresse, libera hemoglobina, que pode ser quantificada por leitura espectrofotométrica. Ademais, suas características físico-químicas refletem as características de outras células pós-mitóticas do organismo, constituindo uma alternativa minimamente invasiva ao doador para estudo das características dessas outras células (Cunha 2013).

A avaliação da estabilidade de membrana do eritrócito tem sido feita, em muitos estudos, por meio da fragilidade osmótica eritrocitária (FOE). Este método, além de ser bastante utilizado, tem baixo custo e elevada eficiência (Mascarenhas Netto 2009). A FOE pode ser definida como a resistência dos eritrócitos à hemólise contra soluções de 0 a 1,5 g/dL de NaCl em água destilada (Schalm and Jain 1986). As células, quando em meio hipotônico, aumentam até atingir um volume crítico de hemólise e, depois, são lisadas (Mascarenhas Netto 2009).

A FOE expressa a habilidade das membranas em manter sua integridade estrutural quando expostas ao estresse osmótico (Aldrich and Saunders 2001). Nesta técnica, faz-se um monitoramento da lise de eritrócitos mediante a leitura de absorbância da hemoglobina em um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 540 nm (Moeckel, Shadman et al. 2002).

A estabilidade osmótica de eritrócitos pode ser alterada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos, pode-se citar a forma e tamanho celular, volume, tipo e quantidade de hemoglobina, viscoelasticidade e composição química e estrutural das membranas (Perk, Frei et al. 1964). Os fatores extrínsecos compreendem variações fisiológicas, como pós-prandiais, e também variações patológicas, tais como presença de hematozoários, uremia, cirrose, processos autoimunes, hepatopatias e insuficiência renal (Makinde and Bobade 1994), dentre outras.

OBJETIVOS

Investigar a existência de relações entre estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos e variáveis de estresse oxidativo (FRAP, TBARS, CAT e SOD), inflamatórios (PCR, adiponectina, TNF- α e NaNO₂) e antropométricos (MC, IMC e CA) em adolescentes obesos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (Parecer 498/10) e todos os participantes e seus pais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Participantes

Adolescentes com idade entre 14 e 19 anos foram recrutados e passaram por triagem para determinar a elegibilidade ao estudo. Os critérios de inclusão foram: ter idade entre 15 e 19 anos, serem pós-púberes de acordo com a classificação de Tanner por estágios (Tanner and Whitehouse 1976) e apresentarem obesidade (IMC > percentil 95 da curva proposta pelo *Center of Diseases Control – CDC*). Foram critérios de exclusão: detecção de doenças genéticas, metabólicas ou endócrinas e uso prévio de drogas. As análises de correlação do presente trabalho foram feitas com 32 indivíduos.

Coleta de dados

O peso foi medido usando uma balança eletrônica, e a altura usando um estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado em quilogramas por metro quadrado. A circunferência abdominal (CA) foi avaliada utilizando-se o perímetro do abdômen ao nível do umbigo com fita antropométrica (SN-4010, Sanny, São José dos Campos, Brasil).

Para a avaliação bioquímica, as amostras de sangue foram obtidas por punção venosa após jejum noturno. O sangue foi coletado em tubos evacuados contendo K₃EDTA como anticoagulante.

A concentração plasmática de adiponectina foi medida utilizando kits de ensaio de imunoadsorção enzimática da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de proteína C reativa no soro foi realizada por imunoensaio turbidimétrico de partículas de poliestireno sensibilizadas da Aptec Diagnostics (Sint-Niklaas, Bélgica). O TNF- α plasmático foi medido por imunoensaio enzimático de alta sensibilidade (DRG Diagnostics, Marburg, Alemanha).

A concentração plasmática de nitrito foi determinada a partir de uma reação utilizando o método de Griess (Giustarini, Rossi et al. 2008). A atividade antioxidant total foi determinada utilizando-se o método redutor do ferro, no qual a redução do ferro de seu estado férrico (Fe^{3+}) a seu estado ferroso (Fe^{2+}) em pH baixo, forma o complexo ferro-tripiridiltriazina, de cor azul intensa (Benzie and Strain 1996). Os níveis da substância reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados no plasma sanguíneo. O método envolve a criação de complexo colorido entre produtos de peroxidação lipídica e ácido tiobarbitúrico a 95 °C e em ambiente ácido (Feldman 2004).

A atividade da catalase foi medida segundo a metodologia descrita por Aebi (Aebi and Bergmeyer 1974). A atividade da superóxido dismutase foi determinada utilizando o método de Misra e Fridovich (Misra and Fridovich 1972). O teor de proteína total das amostras foi determinado de acordo com o método de Bradford (Bradford 1976).

A determinação da estabilidade de membrana de eritrócitos foi feita por meio da fragilidade osmótica, com choque hipotônico. Em microtubos de polietileno (Eppendorff®) de 2 mL foram adicionados 1,0 mL de solução de NaCl em concentrações crescentes de 0,1 a 1,5 g.dL⁻¹. Os microtubos foram pré-incubados a 37 °C por 10 minutos e, depois, adicionou-se alíquotas de 10 µL de sangue em cada um deles. Após homogeneização, os tubos foram incubados por 30 minutos e depois centrifugados por 10 minutos a 1600 x g. As absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas em 540 nm (A_{540}) contra água (controle). Os experimentos foram conduzidos com cada tubo em duplicita.

As dependências de A_{540} com a concentração de NaCl foram ajustada a linhas de regressão sigmoidal de acordo com a equação de Boltzmann,

$$A_{540} = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + e^{(X - H_{50})/dX}} + A_{\max} \quad (1),$$

onde A_{\max} e A_{\min} representam os valores médios nos platôs máximo e mínimo da sigmóide, H_{50} é a concentração de NaCl que causa 50% de hemólise e dX representa $\frac{1}{4}$ da variação na concentração de NaCl responsável pela transição entre os eritrócitos íntegros (A_{\min}) e lisados (A_{\max}).

Um maior valor de dX significa uma maior estabilidade celular, pois é necessária uma maior variação na concentração de NaCl para que ocorra lise total. Por outro lado, um maior valor de H_{50} significa menor estabilidade de eritrócitos, pois

a lise ocorre a uma menor diluição da concentração salina isotônica em relação ao sangue humano.

Neste trabalho foram utilizadas as variáveis primárias H_0 e H_{100} , derivadas da curva de regressão de Boltzmann e determinadas de acordo com as seguintes equações:

$$H_0 = H_{50} + \frac{4dX}{2} \quad (2),$$

e

$$H_{100} = H_{50} - \frac{4dX}{2} \quad (3),$$

representando, respectivamente, as concentração salina no início e no término da transição de lise da população de eritrócitos. Essas variáveis preservam também a mesma relação inversa com a estabilidade de membrana apresentada por H_{50} .

Além daquelas variáveis primárias, a estabilidade de membrana foi também avaliada com a utilização dos índices dX/H_{50} e dX/A_{min} , que apresentam ambas relações diretas com a estabilidade de eritrócitos, uma vez que tanto H_{50} e A_{min} tem relações inversas com a estabilidade de membrana das células vermelhas do sangue.

Análise estatística

Inicialmente, a normalidade de cada variável foi testada com base no teste de Shapiro-Wilk. A pesquisa de correlação entre as variáveis de estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos e os parâmetros de estresse oxidativo, inflamatórios e antropométricos foi realizada pela análise de correlação de Pearson quando ambas variáveis apresentaram distribuição normal e pela análise de correlação de postos de Spearman quando uma ou ambas variáveis apresentaram distribuição não paramétrica. A força das correlações foi estimada pelos coeficientes r de Pearson ou σ de Spearman, tendo sido consideradas significantes correlações associadas a valores de $p \leq 0,05$. Os softwares utilizados em todas as análises de dados foram o *SPSS Statistics 22* (IBM, Chicago, IL, EUA) e o *Origin 8.0* (Microcal, Northampton, Massachusetts, USA).

RESULTADOS

As características de base dos participantes deste estudo estão mostradas na Tabela 1. Os resultados das análises de correlação entre a estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos e parâmetros de estresse oxidativo (FRAP, TBARS, CAT, SOD e NaNO₂), inflamatórios (PCR, adiponectina e TNF- α) e antropométricos (MC, IMC e CA) estão apresentados na Tabela 2. As correlações entre todas as variáveis estudadas foram também apresentadas (Tabela 3).

Correlações significativas foram encontradas entre parâmetros de composição corporal (MC, IMC e CA) e variáveis de estabilidade de membrana H₀, H₅₀ e H₁₀₀ (Figura 3).

Foi encontrada, também, correlação significativa da SOD com a variável dX/H₅₀ (Figura 4A) e de NaNO₂ com a variável dX/A_{min} (Figura 4B). Não foram encontradas relações entre estabilidade de membrana e os parâmetros de estresse oxidativo FRAP, TBARS e CAT, nem entre estabilidade de membrana e os parâmetros inflamatórios PCR, adiponectina e TNF- α .

DISCUSSÃO

A estabilidade de eritrócitos é uma função inversa a sua fragilidade osmótica, que pode ser medida pelo teste de fragilidade osmótica eritrocitária (FOE). Por isso, o teste da FOE fornece referências para aferição da estabilidade das células: as variáveis dX , H_0 , H_{50} , H_{100} , A_{max} e A_{min} , que permitem a geração de índices, como dX/H_{50} e dX/A_{min} (Figura 2).

A variável dX representa a variação na concentração salina necessária para levar os eritrócitos íntegros (A_{min}) à lise completa (A_{max}). Maiores valores de dX expressam maior estabilidade dos eritrócitos, já que maiores variações na concentração salina são necessárias para promoção da lise de todo o universo de eritrócitos.

Em contrapartida, as variáveis H_0 , H_{50} e H_{100} expressam as concentrações salinas no ponto inicial, intermediário e final da lise da população de eritrócitos, respectivamente. Maiores valores de H_0 , H_{50} e H_{100} expressam menor estabilidade de eritrócitos, uma vez que menores diluições da concentração salina são exigidas para iniciar (H_0) e para atingir a lise de metade (H_{50}) e de toda (H_{100}) a população de eritrócitos, respectivamente.

Como dX e H_{50} apresentam relações direta e inversa, respectivamente, com a estabilidade de eritrócitos, a razão dX/H_{50} é diretamente proporcional a essa propriedade das células vermelhas do sangue. Do mesmo modo, a razão dX/A_{min} também apresenta uma relação direta com a estabilidade de eritrócitos.

O conhecimento das relações existentes entre esses parâmetros (dX , H_0 , H_{50} , e H_{100}) e índices de estabilidade (dX/H_{50} e dX/A_{min}) e as diversas variáveis antropométricas, inflamatórias e de estresse oxidativo deve permitir uma melhor percepção da complexa rede de fatores que influenciam a estabilidade de eritrócitos.

A MC, o IMC e a CA apresentaram correlações positivas com H_0 , H_{50} e H_{100} , o que significa que um aumento nessas variáveis de composição corporal está relacionado a uma diminuição na estabilidade da membrana (Tabela 2 e Figuras 3). Este fato pode estar ligado aos teores de colesterol total (t-C), HDL-colesterol (HDL-C), LDL-colesterol (LDL-C), VLDL-colesterol (VLDL-C) e triglicérides (TGC).

Sabe-se que existe um determinado conteúdo de colesterol na membrana que está associado com uma fluidez de membrana ideal, podendo qualquer fuga

dessa faixa crítica de concentração prejudicar as propriedades biológicas não só da membrana, como da própria célula. O núcleo esteroidal rígido do colesterol colabora para a diminuição da liberdade de movimentação de moléculas constituintes da membrana, levando ao aumento da sua rigidez (Raffy and Teissie 1999, Orkin, Nathan et al. 2008, Murray, Rodwell et al. 2009). Nesse sentido, níveis muito baixos de colesterol diminuem a estabilidade e aumentam excessivamente a fluidez de membrana, favorecendo sua fusão. Por outro lado, embora a estabilidade aumente com o aumento no teor de colesterol, um aumento excessivo diminui excessivamente a fluidez da membrana, o que também compromete suas funções (Figura 1).

Variações no teor de colesterol podem alterar a permeabilidade, a deformabilidade (Bretscher and Munro 1993) e a estrutura da membrana da célula e de organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi, bem como a eficácia de processos como a vesiculação de membranas (Lemmich, Mortensen et al. 1997).

No que tange especificamente dos eritrócitos, estes são células bastante sensíveis a modificações na concentração de colesterol do meio extracelular (Cooper, Arner et al. 1975, Schick and Schick 1985). O nível de colesterol na membrana do eritrócito é resultado da concentração de colesterol nas lipoproteínas plasmáticas, já que essa célula obtém colesterol principalmente a partir da interação com a LDL (Low Density Lipoprotein) (Roduit, van der Goot et al. 2008). Muitos estudos em pacientes com hipercolesterolemia familiar indicaram que eles possuem conteúdo de colesterol elevado nas membranas de eritrócitos (Vayá, Martínez et al. 1993, Martinez, Vayá et al. 1998, Michalska-Malecka, Slowinska et al. 2008, Spengler, Bertoluzzo et al. 2008).

A estabilidade de membrana de eritrócitos está correlacionada com t-C, LDL-C, VLDL-C e TGC, sendo a sensibilidade mais significante ao LDL-C (Bernardino Neto 2011). Uma vez que a lipoproteína de baixa densidade intercambia colesterol com a membrana dos eritrócitos (Nikolić, Stanić et al. 2007), ela afeta a reologia do fluido sanguíneo e, consequentemente, predispõe a doenças vasculares degenerativas. Estudos já comprovaram que o risco de aterosclerose é mais estreitamente ligado aos níveis de LDL-C que aos níveis de t-C (Hoefner, Hodel et al. 2001, Okada, Matsuto et al. 2004). Assim, a LDL-C associa a estabilidade de eritrócitos ao risco de doenças vasculares degenerativas, sugerindo que a medida

da estabilidade de eritrócitos pelo método da FOE possa fornecer uma estimativa indireta desse risco (Bernardino Neto 2011).

No presente trabalho encontrou-se correlação negativa de t-C e LDL-C com a variável dX/A_{min} (Tabela 2), confirmando a sensibilidade dos eritrócitos à concentração de colesterol no meio extracelular. As demais variáveis de estabilidade de membrana de eritrócitos (dX , H_0 , H_{50} , H_{100}) e o índice dX/H_{50} não apresentaram correlação com t-C, HDL-C, LDL-C, VLDL-C e TGC. Isto pode ter ocorrido devido ao pequeno tamanho da população deste estudo e/ou à utilização de correlação linear simples para analisar inter-relações não-lineares de grande complexidade, que seriam melhor entendidas em uma perspectiva multivariada. Um estudo bivariado pode mascarar correlações importantes em decorrência da influência de outras variáveis, envolvidas ou não no estudo (Bernardino Neto 2011, de Arvelos 2014).

As correlações positivas observadas entre as variáveis antropométricas MC, IMC e CA e as variáveis de estabilidade de membrana H_0 , H_{50} e H_{100} podem, também, ter tido influência da glicose sanguínea. De fato, um aumento nos níveis sanguíneos de glicose foi associado à diminuição na estabilidade de membrana de eritrócitos (de Arvelos 2014). Este fato pode estar relacionado à glicação de proteínas da membrana, que alteram a estrutura e a função de moléculas biológicas que desempenham papéis essenciais na manutenção da organização estrutural do sistema anfifílico membranar (Shin, Ku et al. 2008).

Embora neste trabalho não se tenha encontrado correlações diretas entre glicose sanguínea ou hemoglobina glicada com as variáveis de estabilidade de membrana, foi encontrada uma correlação positiva entre hemoglobina glicada e massa corporal, variável antropométrica que também foi inversamente associada à estabilidade de membrana. Portanto, o aumento na massa corporal está associado não só à diminuição na estabilidade de membrana, mas, também, a aumento na hemoglobina glicada (Tabela 3).

Neste estudo, também foi encontrada uma correlação positiva entre hemoglobina glicada e RDW (Tabela 3). Apesar da relação não estar totalmente esclarecida, ela é muito importante e merece destaque, pois valores aumentados de RDW têm sido relacionados a várias situações que causam comprometimento de saúde (Hunziker, Celi et al. 2012). Estas situações incluem doenças cardiovasculares (Cavusoglu, Chopra et al. 2010, Ephrem 2013), diabetes (Malandrino, Wu et al. 2012) e envelhecimento (Patel, Semba et al. 2009).

Em relação ao estresse oxidativo, viu-se que a superóxido dismutase (SOD) teve correlação positiva com a variável dX/H₅₀ (Figura 4A), ou seja, um aumento na atividade de SOD está relacionado a um aumento na estabilidade de membrana. Esse achado parece coerente, uma vez que a SOD representa a principal defesa celular contra os radicais superóxido (Liu, Qi et al. 2013).

Neste sentido, a deficiência de SOD tem consequências significativas, especialmente para os glóbulos vermelhos. Estudos anteriores revelaram alterações nos parâmetros hematológicos de camundongos SOD1^{-/-}, incluindo uma menor contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina, com concomitante aumento no volume médio de eritrócitos (Starzyński, Lipiński et al. 2005). Sabe-se que há uma ligação causal direta entre a estabilidade de membrana de eritrócitos e os valores do hematócrito (Bernardino Neto 2011, de Arvelos 2014). É também conhecido que a estabilidade dos glóbulos vermelhos é muito sensível ao volume celular e se relaciona inversamente com ele (Bernardino Neto 2011, de Arvelos 2014). Os eritrócitos mais volumosos são menos estáveis, enquanto os menos volumosos, que têm seus lipídios de membrana organizados com mais aproximação e intensificação das forças atrativas moleculares de van-der-Waals, são mais estáveis (Penha-Silva, Arvelos et al. 2008, Cunha 2013). Neste trabalho encontrou-se uma correlação negativa entre hematócrito e as variáveis dX e dX/H₅₀ (Tabela 3). Entretanto, contrariamente aos estudos supracitados, aqui não se encontrou correlação entre o volume corpuscular médio (VCM) e as variáveis de estabilidade de membrana (Tabela 3). A ausência de correlação entre VCM e estabilidade osmótica de membrana pode, também, ter ocorrido em consequência do pequeno tamanho da amostra deste estudo ou da utilização de correlação linear simples, que pode mascarar correlações efetivas em consequência da influência de outras variáveis (Bernardino Neto 2011, de Arvelos 2014).

Iuchi, Okada et al. (2007) mostraram aumento na susceptibilidade à oxidação, nos níveis de espécies reativas de oxigênio e de produtos de peroxidação lipídica, associado a diminuição na atividade de glutationa peroxidase e no tempo de vida de eritrócitos, bem como ocorrência de esplenomegalia em camundongos SOD1^{-/-}. Em concordância com Iuchi, Okada et al. (2007), Grzelak, Kruszewski et al. (2008) encontraram que eritrócitos de camundongos SOD1^{-/-} têm aumento no nível de superóxido, acompanhado por aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de corpos de Heinz, que são produtos da desnaturação oxidativa

da hemoglobina. Além disso, esses autores também encontraram uma diminuição no tempo de vida de eritrócitos desses camundongos SOD1^{-/-} com simultâneo aumento no teor de reticulócitos, aparentemente liberados em quantidades maiores na circulação para compensar a perda de eritrócitos, além de ocorrência de esplenomegalia, resultante da destruição acelerada de eritrócitos (Grzelak, Kruszewski et al. 2008).

Iuchi, Okada et al. (2007) demonstraram, também, aumento na ligação de IgG autóloga aos eritrócitos de camundongos com deficiência de SOD, o que justificaria a aceleração de sua eliminação (Zupkó, Hohmann et al. 2001, Lutz 2004). Grzelak, Kruszewski et al. (2008) encontraram aumento na atividade de acetilcolinesterase (AC^{ase}) nos eritrócitos de camundongos SOD1^{-/-}. Sabe-se que a atividade da AC^{ase} diminui com o envelhecimento do eritrócito e, por isso, a determinação da AC^{ase} foi sugerido como marcador da idade da célula vermelha (Bartosz 1991, Prall, Gambhir et al. 1998). A atividade elevada desta enzima nos eritrócitos de camundongos com deficiência de SOD seria decorrente da remoção acelerada, com aumento na proporção de células jovens na população de eritrócitos (Grzelak, Kruszewski et al. 2008).

O aumento na atividade da SOD tem efeito protetor contra o dano oxidativo mediado pela obesidade, reduzindo, inclusive, o risco de desenvolvimento de resistência à insulina (Liu, Qi et al. 2013). De fato, indivíduos com deficiência na regulação da glicose (glicemia de jejum prejudicada e tolerância diminuída à glicose) e com diabetes têm redução na atividade da SOD de eritrócitos quando comparados com indivíduos com tolerância normal à glicose (Song, Jia et al. 2007). Além disso, há correlação negativa entre a atividade de SOD e a resistência à insulina (Park, Gross et al. 2009). No entanto, neste estudo não foram encontradas correlações entre atividade de SOD e níveis de glicose ou hemoglobina glicada (Tabela 3). Uma possível explicação para a ausência de correlação entre estas variáveis pode estar no fato de os participantes deste estudo ainda serem adolescentes. Esta é uma questão que carece ser melhor estudada, pois a atividade antioxidante da SOD de eritrócitos foi aprimorada em jovens obesos, mas reduzida em homens obesos mais velhos (Karaouzene, Merzouk et al. 2011).

Encontrou-se, também, correlação positiva entre NaNO₂ e a variável dX/A_{min} (Figura 4B). O NO₂ e NO₃ são produtos da reação do óxido nítrico (NO) com o oxigênio e a dosagem de NaNO₂ é, portanto, um marcador da formação de NO. O

NO apresenta um comportamento dúbio, podendo ser benéfico ou tóxico, dependendo da concentração ou depuração tecidual. Ele está envolvido no relaxamento vascular, tendo um papel de ampla importância na proteção dos vasos sanguíneos. Constitui, também, um relevante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de aniquilar patógenos e células tumorais. Possui, ainda, uma função moduladora em vários processos biológicos essenciais. A potencial toxicidade ocorre em circunstâncias de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (Dusse, Vieira et al. 2003).

A correlação encontrada significa que o aumento do NaNO₂ está relacionado ao aumento na estabilidade de membrana, o que é coerente, pois o NO produzido pela NO-sintase endotelial (e-NOS) tem um papel antioxidant. Ele impulsiona a produção da enzima SOD na parede no vaso, minimizando o O₂^{•-} disponível e, consequentemente, a formação de ONOO⁻. Além disso, o NO também leva a síntese de ferritina, que se liga a íons ferro livres e previne a geração de O₂^{•-} (Wolin 2000).

Ademais, sabe-se que, além de os eritrócitos transportarem NO (Pawloski, Swaminathan et al. 1998), eles contêm óxido nítrico sintase (NOS), podendo sintetizar NO (Kleinbongard, Schulz et al. 2006). A NOS intraeritrocitária aparenta ser uma fonte importante de NO na circulação e é possível que esse NO esteja envolvido na regulação da função plaquetária e do fluxo sanguíneo (Chen and Mehta 1998, Özüyaman, Grau et al. 2008). Porém, um fato ainda mais interessante é que o NO produzido pelos eritrócitos atua autocrinamente, de maneira a influenciar a estabilidade de membrana. A ação autócrina do NO do eritrócito modifica as características funcionais de sua membrana plasmática, assim como sua deformabilidade, o que permite a passagem dos eritrócitos pelo interior dos capilares. Estudos onde glóbulos vermelhos humanos foram incubados com substâncias formadoras de NO demonstraram que elas são capazes de aumentar a fluidez de membrana e a deformabilidade de eritrócitos (Tsuda, Kimura et al. 2000, Bor-Kucukatay, Wenby et al. 2003). Viu-se, ainda, que a incubação de eritrócitos com inibidores da NOS diminui a deformabilidade dessas células (De Lorgeril, Salen et al. 1997, Tsuda, Kimura et al. 2000, Bor-Kucukatay, Wenby et al. 2003, Kleinbongard, Schulz et al. 2006). Estes achados também apoiam a correlação positiva entre NaNO₂ e a variável dX/A_{min} encontrada.

CONCLUSÃO

As análises de correlação na população de adolescentes obesos aqui estudada mostraram que a estabilidade osmótica de eritrócitos 1) diminuiu com aumento nas variáveis antropométricas MC, IMC e CA, e 2) aumentou com aumento nos níveis sanguíneos de SOD e de NaNO₂, mas 3) não apresentaram relação com as variáveis inflamatórias.

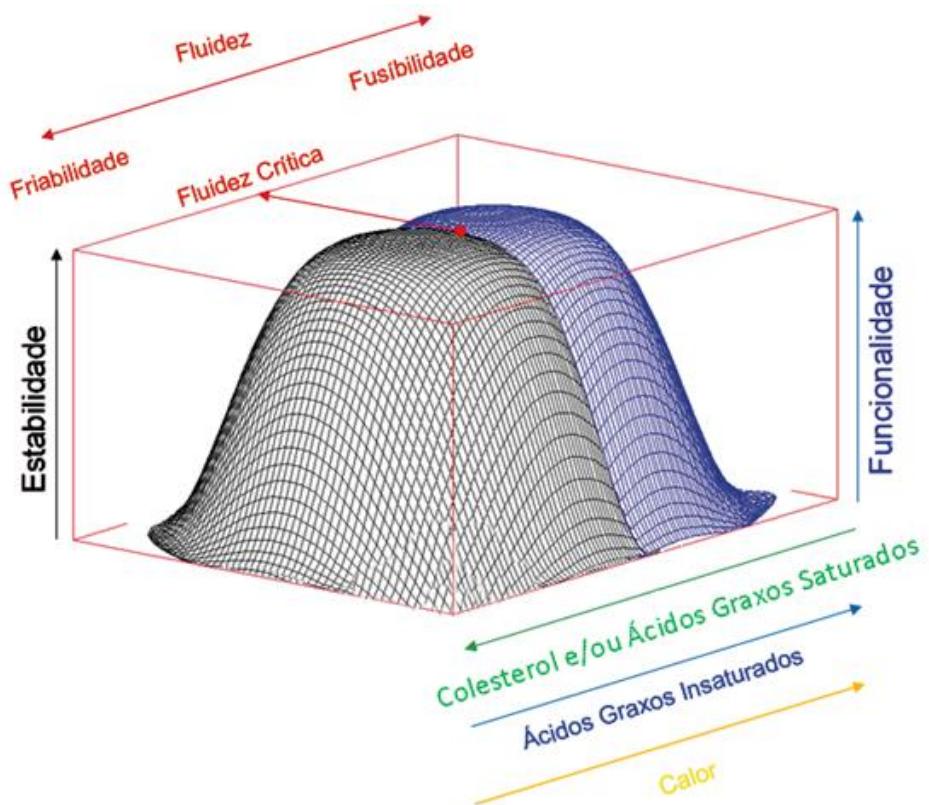


Figura 1. Influência da composição lipídica e do calor sobre a estabilidade e a funcionalidade de uma membrana biológica. Uma fluidez excessiva promove fusão da membrana. Por outro lado, uma diminuição excessiva da fluidez torna a membrana sólida e friável (Bernardino Neto 2011).

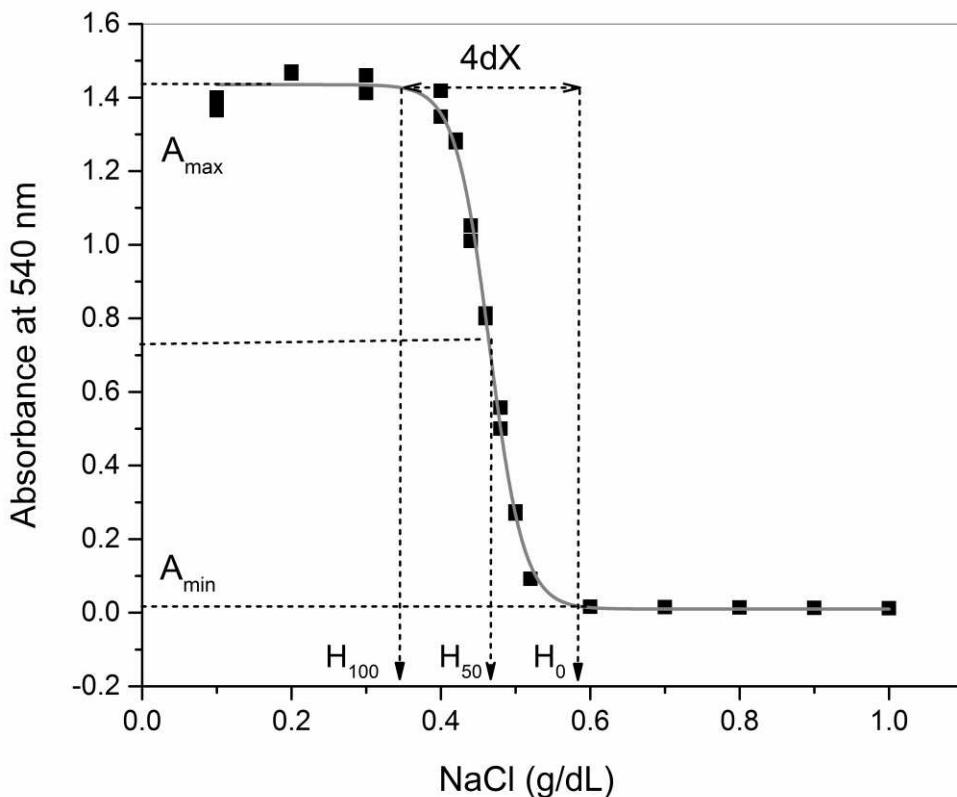


Figura 2. Curva típica de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos. A_{\max} representa a absorvância média máxima associada à hemólise total; A_{\min} representa a absorvância média mínima associada à hemólise basal; H_0 representa a concentração de NaCl em que há início da hemólise; H_{50} representa a concentração de NaCl necessária para promover lise de 50% da população de eritrócitos; H_{100} representa a concentração de NaCl em que a hemólise se torna máxima; e dX representa a variação na concentração de NaCl necessária para levar os eritrócitos do estado íntegro (A_{\min}) ao estado lisado (A_{\max}).

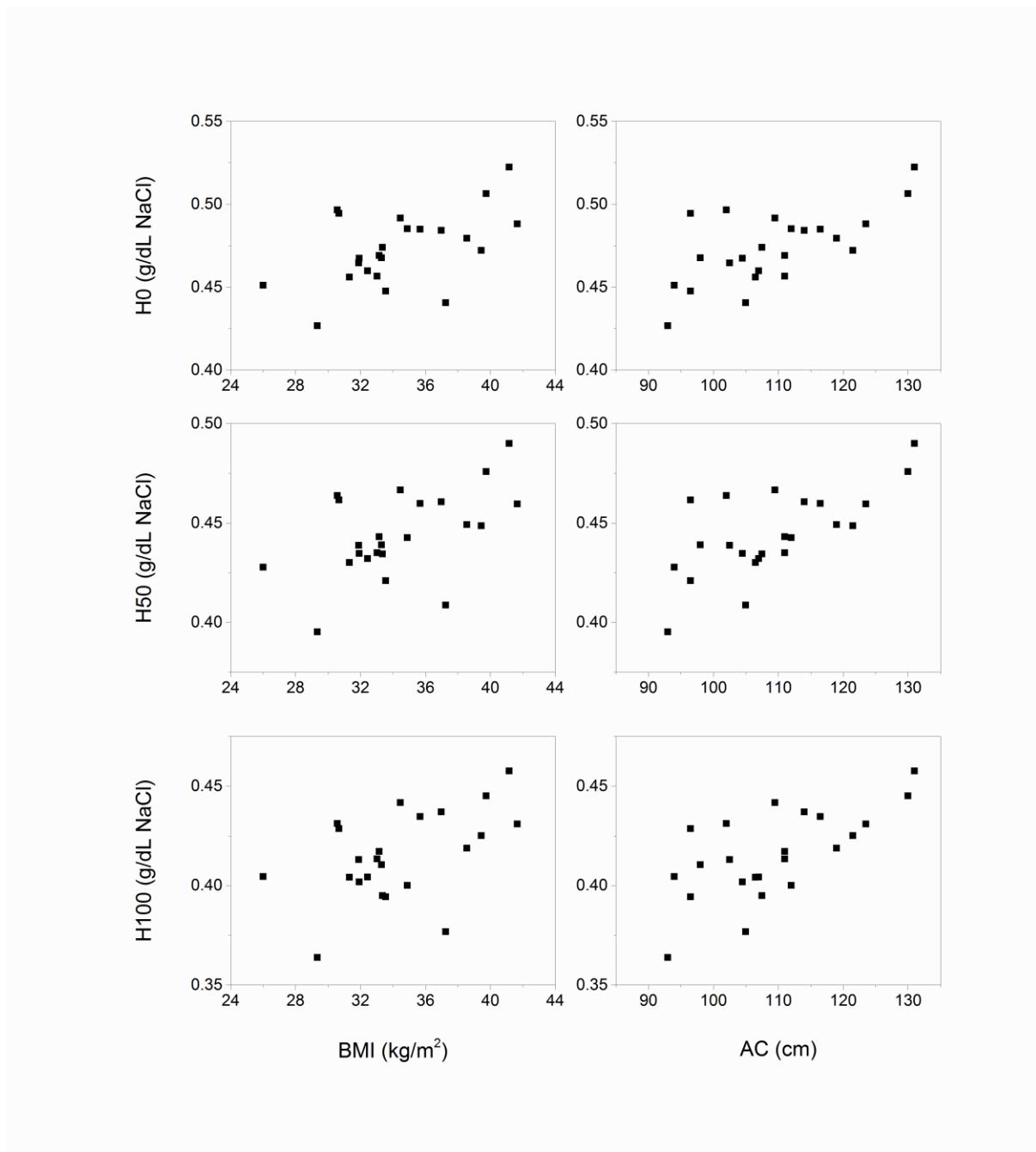


Figura 3. Relação dos parâmetros de fragilidade eritrocitária H0, H50 e H100 com o índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal (CA) de adolescentes obesos.

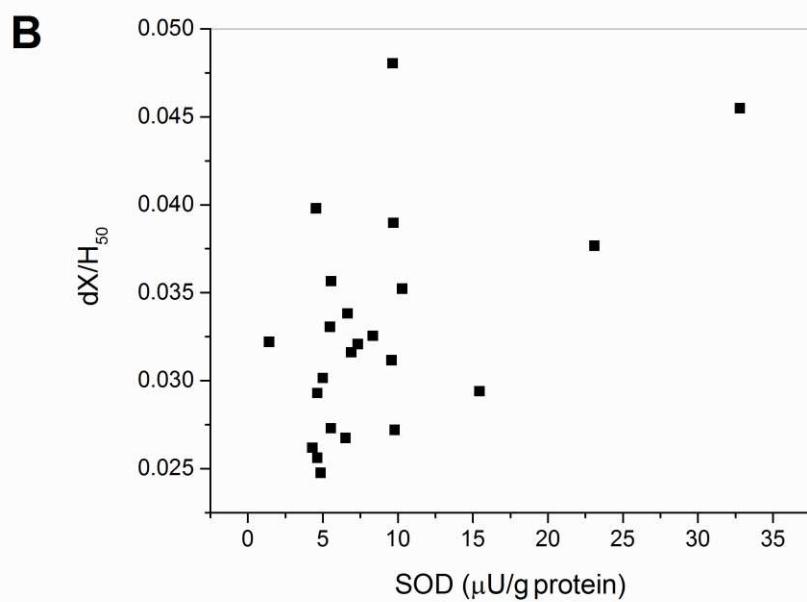
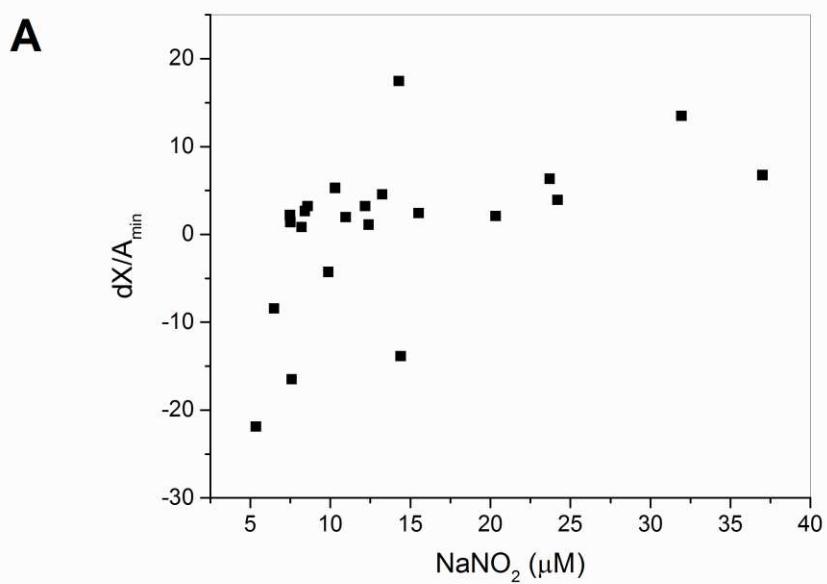


Figura 4. A) Relação do índice de estabilidade eritrocitária dX/H_{50} com os níveis sanguíneos da atividade da superóxido dismutase (SOD) em adolescentes obesos. B) Relação do índice de estabilidade eritrocitária dX/A_{\min} com os níveis sanguíneos de $NaNO_2$ em adolescentes obesos.

Tabela 1. Características de base dos participantes deste estudo

Variável	Média ± DP	Mediana (IQR)
A _{min} (abs)	0.0030 ± 0.0045	0.0025 (0.0062)
A _{max} (abs)	1.32 ± 0.12	1.31 (0.18)
H ₀ (g/dL NaCl)	0.48 ± 0.2	0.47 (0.03)
H ₅₀ (g/dL NaCl)	0.44 ± 0.02	0.44 (0.03)
H ₁₀₀ (g/dL NaCl)	0.41 ± 0.02	0.42 (0.03)
dX (g/dL NaCl)	0.016 ± 0.0035	0.015 (0.0043)
dX/A _{min} (g/dL NaCl)	1.81 ± 33.71	2.32 (9.05)
dX/H ₅₀	0.035 ± 0.084	0.033 (0.010)
Massa Corporal, MC (kg)	96.82 ± 16.26	93.5 (22)
Índice de Massa Corporal, IMC (kg/m ²)	34.41 ± 3.9	33.35 (5.36)
Circunferência Abdominal, CA (cm)	107.5 ± 10.47	107.5 (14)
Fator de Necrose Tumoral α, TNF-α (ng/mL)	0.027 ± 0.037	0.012 (0.037)
Nitrito de Sódio, NaNO ₂ (μM)	13.47 ± 8.06	10.3 (6.07)
Proteína C Reativa, PCR (mg/dL)	1.07 ± 0.76	0.65 (1.2)
Adiponectina, Adpn (nm/mL)	45.31 ± 36.64	33.74 (45.82)
Potencial Antioxidante Redutor do Íon Ferro, FRAP (mM Eq/L)	579.27 ± 149.71	526.34 (151.64)
Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, TBARS (nmol/mg protein)	3.66 ± 5.57	0.96 (3.41)
Catalase, CAT (delta E/min/mg protein)	4.45 ± 4.39	3.35 (3.1)
Superóxido Dismutase, SOD (U/μg prot)	8.66 ± 6.6	6.64 (4.65)

Tabela 2. Correlações entre variáveis de estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos e parâmetros de estresse oxidativo, inflamatórios e antropométricos

Variável	MC	IMC	CA	TNF-α	NaNO ₂	PCR	ADIP	FRAP	TBARS	CAT	SOD
A _{máx}	0.052	0.066	0.189	-0.207	0.137	-0.250	0.060	0.196	-0.079	0.047	-0.213
A _{min}	-0.372	-0.361	-0.273	0.037	0.027	-0.132	0.216	0.329	-0.025	-0.046	0.090
H ₅₀	0.538[§]	0.531[§]	0.686[§]	-0.070	0.039	0.060	-0.081	-0.012	-0.315	0.169	-0.285
dX	-0.106	0.058	0.003	0.201	0.154	0.018	-0.035	-0.309	0.189	0.384	0.386
dX/A _{min}	-0.146	-0.120	-0.058	0.067	0.557[§]	-0.118	-0.190	0.064	0.016	-0.097	0.098
dX/H ₅₀	-0.241	-0.080	-0.180	0.194	0.120	0.025	-0.058	-0.342	0.224	0.297	0.426[*]
H ₀	0.479[*]	0.529[§]	0.668[§]	0.005	0.111	0.117	-0.042	-0.077	-0.199	0.305	-0.110
H ₁₀₀	0.525[*]	0.503[*]	0.667[§]	-0.109	0.006	0.032	-0.105	0.090	-0.376	0.024	-0.392

* p < 0.10 indicando correlação estatisticamente significante.

§ p < 0.05 indicando correlação estatisticamente significante.

Tabela 3. Matriz de correlações simples entre todas as variáveis mensuradas nos voluntários

Variável	A _{máx}	A _{min}	H ₅₀	dX	dX/A _{min}	dX/H ₅₀	H ₀	H ₁₀₀	MC	IMC	CA	TNF-α	NaNO ₂	PCR	ADIP	FRAP	TBARS	CAT	SOD	Glu	HbA1c	t-C	TGC	HDL-C	VLDL-C	LDL-C	RBC	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	RDW																							
A _{máx}	1.00																																																							
A _{min}		0.50 [§]	1.00																																																					
H ₅₀			0.15	-0.35 [*]	1.00																																																			
dX				-0.44 [*]	-0.21	0.01	1.00																																																	
dX/A _{min}					0.11	0.23	-0.16	0.21	1.00																																															
dX/H ₅₀						-0.45 [*]	-0.13	-0.20	0.97 [§]	0.22	1.00																																													
H ₀							0.02	-0.41 [*]	0.95 [§]	0.30	-0.09	0.09	1.00																																											
H ₁₀₀								0.27	-0.27	0.96 [§]	-0.26	-0.18	-0.46 [§]	0.82 [§]	1.00																																									
MC									0.05	-0.37	0.54 [§]	-0.11	-0.15	-0.24	0.48 [*]	0.52 [§]	1.00																																							
IMC										0.07	-0.36	0.53 [§]	0.02	-0.12	-0.09	0.53 [§]	0.50 [§]	0.73 [§]	1.00																																					
CA											0.19	-0.27	0.69 [§]	-0.08	-0.10	-0.25	0.67 [§]	0.66 [§]	0.86 [§]	0.88 [§]	1.00																																			
TNF-α												-0.21	0.04	-0.07	0.20	0.07	0.19	0.01	-0.11	-0.47 [*]	-0.36	-0.46 [*]	1.00																																	
NaNO ₂													0.14	0.03	0.04	0.15	0.56 [§]	0.12	0.11	0.01	-0.01	-0.06	0.02	-0.09	1.00																															
PCR														-0.25	-0.13	0.06	0.02	-0.12	0.03	0.12	0.03	0.12	0.36	0.26	-0.17	0.12	1.00																													
ADIP															0.06	0.22	-0.08	-0.04	-0.19	-0.06	-0.04	-0.11	0.17	0.18	0.20	-0.02	-0.23	-0.11	1.00																											
FRAP																0.20	0.33	-0.01	-0.31	0.06	0.32	0.02	0.21	0.04	0.17	0.17	-0.25	1.00																												
TBARS																	-0.08	-0.02	-0.32	0.19	0.02	0.22	-0.38	-0.15	0.25	-0.02	0.14	-0.06	0.27	0.14	-0.09	1.00																								
CAT																	0.05	-0.05	0.17	0.38	-0.10	0.30	0.31	0.02	0.07	0.13	0.08	0.04	-0.04	-0.33	0.22	-0.30	0.25	1.00																						
SOD																		-0.21	0.09	-0.28	0.39	0.10	0.43 [*]	-0.11	-0.39	-0.44 [*]	-0.27	-0.39	0.53 [§]	-0.15	-0.06	-0.31	0.02	0.35	0.18	1.00																				
Glu																		0.05	0.34	0.02	-0.08	0.16	-0.02	0.07	-0.04	-0.12	-0.27	-0.17	0.15	-0.36	-0.19	0.34	0.04	-0.16	0.16	0.13	1.00																			
HbA1c																			-0.22	-0.01	-0.14	0.00	-0.10	0.07	-0.12	-0.17	0.50 [*]	0.15	0.17	-0.23	-0.10	0.03	0.10	0.04	-0.30	-0.07	-0.14	0.35	1.00																	
t-C																			-0.18	-0.10	-0.01	0.04	-0.43 [*]	0.03	0.02	-0.03	-0.10	-0.02	-0.13	0.33	-0.08	0.04	0.01	0.11	0.50 [*]	0.05	0.15	-0.15	0.03	1.00																
TGC																			0.08	-0.01	0.12	-0.12	0.00	-0.17	0.07	0.15	0.21	0.23	0.14	-0.25	0.54 [*]	0.26	-0.45	0.31	0.06	-0.04	-0.16	-0.30	0.03	0.54 [§]	1.00															
HDL-C																				-0.36	-0.21	0.16	0.33	-0.29	0.30	0.21	0.10	-0.41	-0.14	-0.35	0.29	-0.44	0.26	0.01	-0.51 [*]	0.28	0.38	0.28	0.11	-0.34	0.35	-0.13	1.00													
VLDL-C																				0.01	-0.06	0.18	-0.07	-0.16	-0.12	0.17	0.22	0.21	0.24	0.15	-0.19	0.49 [*]	0.29	-0.33	0.31	0.12	-0.03	-0.17	-0.29	-0.01	0.58 [§]	1.00 [§]	-0.04	1.00												
LDL-C																					-0.09	0.01	-0.07	0.00	-0.44 [*]	0.02	-0.07	-0.06	-0.01	-0.03	-0.11	0.41	-0.30	-0.17	0.25	0.14	0.36	-0.03	0.13	-0.05	0.08	0.91 [§]	0.29	0.20	0.34	1.00										
RBC																						0.40 [*]	0.11	-0.09	-0.31	-0.05	-0.30	-0.15	-0.03	0.22	-0.01	0.21	-0.23	0.32	-0.36	-0.25	0.38	-0.13	-0.15	-0.06	-0.22	0.34	-0.07	0.32	-0.63 [§]	0.24	0.05	1.00								
Hb																							0.88 [§]	0.25	0.12	-0.51 [§]	-0.08	-0.51 [§]	-0.05	0.27	0.15	-0.08	0.14	-0.36	0.31	-0.28	-0.04	0.38	-0.20	-0.05	-0.28	-0.12	-0.04	-0.18	0.22	-0.44 [*]	0.11	-0.09	0.65 [§]	1.00						
Ht																							0.78 [§]	0.22	0.25	-0.41 [*]	-0.05	-0.47 [*]	0.10	0.37	0.13	-0.09	0.12	-0.06	0.15	-0.46 [*]	0.10	0.21	-0.17	0.10	-0.26	0.11	0.00	-0.20	0.00	-0.27	-0.08	-0.10	0.52 [§]	0.85 [§]	1.00					
VCM																							0.27	0.02	0.30	-0.08	0.00	-0.12	0.22	0.36	-0.14	0.05	0.04	0.09	-0.09	0.12	0.32	-0.05	-0.11	0.05	-0.33	0.16	-0.53 [§]	-0.08	-0.09	0.46 [*]	-0.12	-0.14	-0.69 [§]	0.07	0.16	1.00				
HCM																							0.24	0.13	0.21	-0.05	0.03	-0.06	0.12	0.25	-0.33	-0.03	-0.06	0.19	-0.06	0.00	0.22	-0.10	0.03	0.15	-0.25	-0.08	-0.60 [§]	0.03	-0.05	0.43 [*]	-0.13	-0.01	0.07	0.96 [§]	1.00					
CHCM																							0.51 [§]	0.39 [*]	-0.10	0.17	0.07	-0.16	-0.20	0.00	-0.68 [§]	-0.52 [*]	-0.62 [§]	0.28	0.01	-0.16	-0.01	-0.08	0.26	0.20	0.00	0.09	-0.52 [§]	-0.05	-0.09	0.16	-0.13	-0.09	-0.30	0.33	0.31	0.58 [§]	0.58 [§]	1.00		
RDW																							-0.14	-0.06	-0.15	0.06	0.20	0.10	-0.06	-0.15	0.44 [*]	0.13	0.24	-0.14	0.06	-0.12	-0.01	0.16	-0.12	-0.24	-0.07	0.22	0.71 [§]	-0.13	-0.05	-0.62 [§]	-0.05	0.05	0.52 [§]	0.06	-0.02	0.71 [§]	-0.74 [§]	-0.48 [§]	1.00	

* p < 0.10 indicando correlação estatisticamente significante.

§ p < 0.05 indicando correlação estatisticamente significante.

REFERÊNCIAS

- (2004). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation. . Geneva, World Health Organization (WHO).
- (2010). Pesquisa de Orçamentos Familiares Familiares 2008-2009: despesas, rendimentos e condições de vida. Rio de Janeiro, IBGE.
- (2015). Obesity and overweight. Fact sheet No. 311. Updated January 2015, World Health Organization.
- (2016). Report of the commission on ending childhood obesity. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- Aebi, H. i. and H. Bergmeyer (1974). "Methods of enzymatic analysis." Academic Press, New York 2.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2002). Membrane Structure. Molecular Biology of the Cell New York, Garland Science.
- Aldrich, K. and D. K. Saunders (2001). "Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures." J Therm Biol **26**(3): 179-182. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(00\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(00)00040-1)
- Alves, M., J. Alves, L. Pereira, E. Wartha, A. Guimarães and R. Boaventura (2011). "Avaliação do estresse oxidativo em indivíduos obesos no pré-operatório de cirurgia bariátrica." Arq Bras Cir Dig **24**(sSuppl 1).
- Andrade-Wartha, E. (2007). Capacidade antioxidante in vitro do pedúnculo de caju (Anacardium Occidentale L.) e efeito sobre as enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal, Universidade de São Paulo.
- Bar-Or, O. (2003). "A epidemia de obesidade juvenil: a atividade física é relevante." Gatorade Sports Science Institute **38**.
- Barbosa, K. B. F., N. M. B. Costa, R. d. C. G. Alfenas, S. O. De Paula, V. P. R. Minim and J. Bressan (2010). "Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios." Revista de Nutrição. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Bartosz, G. (1991). "Erythrocyte aging: physical and chemical membrane changes." Gerontology **37**(1-3): 33-67. <https://doi.org/10.1159/000213251>

Begum, A. N. and J. Terao (2002). "Protective effect of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability." *Biosci Biotechnol Biochem* **66**(2): 398-403. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.398>

Benzie, I. F. and J. J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay." *Analytical biochemistry* **239**(1): 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Bergman, R. N. and S. D. Mittelman (1998). "Central role of the adipocyte in insulin resistance." *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology* **9**(2-4): 205-222. <https://doi.org/10.1515/JBCPP.1998.9.2-4.205>

Bernardino Neto, M. (2011). *Análise de correlações entre estabilidade de membrana de eritrócitos, níveis séricos de lipídeos e variáveis hematimétricas*, Universidade Federal de Uberlândia.

Boon, J. M. and B. D. Smith (2002). "Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes." *Medicinal research reviews* **22**(3): 251-281. <https://doi.org/10.1002/med.10009>

Bor-Kucukatay, M., R. B. Wenby, H. J. Meiselman and O. K. Baskurt (2003). "Effects of nitric oxide on red blood cell deformability." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **284**(5): H1577-H1584. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00665.2002>

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* **72**(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Bretscher, M. S. and S. Munro (1993). "Cholesterol and the Golgi apparatus." *Science* **261**(5126): 1280-1282. <https://doi.org/10.1126/science.8362242>

Buchwald, H. (2005). "Bariatric surgery for morbid obesity: health implications for patients, health professionals, and third-party payers." *Journal of the American College of Surgeons* **200**(4): 593-604. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2004.10.039>

Cascio, M. (2005). "Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1711**(2): 142-153. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.12.001>

Cavusoglu, E., V. Chopra, A. Gupta, V. R. Battala, S. Poludasu, C. Eng and J. D. Marmur (2010). "Relation between red blood cell distribution width (RDW) and all-cause mortality at two years in an unselected population referred for coronary angiography." International journal of cardiology **141**(2): 141-146.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.11.187>

Chen, L. and J. Mehta (1998). "Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function." Journal of cardiovascular pharmacology **32**(1): 57-61.
<https://doi.org/10.1097/00005344-199807000-00009>

Codoñer-Franch, P., V. Valls-Bellés, A. Arilla-Codoñer and E. Alonso-Iglesias (2011). "Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress." Translational Research **158**(6): 369-384.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.08.004>

Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu and J. Lunec (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." The FASEB Journal **17**(10): 1195-1214.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>

Cooper, G. M. and D. Ganem (1997). The cell surface The Cell: A Molecular Approach. Washington: 467-517.

Cooper, R. A., E. Arner, J. Wiley and S. Shattil (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>

Cunha, L. M. (2013). Investigaçāo da associaçāo entre cinética de lise em eritrócitos humanos, parâmetros bioquímicos e hematológicos, Universidade Federal de Uberlândia.

Dalton, S. (1998). "The dietitians' philosophy and practice in multidisciplinary weight management." Journal of the American Dietetic Association **98**(10): S49-S54.
[https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(98\)00711-1](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(98)00711-1)

Dâmaso, A. (2009). Obesidade, Guanabara Koogan.

de Arvelos, L. R. (2014). Influência de índices hematimétricos e bioquímicos de pacientes submetidas à cirurgia bariátrica sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos, Universidade Federal de Uberlândia.

De Lorgeril, M., P. Salen, I. Monjaud and J. Delaye (1997). "The'diet heart'hypothesis in secondary prevention of coronary heart disease." European heart journal **18**(1): 13-18. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a015094>

Dusse, L., L. M. Vieira and M. d. G. Carvalho (2003). "Revisão sobre óxido nítrico." J Bras Patol Med Lab **39**(4): 343-350. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442003000400012>

Ephrem, G. (2013). "Red blood cell distribution width is a predictor of readmission in cardiac patients." Clinical cardiology **36**(5): 293-299. <https://doi.org/10.1002/clc.22116>

Feldman, E. (2004). "Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay." AMDCC Protocols, Version 1: 1-3.

Frank, A. (1998). "A multidisciplinary approach to obesity management: the physician's role and team care alternatives." Journal of the American Dietetic Association **98**(10): S44-S48. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(98\)00710-X](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(98)00710-X)

García, E. (2004). "¿ En qué consiste el tratamiento multidisciplinario de la obesidad." Revista de endocrinología y nutrición **12**: 148-151.

Giustarini, D., R. Rossi, A. Milzani and I. Dalle-Donne (2008). "Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization." Methods in enzymology **440**: 361-380. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00823-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00823-3)

Grzelak, A., M. Kruszewski, E. Macierzyńska, Ł. Piotrowski, Ł. Pułaski, B. Rychlik and G. Bartosz (2008). "The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocyt." Cellular & molecular biology letters **14**(1): 23.

Halliwell, B. (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." Journal of neurochemistry **59**(5): 1609-1623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (2015). Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, USA. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

Halliwell, B. and M. Whiteman (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](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776) **142**(2): 231-255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>

Hemming, N. J., D. J. Anstee, M. A. Staricoff, M. J. Tanner and N. Mohandas (1995). "Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte." [Journal of Biological Chemistry](https://doi.org/10.1074/jbc.270.10.5360) **270**(10): 5360-5366. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.10.5360>

Hoefner, D. M., S. D. Hodel, J. F. O'Brien, E. L. Branum, D. Sun, I. Meissner and J. P. McConnell (2001). "Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System." [Clinical chemistry](#) **47**(2): 266-274.

Hunziker, S., L. A. Celi, J. Lee and M. D. Howell (2012). "Red cell distribution width improves the simplified acute physiology score for risk prediction in unselected critically ill patients." [Critical care](#) **16**(3): R89. <https://doi.org/10.1186/cc11351>

Huss, J. C. d. C. (2012). Efeito do tratamento multiprofissional sobre a relação da estabilidade de membrana de eritrócitos com variáveis sanguíneas em adolescentes obesos, Universidade Federal de Uberlândia.

Iuchi, Y., F. Okada, K. Onuma, T. Onoda, H. Asao, M. Kobayashi and J. Fujii (2007). "Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production." [Biochemical Journal](https://doi.org/10.1042/BJ20061386) **402**(2): 219-227. <https://doi.org/10.1042/BJ20061386>

Karaouzene, N., H. Merzouk, M. Aribi, S. Merzouk, A. Y. Berrouiguet, C. Tessier and M. Narce (2011). "Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: a comparison of older with young men." [Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2010.02.007) **21**(10): 792-799. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2010.02.007>

Kleinbongard, P., R. Schulz, T. Rassaf, T. Lauer, A. Dejam, T. Jax, I. Kumara, P. Gharini, S. Kabanova and B. Özüyaman (2006). "Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase." [Blood](https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-3992) **107**(7): 2943-2951. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-3992>

Lau, D. C., B. Dhillon, H. Yan, P. E. Szmitko and S. Verma (2005). "Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis." [American Journal of Physiology-Heart](#)

and Circulatory Physiology 288(5): H2031-H2041.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01058.2004>

Lechleitner, M., T. Koch, M. Herold, A. Dzien and F. Hoppichler (2000). "Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factors." Journal of internal medicine 248(1): 67-76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2000.00705.x>

Lee, Y. S. (2009). "Consequences of childhood obesity." Ann Acad Med Singapore 38(1): 75-77.

Leite, L. D., É. D. de Medeiros Rocha and J. Brandão-Neto (2009). "Obesidade: uma doença inflamatória." Ciência & Saúde 2(2): 85-95. <https://doi.org/10.15448/1983-652X.2009.2.6238>

Lemmich, J., K. Mortensen, J. H. Ipsen, T. Hønger, R. Bauer and O. G. Mouritsen (1997). "The effect of cholesterol in small amounts on lipid-bilayer softness in the region of the main phase transition." European biophysics journal 25(4): 293-304. <https://doi.org/10.1007/s002490050041>

Liu, Y., W. Qi, A. Richardson, H. Van Remmen, Y. Ikeno and A. B. Salmon (2013). "Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase." Biochemical and biophysical research communications 438(1): 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.029>

Lutz, H. (2004). "Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance." Cellular and molecular biology 50(2): 107-116.

Mahattanatawee, K., J. A. Manthey, G. Luzio, S. T. Talcott, K. Goodner and E. A. Baldwin (2006). "Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits." Journal of agricultural and food chemistry 54(19): 7355-7363. <https://doi.org/10.1021/jf060566s>

Makinde, M. and P. Bobade (1994). "Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites." Research in veterinary science 57(3): 343-348. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(94\)90128-7](https://doi.org/10.1016/0034-5288(94)90128-7)

Malandrino, N., W. Wu, T. Taveira, H. Whitlatch and R. Smith (2012). "Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes." Diabetologia 55(1): 226-235. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2331-1>

Mandal, D., V. Baudin-Creusa, A. Bhattacharyya, S. Pathak, J. Delaunay, M. Kundu and J. Basu (2003). "Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3)." Journal of Biological Chemistry **278**(52): 52551-52558. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306914200>

Manson, J. E., M. J. Stampfer, C. H. Hennekens and W. C. Willett (1987). "Body weight and longevity: a reassessment." Jama **257**(3): 353-358. <https://doi.org/10.1001/jama.1987.03390030083026>

Martinez, M., A. Vayá, L. Gil, R. Martí, J. Dalmau and J. Aznar (1998). "The cholesterol/phospholipid ratio of the erythrocyte membrane in children with familial hypercholesterolemia. Its relationship with plasma lipids and red blood cell aggregability." Clinical Hemorheology and microcirculation **18**(4): 259-263.

Marzzoco, A. and B. B. Torres (1999). Bioquímica básica, Guanabara Koogan.

Mascarenhas Netto, R. d. C. (2009). "Estabilidade de membrana de eritrócitos em portadores de depressão."

Mazurek, T., L. Zhang, A. Zalewski, J. D. Mannion, J. T. Diehl, H. Arafat, L. Sarov-Blat, S. O'Brien, E. A. Keiper and A. G. Johnson (2003). "Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators." Circulation **108**(20): 2460-2466. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000099542.57313.C5>

Michalska-Malecka, K., L. Slowinska, M. Dorecka and W. Romaniuk (2008). "Correlations in some pathogenetic factors and values of hemorheological parameters in age-related macular degeneration." Clinical hemorheology and microcirculation **38**(3): 209-216.

Misra, H. and I. Fridovich (1972). "The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for SOD." J Biol Chem **247**: 3170-3175.

Moeckel, G. W., R. Shadman, J. M. Fogel and S. M. Sadrzadeh (2002). "Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocyte membrane ATPases." Life Sciences **71**(20): 2413-2424. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02035-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02035-0)

Monteiro, C. A., L. Mondini, A. L. M. d. Souza and B. M. Popkin (1995). Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças, Hucitec: 247-255.

Murador, P. and E. Deffune (2007). "Aspectos estruturais da membrana eritrocitária." *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*: 168-178.
<https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000200016>

Murray, K., V. Rodwell, D. Bender, K. M. Botham, P. A. Weil and P. J. Kennelly (2009). Membranes: Structure & Function. *Harper's Illustrated Biochemistry*, New York: McGraw-Hill.

Murray, R. K. G., D. K. Rodwell and W. Victor (2006). *Harper's illustrated biochemistry*.

Neves, C. F. (2011). Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e estado inflamatório em pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia da obesidade, Universidade de Brasília.

Nikolić, M., D. Stanić, I. Baričević, D. R. Jones, O. Nedić and V. Niketić (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>

Nunes, J. E. D. (2015). Tratamento multiprofissional do adolescente obeso: efeito nos marcadores da inflamação e do estresse oxidativo, Universidade Federal de Uberlândia.

Okada, M., T. Matsuto, T. Miida, K. Obayashi, Y. Zhu and Y. Fueki (2004). "Lipid analyses for the management of vascular diseases." *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **11**(4): 190-199. <https://doi.org/10.5551/jat.11.190>

Oliveira, A. M. A. d., E. M. Cerqueira, J. d. S. Souza and A. C. d. Oliveira (2003). "Sobrepeso e obesidade infantil: influência de fatores biológicos e ambientais em Feira de Santana, BA." *Arq Bras Endocrinol Metabol*: 144-150.
<https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000200006>

Olusi, S. (2002). "Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans." *International journal of obesity* **26**(9): 1159. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802066>

Orkin, S. H., D. G. Nathan, D. Ginsburg, A. T. Look, D. E. Fisher and S. Lux (2008). Disorders of Erythrocyte Membrane. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood* Elsevier Health Sciences.

Özüyaman, B., M. Grau, M. Kelm, M. W. Merx and P. Kleinbongard (2008). "RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects." Trends in molecular medicine **14**(7): 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.05.002>

Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiological reviews **87**(1): 315-424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>

Park, K., M. Gross, D.-H. Lee, P. Holvoet, J. H. Himes, J. M. Shikany and D. R. Jacobs (2009). "Oxidative stress and insulin resistance." Diabetes care **32**(7): 1302-1307. <https://doi.org/10.2337/dc09-0259>

Patel, K. V., R. D. Semba, L. Ferrucci, A. B. Newman, L. P. Fried, R. B. Wallace, S. Bandinelli, C. S. Phillips, B. Yu and S. Connelly (2009). "Red cell distribution width and mortality in older adults: a meta-analysis." Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences **65**(3): 258-265. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp163>

Pawloski, J. R., R. V. Swaminathan and J. S. Stamler (1998). "Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation." Circulation **97**(3): 263-267. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.3.263>

Penha-Silva, N., L. Arvelos, C. Cunha, T. Aversi-Ferreira, L. Gouvêa-e-Silva, M. Garrote-Filho, C. Finotti, M. Bernardino-Neto and F. de Freitas Reis (2008). "Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol." Bioelectrochemistry **73**(1): 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.04.002>

Perk, K., Y. Frei and A. Herz (1964). "Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals." American journal of veterinary research **25**: 1241-1248.

Pietta, P.-G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." Journal of natural products **63**(7): 1035-1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>

Prall, Y. G., K. K. Gambhir and F. R. Ampy (1998). "Acetylcholinesterase: an enzymatic marker of human red blood cell aging." Life sciences **63**(3): 177-184. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00258-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00258-6)

Raffy, S. and J. Teissie (1999). "Control of lipid membrane stability by cholesterol content." *Biophysical journal* **76**(4): 2072-2080. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77363-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77363-7)

Repetto, G., J. Rizzolli and C. Bonatto (2003). "Prevalência, riscos e soluções na obesidade e sobrepeso: here, there, and everywhere." *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **47**(6): 633-635. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000600001>

Roduit, C., F. G. van der Goot, P. De Los Rios, A. Yersin, P. Steiner, G. Dietler, S. Catsicas, F. Lafont and S. Kasas (2008). "Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains." *Biophysical journal* **94**(4): 1521-1532. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112862>

Salmon, C., J. P. Cartron and P. Rouger (1984). *The human blood groups*, Masson Pub. USA.

Santos, C. X., L. Y. Tanaka, J. Wosniak Jr and F. R. Laurindo (2009). "Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase." *Antioxidants & redox signaling* **11**(10): 2409-2427. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2625>

Schalm, O. W. and N. C. Jain (1986). Hematology techniques. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia, Lea & Febiger.

Schick, B. P. and P. K. Schick (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)

Shin, S., Y.-H. Ku, J.-S. Suh and M. Singh (2008). "Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media." *Clinical hemorheology and microcirculation* **38**(3): 153-161.

Singer, S. J. (1974). "The molecular organization of membranes." *Annual review of biochemistry* **43**(1): 805-833. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.43.070174.004105>

Singer, S. J. and G. L. Nicolson (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>

Song, F., W. Jia, Y. Yao, Y. Hu, L. Lei, J. Lin, X. Sun and L. Liu (2007). "Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes." Clinical science **112**(12): 599-606. <https://doi.org/10.1042/CS20060323>

Sothern, M. S., J. M. Loftin, J. N. Udall, R. M. Suskind, T. L. Ewing, S. C. Tang and U. Blecker (1999). "Inclusion of resistance exercise in a multidisciplinary outpatient treatment program for preadolescent obese children." SOUTHERN MEDICAL JOURNAL-BIRMINGHAM ALABAMA- **92:** 585-592. <https://doi.org/10.1097/00007611-199906000-00007>

Spengler, M., S. Bertoluzzo, G. Catalani and M. Rasia (2008). "Study on membrane fluidity and erythrocyte aggregation in equine, bovine and human species." Clinical hemorheology and microcirculation **38**(3): 171-176.

Starzyński, R. R., P. Lipiński, J.-C. Drapier, A. Diet, E. Smuda, T. Bartłomiejczyk, M. A. Gralak and M. Kruszewski (2005). "Down-regulation of iron regulatory protein 1 activities and expression in superoxide dismutase 1 knock-out mice is not associated with alterations in iron metabolism." Journal of Biological Chemistry **280**(6): 4207-4212. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411055200>

Statistics, N. C. f. H. (2007). "Health, United States, 2007: With chartbook on trends in the health of Americans."

Tanner, J. M. and R. H. Whitehouse (1976). "Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty." Archives of disease in childhood **51**(3): 170-179. <https://doi.org/10.1136/adc.51.3.170>

Touyz, R. and E. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochemistry and cell biology **122**(4): 339-352. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0696-7>

Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." British Journal of Nutrition **92**(3): 347-355. <https://doi.org/10.1079/BJN20041213>

Tsuda, K., K. Kimura, I. Nishio and Y. Masuyama (2000). "Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation." Biochemical and biophysical research communications **275**(3): 946-954. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3408>

Turrens, J. F. (1997). "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain." *Bioscience reports* **17**(1): 3-8. <https://doi.org/10.1023/A:1027374931887>

Vansant, G., M. Hulens, W. van der Borght, K. Demyttenaere, P. Lysens and E. Muls (1999). "A multidisciplinary approach to the treatment of obesity." *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* **23**. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800798>

Vayá, A., M. Martínez, R. Carmena and J. Aznar (1993). "The lipid composition of red blood cells and their hemorheological behavior in patients with primary hyperlipoproteinemia." *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **13**(4): 447-457.

Visser, M., L. M. Bouter, G. M. McQuillan, M. H. Wener and T. B. Harris (2001). "Low-grade systemic inflammation in overweight children." *Pediatrics* **107**(1): e13-e13. <https://doi.org/10.1542/peds.107.1.e13>

Wajcman, H., B. Lantz, R. Girot and J. Bernard (1992). "Les maladies du globule rouge."

Wolin, M. S. (2000). "Interactions of oxidants with vascular signaling systems." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**(6): 1430-1442. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.6.1430>

Wood, I. S., F. P. de Heredia, B. Wang and P. Trayhurn (2009). "Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity." *Proceedings of the Nutrition Society* **68**(4): 370-377. <https://doi.org/10.1017/S0029665109990206>

Wüstner, D. (2007). "Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology." *Chemistry and physics of lipids* **146**(1): 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.12.004>

Yagi, K. (1998). "Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma." *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY-CLIFTON THEN TOTOWA-* **108**: 101-106. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:101>

Zupkó, I., J. Hohmann, D. Rédei, G. Falkay, G. Janicsák and I. Máthé (2001). "Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents." *Planta Medica* **67**(04): 366-368. <https://doi.org/10.1055/s-2001-14327>