



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

**Amplitude da distribuição de volume (*RDW*) e da estabilidade osmótica (*dX*)
de eritrócitos no *diabetes mellitus* tipo 2**

Estudante: **Maria Aparecida Knychala**

**UBERLÂNDIA, MG
2021**



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

**Amplitude da distribuição de volume (*RDW*) e da estabilidade osmótica (*dX*)
de eritrócitos no *diabetes mellitus* tipo 2**

Estudante: **Maria Aparecida Knychala**
Orientador: **Nilson Penha-Silva**
Coorientador: **Mario da Silva Garrote Filho**

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

**UBERLÂNDIA, MG
2021**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

K74 2021	<p>Knychala, Maria Aparecida, 1957- Amplitude da distribuição de volume (RDW) e da estabilidade osmótica (dX) de eritrócitos no diabetes mellitus tipo 2 [recurso eletrônico] / Maria Aparecida Knychala. - 2021.</p> <p>Orientador: Nilson Penha-Silva. Coorientador: Mario da Silva Garrote Filho. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.541 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Bioquímica. I. Penha-Silva, Nilson, 1957-, (Orient.). II. Garrote Filho, Mario da Silva, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p> <p>CDU: 575</p>
-------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - 05/2021 - PPGGB.				
Data:	Três de novembro de dois mil e vinte e um	Hora de início:	08:00h	Hora de encerramento:	10:55
Matrícula do Discente:	11723GBI006				
Nome do Discente:	Maria Aparecida Knychala				
Título do Trabalho:	Amplitude da distribuição de volume (RDW) e da estabilidade osmótica (dX) de eritrócitos no <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Bioquímica redox e estresse oxidativo, enzimologia e marcadores bioquímicos.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Relações entre força muscular, estabilidade de membrana de eritrócitos e variáveis bioquímicas, hematológicas e inflamatórias em pacientes com pré-diabetes e <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2.				

Aos três dias do mês de novembro de dois mil e vinte e um, às 08:00 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Mconf RNP*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Profª. Drª. Maria de Fátima Borges, Prof. Dr. Morun Bernardino Neto, Prof. Dr. Omar Pereira de Almeida Neto, Profª. Drª. Márcia Aires Rodrigues de Freitas (UFU) e Prof. Dr. Nilson Penha Silva, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Prof. Dr. Nilson Penha Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO (A).

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do

Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Nilson Penha Silva, Presidente**, em 03/11/2021, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Omar Pereira de Almeida Neto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/11/2021, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Morun Bernardino Neto, Usuário Externo**, em 03/11/2021, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Aires Rodrigues de Freitas, Professor(a) do Magistério Superior**, em 03/11/2021, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria de Fátima Borges, Usuário Externo**, em 03/11/2021, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3047475** e o código CRC **89E3311C**.



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

**Amplitude da distribuição de volume (*RDW*) e da estabilidade osmótica (*dX*)
de eritrócitos no *diabetes mellitus* tipo 2**

Estudante: **Maria Aparecida Knychala**

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:	Dr. Nilson Penha-Silva	[UFU]
Examinador:	Dr. Márcia Aires Rodrigues de Freitas	[UFU]
Examinador:	Dr. Maria de Fátima Borges	[UFTM]
Examinador:	Dr. Morun Bernardino Neto	[USP]
Examinador:	Dr. Omar Pereira de Almeida Neto	[UFU]

Data da defesa: **03/11/2021**

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

Nilson Penha-Silva
(Orientador)

DEDICATÓRIA

À ciência, por iluminar nossos caminhos

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. **Nilson Penha-Silva**, orientador especial, agradeço a presença constante e serena em minha formação tanto profissional quanto pessoal.

Ao Professor Dr. **Mario da Silva Garrote-Filho**, coorientador, dedicado à pesquisa, pelas valiosas contribuições para este estudo e pelos futuros trabalhos.

Ao Professor Dr. **Morun Bernardino Neto**, excelente professor de estatística, a quem devo e admiro muito.

Aos Professores Dr. **Elmiro Santos Resende**, Dra. **Márcia Aires Rodrigues de Freitas** e Dr. **Ricardo Rodrigues**, agradeço pela participação e pelas sugestões feitas e acatadas em minha qualificação de doutorado.

Aos membros da banca desta defesa de doutorado, Dra. **Maria de Fátima Borges**, Dra. **Márcia Aires Rodrigues de Freitas**, Dr. **Morun Bernardino Neto** e Dr. **Omar Pereira de Almeida Neto**, por se disporem a analisar este trabalho e enriquecer esta defesa com suas honrosas presenças e relevantes discussões.

À Professora Dra. **Ana Maria Bonetti**, da área de Genética do Instituto de Biotecnologia (IBTec), obrigada pelo apoio e incentivo ao meu desenvolvimento científico e pessoal.

À Professora. Dra. **Vivian Alonso Goulart**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB) do IBTec agradeço pela dedicação devotada à manutenção da excelência e crescimento desse programa, onde importantes trabalhos têm sido feitos.

À minha irmã Dra. **Cinara Knychala Muniz**, pelas contribuições na leitura e organização do trabalho escrito.

Aos colegas do Laboratório de Biofísicoquímica, nossa querida família LaBFiQ, **Alice Vieira da Costa**, **Breno Batista da Silva**, **Carla Cristina Alves Andrade**, **Flaviana Ferreira Gomes**, **Jaqueline Aimê dos Reis Vilela**, **Jefferson Luiz Nascimento**, **Lara Ferreira Paraiso**, **Lucas Moreira Cunha**, **Lucas Tadeu de**

Andrade, Luciana Alves de Medeiros, Manuela Ortega Marques Rodrigues, Marcelo Costa Júnior, Marco Aurélio Ferreira de Jesus Leite, Maria Luíza Santos Pacheco, Rodney Coelho da Paixão, Rosiane Soares Saturnino, Samantha Neves de Oliveira, Sarah Yasminy Luz e Wener Barbosa Resende, agradeço pelas ricas discussões em diferentes áreas do conhecimento e pela agradável convivência diária.

À **Janaina de Souza Mota**, secretária do PPGGB, muito obrigada pela disponibilidade e todo o apoio dispendido durante o curso.

Aos funcionários do IBTec, especialmente **Célia Pereira Souza, Maria Conceição Francisco Souto dos Santos, Paulo Roberto Moderno e Sebastiana Abadia Inácio**, pelo apoio prestado sempre que necessário e pela convivência.

Aos participantes da pesquisa, agradeço pela confiança e disponibilidade em colaborar com o desenvolvimento científico.

Às minhas amigas **Maria Gonçalves, Raquel Gonçalves e Ademarci de Jesus Gomes**, agradeço pelo companheirismo e por se fazerem presentes nesta fase de minha vida, com apoio e palavras de incentivo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo inestimável serviço prestado à educação e pesquisa neste país, especialmente aos programas de aperfeiçoamento pelos quais tive o privilégio de passar na **Universidade Federal de Uberlândia**.

E, por fim, à **Universidade Federal de Uberlândia**, onde trabalho, pelo suporte necessário para minha pós-graduação – primeiro o mestrado, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, e, agora, o doutorado, pelo PPGGB – meu muitíssimo obrigada!

SUMÁRIO

	Página
Abreviaturas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xi
Apresentação	1
Capítulo 1: Fundamentação Teórica	3
O <i>diabetes mellitus</i> tipo 2 no Brasil e no mundo	4
Os eritrócitos	5
As propriedades dos eritrócitos	5
A membrana dos eritrócitos	7
Hiperglicemia, alterações lipídicas, propriedades de membrana de eritrócitos e complicações vasculares	8
Hiperglicemia, estresse oxidativo, propriedades de eritrócitos e complicações vasculares	10
A estabilidade de eritrócitos	10
A estabilidade osmótica de eritrócitos	12
Estabilidade osmótica de eritrócitos, composição de membrana e composição do plasma	14
<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2, anemia, características hematimétricas e estabilidade osmótica de eritrócitos	15
Considerações finais e objetivo do estudo	18
Referências	19
Capítulo 2: <i>Red Cell Distribution Width and Erythrocyte Osmotic Stability in Type 2 Diabetes Mellitus</i>	36
Resumo	37
<i>Abstract</i>	38
<i>Introduction</i>	39
<i>Material and Methods</i>	40
<i>Results</i>	43
<i>Discussion</i>	45
<i>Conclusion</i>	52
<i>References</i>	61
Anexo 1: Determinação da estabilidade osmótica de eritrócitos	68
Anexo 2: Parecer consubstanciado do CEP	78

ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais de glicação avançada, do inglês <i>Advanced Glycation End-Products</i>
ALT	Alanina Aminotransferase, do inglês <i>Alanine Amino Transferase</i>
A _{min}	Absorvância basal a 540 nm da amostra de sangue
A _{max}	Absorvância a 540 nm associada à hemólise total
AST	Aspartato aminotransferase, do inglês <i>Aspartate Aminotransferase</i>
ATP	Adenosina Trifosfato, do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRP	Proteína C reativa, do inglês <i>C-Reactive Protein</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
dX	¼ da variação na concentração salina que promove 100% de hemólise
FO	Fragilidade osmótica
GLUT	Transportador de Glicose, do inglês <i>Glucose Transporter</i>
H0	Concentração de NaCl em que a hemólise hiposmótica se inicia
H50	Concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise
H100	Concentração de NaCl em que a hemólise hiposmótica termina
HbA1c	Hemoglobina Glicada A1c, do inglês <i>Glycated Hemoglobin A1c</i>
HDL-C	Colesterol da Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>High Density Lipoprotein cholesterol</i>
IBTec	Instituto de Biotecnologia
LaBFiQ	Laboratório de Biofísicoquímica da Universidade Federal de Uberlândia
LDH	Lactato Desidrogenase, do inglês <i>Lactate Dehydrogenase</i>
LDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês <i>Low Density Lipoprotein Cholesterol</i>
MCH	Hemoglobina corpuscular média, do inglês <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i>
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês <i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i>
MCV	Volume corpuscular médio, do inglês <i>Mean Corpuscular Volume</i>
ND	Não diabéticos, do inglês <i>Nondiabetic</i>
PPGGB	Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
RBC	Células Vermelhas do Sangue, do inglês <i>Red Blood Cells</i>
RDW	Amplitude da distribuição de volume de células vermelhas, do inglês <i>Red-Cell Distribution Width</i>
T2D	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIBC	Capacidade Total de Ligação de Ferro, do inglês <i>Total Iron Binding Capacity</i>
TSI	Índice de Saturação da Transferrina, do inglês <i>Transferrin Saturation Index</i>
TGC	Triglicerídeos, do inglês <i>Triglycerides</i>
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VDLD-C	Colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês <i>Very Low Density Lipoprotein Cholesterol</i>

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Flow chart of volunteers of the study	58
Figura 2 Osmotic fragility curve excerpt of one of the study participants	59
Figura 3 Spearman correlations between pairs of variables studied in the group of diabetic women (A) and men (B)	60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	
Baseline Characteristics of non-diabetic (ND) and diabetic (T2D) female and male*	54
Tabela 2	
Comparison of studied variables between groups of volunteers with better (HbA1c < 7%) and worse glycemic control (HbA1c ≥ 7%)	56

Apresentação

A maioria dos estudos dedicados à discussão das relações entre *diabetes mellitus* tipo 2 e doença vascular tem foco no endotélio. Como os eritrócitos são agentes de uma das funções primárias do sistema cardiovascular, o transporte de gases, é bastante relevante considerá-los na fisiopatologia da doença vascular, uma vez que a própria hiperglicemia tem efeitos deletérios sobre eles.

Com a doença, a fluidez de membrana e a deformabilidade dessas células diminuem devido ao acúmulo de glicações, especialmente diante de um mau controle glicêmico, e ao aumento do teor de ácidos graxos saturados nos fosfolípidios de membrana, diante dos desequilíbrios hormonais da doença e da lipoperoxidação de ácidos graxos polinsaturados.

Além disso, os eritrócitos estão também sujeitos à influência da agressão inflamatória sobre a homeostase do ferro.

Todas essas alterações afetam as propriedades reológicas dessas células, prejudicando as trocas gasosas e promovendo danos endoteliais, o que confere aos eritrócitos um papel proeminente na fisiopatologia da doença vascular associada ao *diabetes mellitus* tipo 2.

Esta tese foi preparada de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Ela contém uma seção de **Fundamentação Teórica**, apresentada no **Capítulo 1**, seguida por um artigo resultante do estudo, apresentado no **Capítulo 2**.

O **Capítulo 1** apresenta uma breve revisão sobre a epidemiologia, os fatores de risco e a relação da hiperglicemia com a disfunção endotelial presente na doença. Como os eritrócitos constituem o foco da tese, esse capítulo traz também uma revisão sobre os principais fatores que afetam as propriedades físicoquímicas – como fluidez, deformabilidade, estabilidade e viscosidade – dessas células.

O **Capítulo 2** traz um artigo, já publicado no *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, periódico da Editora *John Wiley & Sons* com 5,310 de fator de impacto no ano de 2020, segundo o *Journal Citation Report* da *Clarivate Analytics*. Neste artigo, um grupo de 53 indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2 foi comparado com um grupo controle constituído de 69 voluntários quanto a parâmetros de

estabilidade osmótica de eritrócitos e diversas variáveis antropométricas, hematológicas e bioquímicas. A existência de associação entre as variáveis que se mostraram diferentes entre os grupos foi investigada por análise de correlação. Este estudo identificou a ocorrência de aumento nos valores de RDW em homens e mulheres do grupo diabético e associação desse aumento de RDW com a diminuição nos níveis de ferro. Essa diminuição nos níveis de ferro, por sua vez, foi associada com redução de MCHC e aumento na estabilidade osmótica de eritrócitos.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

O *diabetes mellitus* tipo 2 no Brasil e no mundo

O *diabetes mellitus* (DM) é primariamente caracterizado pela dificuldade do corpo em promover a homeostase da glicose ¹. Ele pode causar alterações vasculares, cardíacas, cerebrais e renais, dentre outras, podendo levar à perda de visão, neuropatia, nefropatia, necessidade de amputação de membro e morte prematura ².

O DM é classificado em quatro classes, o DM tipo 1, em que há deficiência absoluta de insulina; o DM tipo 2, em que há resistência à insulina, com ou sem deficiência na produção desse hormônio; o DM gestacional; e o DM de outros tipos específicos ^{3,4}.

O *diabetes mellitus* tipo 2 (T2D), que é a classe mais comum da doença, representando 90-95% dos casos, é um grande problema de saúde pública global ^{4,5}. O número de pessoas com DM quadruplicou nas últimas três décadas em todo o mundo, particularmente em países em desenvolvimento, inclusive com início mais precoce em adultos jovens ³. O Brasil, onde a doença acomete 7,5% da população ⁶, está na quinta posição mundial, com estimativa do número de pessoas com a doença chegar a 16,8 milhões em 2030 e 26 milhões em 2045 ⁷. No mundo, o DM é a nona principal causa de redução na expectativa de vida ⁸.

Aproximadamente metade das pessoas que vivem com T2D não sabe que tem a doença ⁷, o que dificulta o tratamento precoce e a prevenção de suas complicações, prejudicando a qualidade de vida dessas pessoas ⁹.

Os principais fatores de risco para o T2D são hereditariedade, obesidade, sedentarismo, hipertensão arterial, estresse, alimentação mal balanceada, envelhecimento e tolerância à glicose diminuída ^{9,10}.

O T2D está fisiopatologicamente associado a dislipidemia ^{11,12}, estresse oxidativo ^{13,14}, inflamação ^{15,16}, anemia ¹⁷ e complicações vasculares ¹⁸⁻²⁰. Isto é preocupante, uma vez que as doenças cardiovasculares representam a primeira maior causa de morte no mundo, inclusive nos países em desenvolvimento, onde as doenças crônicas não transmissíveis estão em ascensão ²¹.

Dislipidemia, estresse oxidativo, inflamação e anemia são alterações associadas entre si e por isso conferem aos eritrócitos um papel relevante na fisiopatologia do DM e de suas complicações vasculares ⁹.

Realmente, diversas doenças estão associadas a defeitos na estrutura e/ou comportamento de eritrócitos. O aprofundamento da investigação do papel do eritrócito no T2D pode permitir um melhor conhecimento de sua fisiopatologia e até mesmo a identificação de marcadores biológicos de alterações eritrocitárias que possam ser usados para prevenir as complexas complicações vasculares da doença, contribuindo para melhorar a qualidade de vida e aumentar a longevidade de indivíduos diabéticos ²².

Os eritrócitos

A principal função do eritrócito é transportar oxigênio – dos pulmões para os tecidos extrapulmonares – e dióxido de carbono – dos tecidos extrapulmonares para os pulmões –, mas essa célula também participa ativamente no processo de perfusão tecidual e na regulação do fluxo sanguíneo ^{23,24}.

O exercício das funções do eritrócito exige a capacidade de manter propriedades fundamentais e inter-relacionadas, como **fluidez**, **deformabilidade**, **estabilidade** e **viscosidade** ²⁵.

As propriedades dos eritrócitos

A fluidez é uma propriedade típica de líquidos e gases. Ela aumenta com a progressão do estado sólido para o estado líquido e do estado líquido para o estado gasoso. Para garantir o exercício de funções como transporte e sinalização, a membrana do eritrócito deve apresentar um grau intermediário de fluidez, denominado de fluidez crítica, situada entre os estados sólido e líquido, e que depende de nível intermediário crítico de intensidade entre as ligações de van der Waals existentes no interior hidrofóbico da membrana. Se a intensidade dessas ligações for muito alta, a membrana fica mais sólida, mas se for muito baixa, ela fica líquida ²⁶. A fluidez de membrana é essencial para garantir sua deformabilidade.

A deformabilidade é definida como a capacidade do eritrócito em se deformar para passar por capilares sem se romper ^{24,27,28}. Vários fatores, como a

fluidez de membrana e a ação de proteínas do citoesqueleto podem interferir nesta propriedade. O próprio formato de disco bicôncavo parece também ser essencial na determinação da deformabilidade do eritrócito. Na esferocitose, condição patológica em que o eritrócito se torna esférico, ele não possui a deformabilidade necessária para passagem na microcirculação, levando à lise precoce ^{25,29,30}.

A estabilidade é definida como a capacidade do eritrócito de manter sua integridade físico-química diante de situações adversas ³¹⁻³⁴. Quando é capaz de resistir à uma situação de expansão de volume em decorrência de um meio hiposmótico, o eritrócito apresenta estabilidade osmótica ^{29,35,36}. Quando a membrana do eritrócito resiste a uma agressão mecânica ocasionada pelo fluxo sanguíneo e/ou atrito com a parede dos vasos é conhecida como estabilidade mecânica ³⁵. Por sua vez, a estabilidade química é a capacidade do eritrócito em se manter sem se romper na presença de agentes químicos caotrópicos ^{37,38}.

A viscosidade é uma propriedade dos fluidos, como o sangue circulante, onde é influenciada pela concentração de proteínas e de células – dada pelos valores de hematócrito –, pela deformabilidade e agregabilidade dessas células e pela resistência oferecida pela parede dos vasos à circulação através da rede de vasos do organismo ^{24,29,38-41}. A viscosidade sanguínea precisa ter um valor crítico para que a circulação do sangue ocorra sem que haja lise de suas células, particularmente dos eritrócitos, que constituem a vasta maioria das células sanguíneas ^{30,38}.

A viscosidade é uma propriedade fundamental da reologia (do grego *rhéō* ou fluxo e *logia* ou estudo), que é a área da ciência que estuda as deformações e escoamentos da matéria. A reologia do sangue, ou hemorreologia, lida com as propriedades biofísicas do fluxo do sangue ⁴⁰.

As propriedades reológicas do sangue em pacientes com *diabetes* têm sido estudadas a fim de avaliar sua influência nas complicações da doença ⁴²⁻⁴⁶. Um aumento na viscosidade ⁴⁵ e uma redução da elasticidade de eritrócitos foram observados em diabéticos quando comparados a indivíduos não-diabéticos ⁴². De fato, essas alterações podem explicar os problemas na microcirculação presentes na doença. A origem dessas alterações reológicas envolvem fatores complexos que incluem a reestruturação da membrana do eritrócito devido à glicação de proteínas ⁴², mas também alterações na composição lipídica dessa membrana.

A compreensão da natureza dos fatores determinantes das alterações reológicas presentes no diabetes exige um estudo mais específico da composição e propriedades da membrana dos eritrócitos.

A membrana dos eritrócitos

Segundo o modelo do mosaico fluido, as membranas biológicas são formadas por uma bicamada lipídica ^{27,47,48}, associada a proteínas e carboidratos, a qual separa o ambiente hidrofílico intracelular do ambiente hidrofílico extracelular ⁴⁹⁻⁵³. Os lipídios estão associados entre si por ligações de van der Waals ^{54,55}, que, por serem ligações fracas, permitem a movimentação de moléculas no interior da membrana ⁵⁶.

A membrana do eritrócito é composta por aproximadamente 50% de proteína, 7% de carboidratos e 43% de lipídios ⁵⁷. Os lipídios que compõem a membrana se distribuem em 60% de fosfolipídios, 30% de colesterol não esterificado e 10% de glicolipídios ^{30,58-60}.

A membrana citoplasmática está integrada no esqueleto da célula, ou citoesqueleto, um sistema estrutural complexo necessário para a manutenção de sua integridade física e a determinação de propriedades como estabilidade e deformabilidade ^{48,61-64}, além de participar no transporte através da membrana ^{27,47,48}.

As proteínas de membrana podem ser integrais ou periféricas ^{27,47,48}. As proteínas integrais só se dissociam da membrana por meio do uso de detergentes, ao passo que as periféricas podem ser dissociadas na presença de soluções hipersalinas ou soluções com valores extremos de pH ^{47,48,65}. As proteínas periféricas se associam à membrana mediante interações iônicas com proteínas integrais ou com os fosfolipídios ^{47,48}. Por sua vez, as proteínas integrais se associam mediante interações hidrofóbicas fortes com os lipídios da membrana ^{27,47,48}.

No eritrócito, várias proteínas de membrana merecem destaque.

Uma delas é o GLUT1 (do inglês *Glucose Transporter 1*), um transportador de glicose ⁶⁶, que garante uma captação desse açúcar de um modo independente da ação da insulina.

A aquaporina 1, uma proteína que atua no transporte de água ⁶⁷ e os cotransportadores de sódio-cloreto e sódio-potássio, que dependem do consumo de ATP para promoção do transporte ativo daqueles íons ^{68,69} também merecem menção.

A espectrina, uma proteína de membrana que permite o formato de disco bicôncavo do eritrócito ^{65,70-72} é muito relevante, porque esse formato assegura ao eritrócito a maior área de superfície que é necessária para permitir sua deformabilidade ao passar na microcirculação sem que ocorra lise ^{24,29,30,38}.

No eritrócito, a banda-3 é a maior proteína de membrana. Ela é responsável pelo transporte de íons cloreto e bicarbonato, o que é importante no transporte sanguíneo de CO₂ e na promoção da homeostase acidobásica ⁷³⁻⁷⁶. Além disso, a banda 3 regula o metabolismo da glicose e mantém a morfologia do eritrócito, o que é relevante no processo de remoção de células senescentes pelos macrófagos ^{27,77}. É a interação da banda 3 com outras proteínas e com os lipídeos de membrana que confere aos eritrócitos as propriedades mecânicas e elásticas que influenciam na determinação da viscosidade sanguínea ²⁷.

Assim, a participação dos lipídeos de membrana nos complexos mecanismos que determinam as propriedades mecânicas dos eritrócitos indica que as alterações metabólicas próprias do T2D devem exercer influência nas propriedades dessas células.

Hiperglicemia, alterações lipídicas, propriedades de membrana de eritrócitos e complicações vasculares

A membrana celular é uma barreira protetora, cuja configuração determina as trocas entre as regiões intra e extracelulares, e sua composição varia de acordo com as suas funções e o meio no qual ela se encontra ⁷⁸. Essa influência do meio, contudo, pode ter implicações deletérias, como é o caso da influência da

hiperglicemia e da hiperlipidemia, presentes no T2D mal controlado, sobre a estrutura e as funções da membrana do eritrócito.

Embora níveis altos de glicose possam elevar a osmolaridade sanguínea e, consequentemente, a estabilidade de eritrócitos ⁷⁹, uma hiperglicemia prolongada pode afetar os eritrócitos de outros modos. A glicação de proteínas de membrana foi associada à diminuição da fluidez ⁶² e deformabilidade de membrana e a aumento da agregabilidade de eritrócitos, de modo dependente com a concentração de glicose ^{45,80-82}.

A hiperglicemia foi também associada à disfunção na atividade de macrófagos ⁸³, prejudicando a fagocitose de eritrócitos senescentes ^{84,85} e levando ao aumento na população de eritrócitos mais velhos, que são em média menos estáveis quando comparados às formas jovens ^{86,87}, embora o envelhecimento celular não tenha produzido um aumento gradual na fragilidade dessas células e sim mudanças que aumentam e diminuem simultaneamente sua fragilidade, resultando em uma distribuição mais ampla de seu espectro de fragilidade ⁸⁷.

Muito além de sua influência sobre os eritrócitos, a glicação de proteínas tem relação com as complicações vasculares do diabetes por meio de outros mecanismos. Através de uma sequência de processos inespecíficos, a glicação de proteínas leva à produção de uma classe heterogênea de compostos, os produtos finais de glicação avançada ou AGEs, como eles são conhecidos ^{60,88-93}. De fato, o acúmulo de AGEs foi associado ao desenvolvimento de lesões microvasculares, como aquelas presentes na retinopatia desenvolvida por pacientes com T2D ^{89,94}, por exemplo.

Voltando à influência do diabetes sobre os eritrócitos, como a composição lipídica da membrana depende dos níveis de lipídios de membrana presentes na circulação ^{57,95}, além da influência da hiperglicemia, os eritrócitos estão também sujeitos à influência da hiperlipidemia, também presente no T2D não controlado.

A fluidez de membrana dos eritrócitos pode diminuir com o aumento no teor de ácidos graxos saturados nos fosfolipídios de membrana e na razão colesterol/fosfolipídeo. Isso compromete a deformabilidade e o exercício das diferentes funções dos eritrócitos ^{96,97}.

Realmente, vários estudos que avaliaram a membrana eritrocitária de indivíduos com T2D verificaram que ela apresenta maior teor de ácidos graxos

saturados do que insaturados ^{60,96,98-101} e maior razão colesterol/fosfolípido ¹⁰²⁻¹⁰⁴, o que faz com que ela se torne menos fluida.

Essa diminuição da fluidez de membrana é capaz de afetar outras propriedades dos eritrócitos, uma vez que fluidez, deformabilidade, estabilidade e viscosidade são propriedades interrelacionadas e essenciais para o exercício das funções dessas células ²⁵.

Hiperglicemia, estresse oxidativo, propriedades de eritrócitos e complicações vasculares

A composição lipídica da membrana dos eritrócitos também pode ser afetada por outros fatores, como o estresse oxidativo, via promoção da lipoperoxidação de ácidos graxos polinsaturados ⁶⁰.

O estresse oxidativo é resultante de um desbalanço entre a agressão oxidativa e as defesas antioxidantes. Diante da agressão oxidativa, os eritrócitos usam defesas antioxidantes que compreendem a ação da enzima glutathione peroxidase ^{105,106}. No T2D, vários estudos têm mostrado a existência de níveis reduzidos desta enzima associados ao aumento da agressão oxidativa e à lipoperoxidação de ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos de membrana ^{19,107}. Isso leva à diminuição do grau de insaturação lipídica da membrana, levando à diminuição da fluidez e da deformabilidade eritrocitária e à elevação da viscosidade sanguínea, alterações estas também associadas às complicações microvasculares presentes no T2D ^{96,108,109}.

A estabilidade de eritrócitos

O T2D está associado a alterações regulatórias hormonais que podem afetar a estabilidade de membrana de eritrócitos:

Estabilidade é uma propriedade usada para avaliar a capacidade de preservação de uma determinada estrutura ou sistema organizacional diante de fatores interferentes como alterações em sua composição – o que é relevante no caso particular da membrana de eritrócitos – ou da composição e propriedades do

meio. A estabilidade é uma propriedade termodinâmica e se refere a um processo de equilíbrio, tipicamente determinado em um tempo fixo mas suficientemente longo para que o equilíbrio seja atingido ³⁴.

Quando o fator interferente é o calor, tem-se a estabilidade térmica. Quando é um agente químico desnaturante, como etanol, ureia, hidrócloro de guanidínio e dodecilsulfato de sódio, tem-se a estabilidade química. Quando é um fator mecânico, como a tensão de agitação, tem-se a estabilidade mecânica. Quando é um meio de baixa osmolaridade, tem-se a estabilidade osmótica ³⁵.

A estabilidade também pode ser determinada em função do tempo de ação do fator interferente, situação em que se refere a um processo cinético, útil para avaliar o tempo necessário para a agressão do fator interferente ocorrer ³⁴.

O Laboratório de Biofísicoquímica (LaBFiQ) do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia tem usado tais abordagens termodinâmicas e cinéticas para investigação da estabilidade de membrana de eritrócitos em diferentes situações. Estas situações compreendem o estudo da influência de solutos desnaturantes, como calor, etanol, ureia, hidrócloro de guanidínio e dodecilsulfato de sódio ^{33,37,110}; agentes estabilizantes, como glicerol, sorbitol e glicose ^{37,79}; defensivos agrícolas, como atrazina e glifosato de sódio ¹¹¹; produtos naturais ¹¹²; envelhecimento ^{34,113,114}; restrição nutricional, como a que ocorre na cirurgia bariátrica ¹¹⁵; alterações circadianas de sono, como no trabalho em turno ¹¹⁶; diferentes tipos de exercício ^{117,118} e de processos patológicos, como esclerose múltipla ¹¹⁹, tremor essencial ¹²⁰, malária ¹²¹, aterosclerose ³¹, doenças hipertensivas da gestação ^{35,122}, *diabetes mellitus* tipo 1 ¹⁴, e, agora, *diabetes mellitus* tipo 2. A influência de variáveis metabólicas sanguíneas e de propriedades e índices hematimétricos tem sido uma preocupação constante dos estudos desenvolvidos mesmo em populações saudáveis ³², onde a identificação da existência de subgrupos de populações de indivíduos em relação à estabilidade osmótica de eritrócitos pode ter implicações nas vulnerabilidades hematológicas desses indivíduos diante de diferentes processos patológicos ¹²³.

A estabilidade osmótica de eritrócitos

A determinação da estabilidade osmótica de eritrócitos pode ser feita com a utilização do chamado teste de Fragilidade Osmótica (FO), que consiste na submissão de uma dada população de eritrócitos a soluções com concentrações entre 0 e 0,9% de NaCl, seguida de incubação a uma dada temperatura e análise da concentração da hemoglobina liberada em cada concentração de NaCl pela medida da absorbância de luz a 540 nm por espectrofotometria ^{113,124}.

As medidas de absorbância a 540 nm (A) a cada concentração de NaCl (X) são ajustadas à curva de fragilidade osmótica com a utilização de regressão sigmoidal de acordo com a equação de Boltzmann:

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

A Fig. 2 do capítulo 2 (página 59) desta tese apresenta uma típica curva sigmoidal de fragilidade osmótica de eritrócitos. Essa sigmoide deve ser vista da direita, à concentração de NaCl de 0.9%, ou seja, em condição isotônica com o sangue, para a esquerda, ou seja, acompanhando a hipotonicidade do meio. O platô inferior à direita da curva indica o valor de A_{min} , que representa a absorbância da hemoglobina livre presente na amostra de sangue utilizada. Este platô termina na concentração salina H_0 , onde a diminuição na concentração de NaCl começa a promover uma elevação na quantidade de hemoglobina livre, dada pela absorbância a 540 nm, em decorrência da hemólise hipotônica. A liberação de hemoglobina, em função da hemólise hipotônica termina na concentração salina H_{100} , ou seja, no início do platô superior à esquerda, o qual indica o valor de A_{max} , que representa a absorbância da hemoglobina livre proveniente da hemólise total da amostra de sangue utilizada. O valor intermediário de absorbância entre A_{min} e A_{max} indica o ponto em que a hemoglobina liberada pela hemólise representa 50% da quantidade de hemoglobina total liberada com a diminuição da tonicidade da solução. A concentração salina correspondente a esse ponto é H_{50} , o qual é usado para **estimar** o valor da concentração salina capaz de promover 50% de lise da população de eritrócitos presente na amostra de sangue utilizada no ensaio, embora o que H_{50} represente efetivamente seja a concentração salina em que a metade da quantidade de hemoglobina presente na população de eritrócitos que está sofrendo hemólise hipotônica foi liberada no meio. Já dX representa $\frac{1}{4}$ da variação na concentração de NaCl responsável pela lise de toda a população de

eritrócitos em estudo, ou seja, $\frac{1}{4}$ da diferença de concentração salina existente entre H_0 e H_{100} ^{32,38,114}.

As constantes A_{min} , A_{max} , H_{50} e dX são constantes presentes na própria equação de Boltzman (equação 1) e por isso determinadas com a aplicação do modelo de regressão sigmoidal mencionado anteriormente. As constantes H_0 e H_{100} não são constantes internas daquela equação, mas podem ser facilmente determinadas com a utilização das seguintes equações:

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

$$H_{100} = H_{50} - 2dX \quad (3).$$

As constantes H_0 , H_{50} e H_{100} são constantes de fragilidade osmótica e por isso apresentam uma relação inversa com a estabilidade de membrana. O inverso dos valores de H_0 , H_{50} e H_{100} , ou seja, $1/H_0$, $1/H_{50}$ e $1/H_{100}$, podem ser usados para expressar a estabilidade osmótica de eritrócitos ¹¹⁹.

Já a constante dX tem um significado mais complexo. Ela reflete a heterogeneidade da população de eritrócitos em relação à vulnerabilidade à lise hiposmótica. Valores muito pequenos de dX significam a existência de menor heterogeneidade e maior vulnerabilidade à lise diante de alterações mais discretas na salinidade do meio, com a ocorrência de uma linha de hemólise abrupta, envolvendo o conjunto dos eritrócitos. Maiores valores de dX significam maior heterogeneidade na população de eritrócitos, com a existência de um espectro mais amplo de estabilidade osmótica e a ocorrência de uma linha de hemólise menos íngreme, envolvendo populações de eritrócitos com menor e com maior estabilidade. Em suma, dX aumenta com o aumento na heterogeneidade celular quanto à vulnerabilidade à lise, ou seja, com o aumento na amplitude de distribuição da estabilidade osmótica ⁸⁷.

A constante A_{min} também expressa a fragilidade dos eritrócitos, pois quanto maior é seu valor maior é a quantidade de hemoglobina livre mesmo em condições isotônicas com o sangue. Já A_{max} deve expressar os níveis de hemoglobina total no sangue e os valores de hematócrito ^{38,114}.

O Protocolo Operacional Padrão para avaliação da estabilidade osmótica de eritrócitos, preparado pela equipe de pesquisadores do LaBFiQ, pode ser acessado na seção de Anexos desta tese (**Anexo 1**).

Uma vez que o tempo e a própria temperatura de armazenamento podem afetar a estabilidade de eritrócitos ¹²⁵, é relevante ter estas variáveis sob controle, embora um armazenamento da amostra de sangue entre 4 e 8 °C por até 4 dias não tenha afetado as constantes de estabilidade osmótica aqui consideradas ¹²⁶.

Estabilidade osmótica de eritrócitos, composição de membrana e composição do plasma

As alterações na composição da membrana do eritrócito mediante a lipoperoxidação de ácidos graxos polinsaturados de seus fosfolipídeos ^{60,127} e a influência da própria lipidemia ^{57,95} podem afetar propriedades de membrana como fluidez, deformabilidade, estabilidade e viscosidade ^{31,123 26,64,95,128,129}. É por isso que a diminuição da colesterolemia foi associada à diminuição da viscosidade sanguínea ¹³⁰.

Entretanto, a relação de uma propriedade de membrana com a colesterolemia não deve seguir um padrão linear, como de fato foi observado para a estabilidade osmótica. Em uma população de voluntários saudáveis, a estabilidade osmótica de eritrócitos apresentou um maior valor quando os níveis de LDL-colesterol eram próximos a 90 mg/dL e caía tanto abaixo quanto acima deste valor ¹²³. Isto é muito relevante não só porque reflete a influência da lipidemia na homeostase estrutural da membrana de eritrócitos, mas também porque sugere que a avaliação da estabilidade de membrana possa ajudar a entender e mesmo avaliar o risco de desenvolvimento de processos degenerativos associados à elevação de LDL-colesterol ^{11,32,116,131}, especialmente diante do fato de o eritrócito ser também ser um ator importante no desenvolvimento da aterosclerose ^{31,132}, condição que constitui uma das complicações vasculares do T2D ¹⁸⁻²⁰.

***Diabetes mellitus* tipo 2, anemia, características hematimétricas e estabilidade osmótica de eritrócitos**

Quando se fala de propriedades de eritrócitos, a consideração de características hematimétricas como volume e concentração de hemoglobina é também essencial ^{124,133}, uma vez que a hemoglobina, além da ligação e transporte de gases, tem outras funções, como a regulação da entrada de água e do próprio volume das células vermelhas do sangue. É por isso que a estabilidade osmótica, mas também a deformabilidade e a viscosidade de eritrócitos, tem relação com o volume corpuscular médio e com a concentração de hemoglobina ^{30,61,70}.

Como o diabetes tem sido frequentemente associado a anemia ¹³⁴⁻¹⁴⁰, especialmente quando não se tem controle glicêmico adequado ^{17,141}, a doença afeta propriedades como a estabilidade de eritrócitos ¹²⁷.

A etiologia e a patogênese da anemia em T2D são multifatoriais. Hiperglicemia crônica pode resultar em alterações na estrutura de eritrócitos, estresse oxidativo e denervação simpática do rim relacionada à neuropatia autonômica ¹⁴², embora a anemia possa ocorrer mesmo quando a função renal permanece preservada ^{134,140}. Mas diminuições dos níveis de ferro e da degradação do grupo heme foram associadas ao processo inflamatório ligado à resistência à insulina em homens e mulheres com hiperglicemia ^{143,144}.

O diagnóstico de anemia é feito de acordo com o sexo, idade e etnia ^{9,145-147} e compreende a dosagem de hemoglobina que é feita no eritrograma. Embora esse exame seja de baixo custo, ele tem baixa sensibilidade para a medida da reserva de ferro ¹⁴⁸.

A classificação da anemia pode ser refinada com a utilização de parâmetros associados ao volume corpuscular médio (MCV). Valores aumentados da largura de distribuição de volume dos eritrócitos (RDW) e diminuídos da concentração corpuscular média de hemoglobina (MCHC), variáveis também incluídas no eritrograma completo, indicam tendência à anemia por deficiência de ferro. O índice de reticulócitos também desempenha um papel essencial no diagnóstico diferencial de anemia ^{9,147,149}.

Embora o RDW seja usado de rotina para a classificação de anemias ¹⁴⁹, valores elevados de RDW têm sido utilizado como indicadores de prognóstico de várias condições clínicas, como doenças vasculares cardíacas ^{31,150-161}, cerebrais ¹⁶² e periféricas ¹⁶³, bem como a outras doenças frequentemente associadas ao T2D, como a nefropatia diabética ¹⁶⁴⁻¹⁶⁸.

Valores elevados de RDW têm sido utilizados até mesmo como indicador de inflamação ^{169,170} e preditor de risco de morte por diferentes causas ¹⁷¹⁻¹⁷⁴.

Como os valores de RDW são frequentemente maiores em diabéticos do que em não diabéticos ^{46,175,176} e têm sido testados até como preditor de risco de desenvolvimento de T2D ¹⁷⁷, seria interessante entender a origem dessa elevação no RDW.

Muito possivelmente a elevação dos valores de RDW no T2D deve estar associada a múltiplos fatores.

Um primeiro fator seria o desenvolvimento de anemia por deficiência de ferro. De fato, valores mais elevados de RDW e concentrações mais baixas de ferro sérico têm sido encontradas em indivíduos hiperglicêmicos ^{143,144} e diabéticos ¹⁷⁸. A associação da diminuição dos níveis de ferro com a elevação de proteína C-reativa em indivíduos hiperglicêmicos ^{143,144} e os valores elevados do índice de saturação de transferrina encontrados em diabéticos ¹⁷⁸ indicam associação da tendência à anemia por deficiência de ferro à inflamação.

Um segundo fator seria a glicação de proteínas do citoesqueleto de eritrócitos em indivíduos com mal controle glicêmico ¹⁷⁹, levando a aumento na variabilidade de tamanho dessas células e elevação dos valores de RDW ⁹. De fato, isso justifica a correlação observada entre os valores de RDW e da fração A1c da hemoglobina glicada (HbA1c) e sugere até mesmo a utilização do RDW no diagnóstico e monitoramento do estado glicêmico ¹⁸⁰.

Um terceiro fator seria a ocorrência de alterações na composição lipídica da membrana em resposta à agressão oxidativa ^{60,127} e da própria elevação da lipidemia presentes na doença ^{57,95}. De fato, o valor prognóstico do RDW na doença cardiovascular foi associado a aumento no teor de colesterol de membrana de eritrócitos ¹⁸¹.

Independentemente do fator responsável pela alteração nos valores de RDW, a avaliação da estabilidade de membrana de eritrócitos constitui uma estratégia analítica adequada.

Se o fator determinante para a elevação de RDW for o desenvolvimento de anemia por deficiência de ferro, a estratégia é adequada porque essa é a finalidade primária da avaliação da estabilidade osmótica de eritrócitos. A anemia por deficiência de ferro se caracteriza pela presença de eritrócitos com menor volume

e menor deformabilidade ¹⁸², o que favorece as complicações microvasculares no T2D ^{28,80}. Independentemente da existência de anemia, a perda de partes da membrana por vesiculação também produz eritrócitos menores e menos deformáveis ¹⁸³. Isso sugere que diminuição na deformabilidade e também na viscosidade do eritrócito esteja relacionada não com a diminuição de volume, mas sim com o aumento na concentração de hemoglobina ^{30,61}. De fato, em gestantes com pré-eclâmpsia, sem deficiência de ferro, a estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos aumentou com os valores mais baixos de MCHC, em decorrência da redução da pressão osmótica ¹²² e da preservação da deformabilidade e viscosidade celular.

Se o fator é a glicação de proteínas, a avaliação da estabilidade de membrana também pode ser uma estratégia adequada, uma vez que a fragilidade osmótica de membrana de eritrócitos está aumentada no T2D ^{184,185} e no diabetes gestacional ¹⁸⁶, embora a associação reportada por KUNG e colegas ¹⁸⁷ entre fragilidade osmótica de eritrócitos e hemoglobina glicada não tenha sido encontrada no T2D ¹⁸⁵ e em pacientes hiperglicêmicos ^{143,144}. Isso deve significar que a influência do T2D sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos pode ser decorrente de outras implicações da hiperglicemia.

Se o fator é a alteração na composição lipídica da membrana, a análise da estabilidade osmótica também é indicada, uma vez que ela é utilizada para analisar a influência do uso de drogas hipocolesterolemiantes sobre os níveis de colesterol de membrana de eritrócitos ¹¹⁹.

Neste sentido, a avaliação das relações existentes entre estabilidade osmótica de eritrócitos humanos em indivíduos com T2D e indicadores da homeostase do ferro, índices hematimétricos, hemoglobina glicada e lipidemia pode ajudar a entender a origem do aumento de RDW nesta doença.

Considerações finais e objetivo do estudo

As alterações hormonais presentes no *diabetes mellitus* tipo 2 podem afetar vários fatores determinantes da composição e propriedades da membrana de

eritrócitos, o que tem relação com as complicações vasculares da doença. Esta revisão buscou identificar esses fatores.

Como eles são muitos e muito complexos, isso exige a utilização de métodos de estudo bem estruturados que possam esclarecer as múltiplas relações existentes entre eles e a composição e propriedades dessa célula, especialmente em uma condição patológica tão complexa como o *diabetes mellitus* tipo 2. Sem dúvida, a análise da estabilidade osmótica de eritrócitos atende essa exigência.

Por isso, esta tese investiga as relações existentes entre estabilidade osmótica de eritrócitos humanos em indivíduos com *diabetes mellitus* do tipo 2 e indicadores da homeostase do ferro, índices hematimétricos, hemoglobina glicada e lipídemia, com o objetivo de identificar os fatores associados à elevação do índice hematimétrico RDW nesta doença.

Referências

1. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. Mar 1 2011;50(5):567-75. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006>.
2. World Health Organization. Global report on diabetes: World Health Organization. Report No.: 9789241565257. WHO2016.
3. World Health Organization. Classification of diabetes mellitus. 2019.
4. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes Care*. 2020;43(Supplement 1):S14-S31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>.
5. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2017;389(10085):2239-2251. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30058-2).
6. Flor LS, Campos MR. The prevalence of diabetes mellitus and its associated factors in the Brazilian adult population: evidence from a population-based survey. *Rev Bras Epidemiol*. Jan-Mar 2017;20(1):16-29. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201700010002>.
7. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*. Nov 2019;157:107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>.
8. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. Feb 2018;14(2):88-98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>.
9. Wang Y, Yang P, Yan Z, et al. The Relationship between Erythrocytes and Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2021;2021:6656062. <https://doi.org/10.1155/2021/6656062>.
10. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci*. 2014;11(11):1185-200. <https://doi.org/10.7150/ijms.10001>.
11. Hirano T. Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb*. Sep 1 2018;25(9):771-782. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17023>.
12. Boren J, Chapman MJ, Krauss RM, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. Jun 21 2020;41(24):2313-2330. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz962>.
13. Abdel-Moneim A, Abdel-Reheim ES, Semmler M, Addaleel W. The Impact of Glycemic Status and Metformin Administration on Red Blood Cell Indices and

Oxidative Stress in Type 2 Diabetic Patients. *Malays J Med Sci.* Jul 2019;26(4):47-60. <https://doi.org/10.21315/mjms2019.26.4.6>.

14. Rodrigues R, de Medeiros LA, Cunha LM, et al. Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment. *Diabetes Res Clin Pract.* Oct 2018;144:153-160. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.01.031>.
15. Tsalamandris S, Antonopoulos AS, Oikonomou E, et al. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *Eur Cardiol.* Apr 2019;14(1):50-59. <https://doi.org/10.15420/ecr.2018.33.1>.
16. Badawi A, Klip A, Haddad P, et al. Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes Metab Syndr Obes.* May 26 2010;3:173-86. <https://doi.org/10.2147/dmsott.s9089>.
17. AlDallal SM, Jena N. Prevalence of Anemia in Type 2 Diabetic Patients. *J Hematol.* May 2018;7(2):57-61. <https://doi.org/10.14740/jh411w>.
18. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes.* 2008;26(2):77-82. <https://doi.org/10.2337/diaclin.26.2.77>.
19. Folli F, Corradi D, Fanti P, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev.* Sep 2011;7(5):313-24. <https://doi.org/10.2174/157339911797415585>.
20. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* Jan 8 2013;17(1):20-33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.012>.
21. World Health Organization. World health statistics overview 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization; 2019.
22. Holden SE, Jenkins-Jones S, Morgan CL, Peters JR, Schernthaner G, Currie CJ. Prevalence, glucose control and relative survival of people with Type 2 diabetes in the UK from 1991 to 2013. *Diabet Med.* Jun 2017;34(6):770-780. <https://doi.org/10.1111/dme.13332>.
23. Sprague RS, Bowles EA, Achilleus D, Ellsworth ML. Erythrocytes as controllers of perfusion distribution in the microvasculature of skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf).* Jul 2011;202(3):285-92. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02182.x>.
24. Nader E, Skinner S, Romana M, et al. Blood Rheology: Key Parameters, Impact on Blood Flow, Role in Sick Cell Disease and Effects of Exercise. *Front Physiol.* 2019;10:1329. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01329>.

25. Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim CT, Suresh S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bull.* May 2010;35(5):382-388. <https://doi.org/10.1557/mrs2010.571>.
26. Cooper RA, Arner EC, Wiley JS, Shattil SJ. Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest.* Jan 1975;55(1):115-26. <https://doi.org/10.1172/JCI107901>.
27. Murador P, Deffune E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2007;29(2):168-178. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000200016>
28. Shin S, Ku Y, Babu N, Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian J Exp Biol.* Jan 2007;45(1):121-8.
29. Shiga T, Maeda N, Kon K. Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1990;10(1):9-48. [https://doi.org/10.1016/1040-8428\(90\)90020-s](https://doi.org/10.1016/1040-8428(90)90020-s).
30. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood.* Nov 15 2008;112(10):3939-48. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>.
31. da Silva Garrote-Filho M, Bernardino-Neto M, Penha-Silva N. Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* Apr 2017;19(4):17. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0653-2>.
32. Bernardino Neto M, de Avelar EB, Jr., Arantes TS, et al. Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology.* 2013;50(5-6):305-20. <https://doi.org/10.3233/BIR-130641>.
33. Cunha CC, Arvelos LR, Costa JO, Penha-Silva N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr.* Aug 2007;39(4):341-7. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9092-z>.
34. Cunha LM, Bernardino-Neto M, Garrote-Filho MdS, et al. Kinetics of hypotonic lysis of human erythrocytes. *Analytical Methods.* 2014;6(5):1377. <https://doi.org/10.1039/c3ay41404c>.
35. de Freitas MAR, da Costa AV, Medeiros LA, et al. The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia. *PLoS One.* 2019;14(3):e0212763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212763>.
36. Dimitrov DS, Jain RK. Membrane stability. *Biochim Biophys Acta.* Dec 4 1984;779(4):437-68. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90020-0).
37. Penha-Silva N, Arvelos LR, Cunha CC, et al. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry.* Jun 2008;73(1):23-9. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.04.002>.

38. Aires Rodrigues de Freitas M. *Alterações antropométricas, hemodinâmicas, hematológicas e bioquímicas na pré-eclâmpsia*. Uberlândia, MG Brasil: Universidade Federal de Uberlândia; 2017.
39. Maeda N. Erythrocyte rheology in microcirculation. *Jpn J Physiol*. Feb 1996;46(1):1-14. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.46.1>.
40. Stuart J, Kenny MW. Blood rheology. *J Clin Pathol*. May 1980;33(5):417-29. <https://doi.org/10.1136/jcp.33.5.417>.
41. Yilmaz F, Gundogdu MY. A critical review on blood flow in large arteries; relevance to blood rheology, viscosity models, and physiologic conditions. *Korea-Australia Rheology Journal*. 2008;20(4):197-211.
42. Desouky O. Rheological and electrical behavior of erythrocytes in patients with diabetes mellitus. *Rom J Biophys*. 2009;19(4):239-250.
43. Le Devehat C, Vimeux M, Khodabandehlou T. Blood rheology in patients with diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2004;30(3-4):297-300.
44. Cho YI, Mooney MP, Cho DJ. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol*. Nov 2008;2(6):1130-8. <https://doi.org/10.1177/193229680800200622>.
45. Skovborg F, Nielsen AV, Schlichtkrull J, Ditzel J. Blood-viscosity in diabetic patients. *Lancet*. Jan 15 1966;1(7429):129-31. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)91264-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)91264-5).
46. Sohn M, Lee JE, Ahn M, Park Y, Lim S. Correlation of dynamic membrane fluctuations in red blood cells with diabetes mellitus and cardiovascular risks. *Sci Rep*. Mar 26 2021;11(1):7007. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86528-0>.
47. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. Feb 18 1972;175(4023):720-31. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
48. Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta*. Jun 2014;1838(6):1451-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>.
49. Bretscher MS. Human erythrocyte membranes: specific labelling of surface proteins. *J Mol Biol*. Jun 28 1971;58(3):775-81. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90039-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90039-8).
50. Bretscher MS. A major protein which spans the human erythrocyte membrane. *Journal of Molecular Biology*. 1971// 1971;59(2):351-357. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90055-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90055-6).

51. Bretscher MS. Major human erythrocyte glycoprotein spans the cell membrane. *Nat New Biol.* Jun 23 1971;231(25):229-32. <https://doi.org/10.1038/newbio231229a0>.
52. Bretscher MS. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol.* Mar 1 1972;236(61):11-2. <https://doi.org/10.1038/newbio236011a0>.
53. Bretscher MS. Membrane structure: some general principles. *Science.* Aug 17 1973;181(4100):622-9. <https://doi.org/10.1126/science.181.4100.622>.
54. Yeagle PL. Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* Jun 2014;1838(6):1548-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.009>.
55. Escriba PV, Gonzalez-Ros JM, Goni FM, et al. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med.* Jun 2008;12(3):829-75. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00281.x>.
56. Pohorille A, Deamer D. Self-assembly and function of primitive cell membranes. *Res Microbiol.* Sep 2009;160(7):449-56. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.06.004>.
57. Brosche T. Red blood cell membrane—composition and aging. *Gerontology.* Springer; 1989:67-80.
58. de Oliveira S, Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010;44(1):63-74. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1253>.
59. Cooper RA, Diloy Puray M, Lando P, Greenverg MS. An analysis of lipoproteins, bile acids, and red cell membranes associated with target cells and spur cells in patients with liver disease. *J Clin Invest.* Dec 1972;51(12):3182-92. <https://doi.org/10.1172/JCI107145>.
60. Gabreanu GR, Angelescu S. Erythrocyte membrane in type 2 diabetes mellitus. *Discoveries (Craiova).* Jun 30 2016;4(2):e60. <https://doi.org/10.15190/d.2016.7>.
61. Mohandas N, Clark MR, Jacobs MS, Shohet SB. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *J Clin Invest.* Sep 1980;66(3):563-73. <https://doi.org/10.1172/JCI109888>.
62. Kamada T, McMillan DE, Yamashita T, Otsuji S. Lowered membrane fluidity of younger erythrocytes in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* Apr 1992;16(1):1-6.
63. Cooper RA. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med.* Aug 18 1977;297(7):371-7. <https://doi.org/10.1056/NEJM197708182970707>.
64. Cooper RA. Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct.* 1978;8(4):413-30. <https://doi.org/10.1002/jss.400080404>.

65. Marchesi VT, Furthmayr H, Tomita M. The red cell membrane. *Annu Rev Biochem.* 1976;45:667-98. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.45.070176.003315>.
66. Guizouarn H, Allegrini B. Erythroid glucose transport in health and disease. *Pflugers Arch.* Sep 2020;472(9):1371-1383. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02406-0>.
67. Benga G. The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: molecular characteristics, functions and medical implications. *Mol Aspects Med.* Oct-Dec 2012;33(5-6):518-34. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.06.001>.
68. Post RL, Merritt CR, Kinsolving CR, Albright CD. Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *Journal of Biological Chemistry.* 1960;235(6):1796-1802.
69. Marchesi VT, Palade GE. The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes. *J Cell Biol.* Nov 1967;35(2):385-404. <https://doi.org/10.1083/jcb.35.2.385>.
70. Chasis JA, Agre P, Mohandas N. Decreased membrane mechanical stability and in vivo loss of surface area reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. *J Clin Invest.* Aug 1988;82(2):617-23. <https://doi.org/10.1172/JCI113640>.
71. Marchesi VT, Steers E, Jr. Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science.* Jan 12 1968;159(3811):203-4. <https://doi.org/10.1126/science.159.3811.203>.
72. Marchesi VT. The red cell membrane skeleton: recent progress. *Blood.* Jan 1983;61(1):1-11. <https://doi.org/10.1182/blood.V61.1.1.1>.
73. Reithmeier RA, Casey JR, Kalli AC, Sansom MS, Alguel Y, Iwata S. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim Biophys Acta.* Jul 2016;1858(7 Pt A):1507-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.030>.
74. Guidotti G. Membrane proteins. *Annual review of biochemistry.* 1972;41(1):731-752.
75. van den Akker E, Satchwell TJ, Williamson RC, Toyé AM. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells Mol Dis.* Jun 15 2010;45(1):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.02.019>.
76. Tanner MJ. Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. *Curr Opin Hematol.* Mar 2002;9(2):133-9. <https://doi.org/10.1097/00062752-200203000-00009>.
77. Bosman GJ, Stappers M, Novotny VM. Changes in band 3 structure as determinants of erythrocyte integrity during storage and survival after transfusion. *Blood Transfus.* Jun 2010;8 Suppl 3(Suppl 3):s48-52. <https://doi.org/10.2450/2010.008S>.

78. El-Beyrouthy J, Freeman E. Characterizing the Structure and Interactions of Model Lipid Membranes Using Electrophysiology. *Membranes (Basel)*. Apr 27 2021;11(5). <https://doi.org/10.3390/membranes11050319>.
79. Lemos GS, Marquez-Bernardes LF, Arvelos LR, Paraiso LF, Penha-Silva N. Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell Biochem Biophys*. Dec 2011;61(3):531-7. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9235-z>.
80. Shin S, Ku YH, Ho JX, Kim YK, Suh JS, Singh M. Progressive impairment of erythrocyte deformability as indicator of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2007;36(3).
81. Shin S, Ku YH, Suh JS, Singh M. Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose media. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2008;38(3):153-61.
82. Baba Y, Kai M, Kamada T, Setoyama S, Otsuji S. Higher levels of erythrocyte membrane microviscosity in diabetes. *Diabetes*. Dec 1979;28(12):1138-40. <https://doi.org/10.2337/diab.28.12.1138>.
83. Morey M, O'Gaora P, Pandit A, Helary C. Hyperglycemia acts in synergy with hypoxia to maintain the pro-inflammatory phenotype of macrophages. *PLoS One*. 2019;14(8):e0220577. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220577>.
84. de Back DZ, Kostova EB, van Kraaij M, van den Berg TK, van Bruggen R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol*. 2014;5:9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00009>.
85. Thiagarajan P, Parker CJ, Prchal JT. How Do Red Blood Cells Die? *Front Physiol*. 2021;12:655393. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.655393>.
86. Marks PA, Johnson AB. Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 1958;11(37):1542–1548.
87. Rifkind JM, Araki K, Hadley EC. The relationship between the osmotic fragility of human erythrocytes and cell age. *Arch Biochem Biophys*. Apr 15 1983;222(2):582-9. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90556-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90556-8).
88. Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol*. Aug 31 2018;17(1):121. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0763-3>.
89. Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res*. Aug 6 2004;95(3):233-8. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000137876.28454.64>.
90. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. Jun 2005;54(6):1615-25. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>.

91. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. Apr 15 2015;6(3):456-80. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>.
92. Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*. Dec 1992;15(12):1835-43. <https://doi.org/10.2337/diacare.15.12.1835>.
93. Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism*. Feb 2000;49(2 Suppl 1):9-13. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(00\)80078-5](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80078-5).
94. Sharma Y, Saxena S, Mishra A, Saxena A, Natu SM. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *J Ocul Biol Dis Infor*. Dec 2012;5(3-4):63-9. <https://doi.org/10.1007/s12177-013-9104-7>.
95. Cooper RA, Jandl JH. Bile salts and cholesterol in the pathogenesis of target cells in obstructive jaundice. *J Clin Invest*. Apr 1968;47(4):809-22. <https://doi.org/10.1172/JCI105775>.
96. Weijers RN. Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev*. Sep 2012;8(5):390-400. <https://doi.org/10.2174/157339912802083531>.
97. Weijers RN. Membrane flexibility, free fatty acids, and the onset of vascular and neurological lesions in type 2 diabetes. *J Diabetes Metab Disord*. 2015;15:13. <https://doi.org/10.1186/s40200-016-0235-9>.
98. Kroger J, Jacobs S, Jansen EH, Fritsche A, Boeing H, Schulze MB. Erythrocyte membrane fatty acid fluidity and risk of type 2 diabetes in the EPIC-Potsdam study. *Diabetologia*. Feb 2015;58(2):282-9. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3421-7>.
99. Allen HG, Allen JC, Boyd LC, Alston-Mills BP, Fenner GP. Determination of membrane lipid differences in insulin resistant diabetes mellitus type 2 in whites and blacks. *Nutrition*. Nov-Dec 2006;22(11-12):1096-102. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.07.007>.
100. Koehrer P, Saab S, Berdeaux O, et al. Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated fatty acid composition in diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2014;9(9):e106912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106912>.
101. Mahendran Y, Agren J, Uusitupa M, et al. Association of erythrocyte membrane fatty acids with changes in glycemia and risk of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. Jan 2014;99(1):79-85. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.069740>.
102. Ferreri C, Masi A, Sansone A, et al. Fatty Acids in Membranes as Homeostatic, Metabolic and Nutritional Biomarkers: Recent Advancements in Analytics and Diagnostics. *Diagnostics (Basel)*. Dec 22 2016;7(1):1. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010001>.

103. Ma W, Wu JH, Wang Q, et al. Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr.* Jan 2015;101(1):153-63. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.092601>.
104. Mozaffarian D, de Oliveira Otto MC, Lemaitre RN, et al. trans-Palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr.* Apr 2013;97(4):854-61. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.045468>.
105. Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol.* 2014;5:84. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>.
106. Maurya PK, Kumar P, Chandra P. Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. *World J Methodol.* Dec 26 2015;5(4):216-22. <https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i4.216>.
107. Lubrano V, Balzan S. Enzymatic antioxidant system in vascular inflammation and coronary artery disease. *World J Exp Med.* Nov 20 2015;5(4):218-24. <https://doi.org/10.5493/wjem.v5.i4.218>.
108. Abd El-Kader SM, Saïem Al-Dahr MH. Impact of weight loss on oxidative stress and inflammatory cytokines in obese type 2 diabetic patients. *Afr Health Sci.* Sep 2016;16(3):725-733. <https://doi.org/10.4314/ahs.v16i3.12>.
109. Becatti M, Marcucci R, Gori AM, et al. Erythrocyte oxidative stress is associated with cell deformability in patients with retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost.* Nov 2016;14(11):2287-2297. <https://doi.org/10.1111/jth.13482>.
110. Fonseca LC, Arvelos LR, Netto RC, Lins AB, Garrote-Filho MS, Penha-Silva N. Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. *J Bioenerg Biomembr.* Oct 2010;42(5):413-8. <https://doi.org/10.1007/s10863-010-9310-y>.
111. Rodrigues HG, Penha-Silva N, de Araújo MFP, Nishijo H, Aversi-Ferreira TA. Effects of Roundup® pesticide on the stability of human erythrocyte membranes and micronuclei frequency in bone marrow cells of Swiss mice. *The Open Biology Journal.* 2011;2011(4):5459. <https://doi.org/10.2174/1874196701104010054>.
112. de Freitas MV, Netto Rde C, da Costa Huss JC, et al. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol In Vitro.* Feb 2008;22(1):219-24. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.07.010>.
113. Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, et al. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev.* Jul-Aug 2007;128(7-8):444-9. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.06.007>.
114. de Freitas MV, Marquez-Bernardes LF, de Arvelos LR, et al. Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of

erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*. Oct 2014;19(7):424-30. <https://doi.org/10.1179/1607845413Y.00000000145>.

115. Custodio Afonso Rocha V, Ramos de Arvelos L, Pereira Felix G, et al. Evolution of nutritional, hematologic and biochemical changes in obese women during 8 weeks after Roux-en-Y gastric bypass. *Nutr Hosp*. Jul-Aug 2012;27(4):1134-40. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5812>.
116. Raspante Cerqueira Teixeira K, de Medeiros LA, Mendes JA, et al. The erythrocyte membrane stability is associated with sleep time and social jetlag in shift workers. *PLoS One*. 2019;14(9):e0222698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222698>.
117. Paraiso LF, de Freitas MV, Goncalves EOAF, et al. Influence of acute exercise on the osmotic stability of the human erythrocyte membrane. *Int J Sports Med*. Dec 2014;35(13):1072-7. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1371834>.
118. Paraiso LF, Goncalves EOAF, Cunha LM, et al. Effects of acute and chronic exercise on the osmotic stability of erythrocyte membrane of competitive swimmers. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171318>.
119. de Freitas MV, de Oliveira MR, dos Santos DF, de Cassia Mascarenhas Netto R, Fenelon SB, Penha-Silva N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *J Membr Biol*. Feb 2010;233(1-3):127-34. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9232-y>.
120. Mansur PH, Cury LK, Leite JO, Pereira AA, Penha-Silva N, Andrade AO. The approximate entropy of the electromyographic signals of tremor correlates with the osmotic fragility of human erythrocytes. *Biomed Eng Online*. Jun 22 2010;9:29. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-9-29>.
121. Mascarenhas Netto RC, Fabbri C, de Freitas MV, et al. Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res*. Mar 2014;113(3):863-74. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3717-4>.
122. Aires Rodrigues de Freitas M, Vieira da Costa A, Alves de Medeiros L, da Silva Garrote Filho M, Lemos Debs Diniz A, Penha-Silva N. Are There Differences in the Anthropometric, Hemodynamic, Hematologic, and Biochemical Profiles between Late- and Early-Onset Preeclampsia? *Obstet Gynecol Int*. 2018;2018:9628726. <https://doi.org/10.1155/2018/9628726>.
123. Siqueira AF, Neto MB, Ferreira ALG, de Medeiros LA, Garrote-Filho MdS, Penha-Silva N. Stochastic modeling of hyposmotic lysis and characterization of different osmotic stability subgroups of human erythrocytes. *arXiv preprint arXiv:191003491*. 2019.
124. Walski T, Chludzinska L, Komorowska M, Witkiewicz W. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of

human red blood cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:162102.
<https://doi.org/10.1155/2014/162102>.

125. Salvagno GL, Demonte D, Dima F, Bovo C, Lippi G. Stability of refrigerated whole blood samples for osmotic fragility test. *Hematol Transfus Cell Ther*. Apr - Jun 2020;42(2):134-138. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.06.001>.
126. Bernardino Neto M. *Análise de correlações entre estabilidade de membrana de eritrócitos, níveis séricos de lipídeos e variáveis hematiméticas*. Uberlândia, MG, Brasil: Universidade Federal de Uberlândia; 2011.
127. Jain SK. Hyperglycemia Can Cause Membrane Lipid Peroxidation and Osmotic Fragility in Human Red Blood Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(35):21340-21345. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)30085-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)30085-7).
128. Garnier M, Attali JR, Valensi P, Delatour-Hanss E, Gaudoy F, Koutsouris D. Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. *Metabolism*. Aug 1990;39(8):794-8.
129. Chabanel A, Flamm M, Sung KL, Lee MM, Schachter D, Chien S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys J*. Nov 1983;44(2):171-6. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84288-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84288-X).
130. Chen G, Zhao L, Liu Y, Liao F, Han D, Zhou H. Regulation of blood viscosity in disease prevention and treatment. *Chinese Science Bulletin*. 2012;57(16):1946-1952. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5165-4>.
131. Linton MRF, Yancey PG, Davies SS, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland HJ, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Singer F, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText. com, Inc.; 2000.
132. Tziakas DN, Chalikias G, Pavlaki M, et al. Lysed Erythrocyte Membranes Promote Vascular Calcification. *Circulation*. Apr 23 2019;139(17):2032-2048. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037166>.
133. Igbokwe NA. A review of the factors that influence erythrocyte osmotic fragility. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*. 2019;16(4):1. <https://doi.org/10.4314/sokjvs.v16i4.1>.
134. Craig KJ, Williams JD, Riley SG, et al. Anemia and diabetes in the absence of nephropathy. *Diabetes Care*. May 2005;28(5):1118-23. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.5.1118>.
135. Thomas MC, MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Power D, Jerums G. Unrecognized anemia in patients with diabetes: a cross-sectional survey. *Diabetes Care*. Apr 2003;26(4):1164-9. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.4.1164>.

136. Thomas M, Tsalamandris C, MacIsaac R, Jerums G. Anaemia in diabetes: an emerging complication of microvascular disease. *Curr Diabetes Rev.* Feb 2005;1(1):107-26. <https://doi.org/10.2174/1573399052952587>.
137. Thomas MC, Cooper ME, Tsalamandris C, MacIsaac R, Jerums G. Anemia with impaired erythropoietin response in diabetic patients. *Arch Intern Med.* Feb 28 2005;165(4):466-9. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.4.466>.
138. Thomas MC, Cooper ME, Rossing K, Parving HH. Anaemia in diabetes: Is there a rationale to TREAT? *Diabetologia.* Jun 2006;49(6):1151-7. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0215-6>.
139. Thomas MC, Tsalamandris C, MacIsaac RJ, Jerums G. The epidemiology of hemoglobin levels in patients with type 2 diabetes. *Am J Kidney Dis.* Oct 2006;48(4):537-45. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.06.011>.
140. Grossman C, Dovrish Z, Koren-Morag N, Bornstein G, Leibowitz A. Diabetes mellitus with normal renal function is associated with anaemia. *Diabetes Metab Res Rev.* May 2014;30(4):291-6. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2491>.
141. Adejumo BI, Dimkpa U, Ewenighi CO, et al. Incidence and risk of anemia in type-2 diabetic patients in the absence of renal impairment. *Health.* 2012;04(06):304-308. <https://doi.org/10.4236/health.2012.46050>.
142. Singh DK, Winocour P, Farrington K. Erythropoietic stress and anemia in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* Apr 2009;5(4):204-10. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.17>.
143. Luz SY. *Diminuições dos níveis de ferro e da degradação do grupo heme estão associadas ao processo inflamatório ligado à resistência à insulina em homens hiperglicêmicos.* Uberlândia, MG, Brasil: Universidade Federal de Uberlândia; 2021.
144. Batista da Silva B. *Elevation of HbA1c in hyperglycemic women with decreased iron involves increased osmotic stability and volume variability (RDW) of red cells.* Uberlândia, MG, Brasil: Universidade Federal de Uberlândia; 2020.
145. Beutler E, Waalen J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *Blood.* Mar 1 2006;107(5):1747-50. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-3046>.
146. Tefferi A, Hanson CA, Inwards DJ. How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell count in adults. *Mayo Clinic Proceedings: Elsevier*; 2005. p. 923-936.
147. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol.* May 2016;38 Suppl 1:123-32. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12500>.

148. Cook JD. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. Jun 2005;18(2):319-32. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2004.08.022>.
149. Bessman JD, Gilmer PR, Jr., Gardner FH. Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol*. Sep 1983;80(3):322-6. <https://doi.org/10.1093/ajcp/80.3.322>.
150. Al-Kindi SG, Refaat M, Jayyousi A, Asaad N, Al Suwaidi J, Abi Khalil C. Red Cell Distribution Width Is Associated with All-Cause and Cardiovascular Mortality in Patients with Diabetes. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5843702. <https://doi.org/10.1155/2017/5843702>.
151. Allen LA, Felker GM, Mehra MR, et al. Validation and potential mechanisms of red cell distribution width as a prognostic marker in heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2010;16(3):230-238.
152. Lu YA, Fan PC, Lee CC, et al. Red cell distribution width associated with adverse cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. Dec 13 2017;18(1):361. <https://doi.org/10.1186/s12882-017-0766-4>.
153. Yoon HE, Kim SJ, Hwang HS, Chung S, Yang CW, Shin SJ. Progressive rise in red blood cell distribution width predicts mortality and cardiovascular events in end-stage renal disease patients. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126272>.
154. Dai C, Chen Z, Qian J, Ge J. Red Cell Distribution Width as a Marker of Periprocedural Myocardial Infarction in Patients with Elective Percutaneous Coronary Intervention. *J Cardiovasc Transl Res*. Oct 7 2020:1-8. <https://doi.org/10.1007/s12265-020-10073-w>.
155. Horne BD, May HT, Kfoury AG, et al. The Intermountain Risk Score (including the red cell distribution width) predicts heart failure and other morbidity endpoints. *Eur J Heart Fail*. Nov 2010;12(11):1203-13. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfq115>.
156. Patel HH, Patel HR, Higgins JM. Modulation of red blood cell population dynamics is a fundamental homeostatic response to disease. *Am J Hematol*. May 2015;90(5):422-8. <https://doi.org/10.1002/ajh.23982>.
157. Pascual-Figal DA, Bonaque JC, Redondo B, et al. Red blood cell distribution width predicts long-term outcome regardless of anaemia status in acute heart failure patients. *European journal of heart failure*. 2009;11(9):840-846.
158. Tonelli M, Sacks F, Arnold M, et al. Relation Between Red Blood Cell Distribution Width and Cardiovascular Event Rate in People With Coronary Disease. *Circulation*. Jan 15 2008;117(2):163-168. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.727545>.

159. Montagnana M, Cervellin G, Meschi T, Lippi G. The role of red blood cell distribution width in cardiovascular and thrombotic disorders. *Clin Chem Lab Med*. Dec 17 2011;50(4):635-41. <https://doi.org/10.1515/ccm.2011.831>.
160. Adamsson Eryd S, Borne Y, Melander O, et al. Red blood cell distribution width is associated with incidence of atrial fibrillation. *J Intern Med*. Jan 2014;275(1):84-92. <https://doi.org/10.1111/joim.12143>.
161. Xanthopoulos A, Giamouzis G, Melidonis A, et al. Red blood cell distribution width as a prognostic marker in patients with heart failure and diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. Jul 6 2017;16(1):81. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0563-1>.
162. Li N, Zhou H, Tang Q. Red Blood Cell Distribution Width: A Novel Predictive Indicator for Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases. *Dis Markers*. 2017;2017:7089493. <https://doi.org/10.1155/2017/7089493>.
163. Zalawadiya SK, Veeranna V, Panaich SS, Afonso L. Red cell distribution width and risk of peripheral artery disease: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *Vasc Med*. Jun 2012;17(3):155-63. <https://doi.org/10.1177/1358863X12442443>.
164. Xiong XF, Yang Y, Chen X, et al. Red cell distribution width as a significant indicator of medication and prognosis in type 2 diabetic patients. *Sci Rep*. Jun 2 2017;7(1):2709. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02904-9>.
165. Malandrino N, Wu WC, Taveira TH, Whitlatch HB, Smith RJ. Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*. Jan 2012;55(1):226-35. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2331-1>.
166. Zhang J, Zhang R, Wang Y, et al. The association between the red cell distribution width and diabetic nephropathy in patients with type-2 diabetes mellitus. *Ren Fail*. Nov 2018;40(1):590-596. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2018.1532906>.
167. Zhang M, Zhang Y, Li C, He L. Association between red blood cell distribution and renal function in patients with untreated type 2 diabetes mellitus. *Ren Fail*. May 2015;37(4):659-63. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1010938>.
168. Roumeliotis S, Stamou A, Roumeliotis A, et al. Red Blood Cell Distribution Width Is Associated with Deterioration of Renal Function and Cardiovascular Morbidity and Mortality in Patients with Diabetic Kidney Disease. *Life (Basel)*. Nov 22 2020;10(11):301. <https://doi.org/10.3390/life10110301>.
169. Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, Zoppini G, Guidi GC. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2009;133(4):628-632.

170. Clarke K, Sagunathy R, Kansal S. RDW as an additional marker in inflammatory bowel disease/undifferentiated colitis. *Dig Dis Sci.* Sep 2008;53(9):2521-3. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-0176-8>.
171. Tsuboi S, Miyauchi K, Kasai T, et al. Impact of red blood cell distribution width on long-term mortality in diabetic patients after percutaneous coronary intervention. *Circ J.* 2013;77(2):456-61. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-12-0730>.
172. Cavusoglu E, Chopra V, Gupta A, et al. Relation between red blood cell distribution width (RDW) and all-cause mortality at two years in an unselected population referred for coronary angiography. *Int J Cardiol.* May 28 2010;141(2):141-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.11.187>.
173. Patel KV, Ferrucci L, Ershler WB, Longo DL, Guralnik JM. Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. *Arch Intern Med.* Mar 9 2009;169(5):515-23. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.11>.
174. Felker GM, Allen LA, Pocock SJ, et al. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank. *J Am Coll Cardiol.* Jul 3 2007;50(1):40-7. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.067>.
175. Nada AM. Red cell distribution width in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2015;8:525-33. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S85318>.
176. Carelli-Alinovi C, Misiti F. Erythrocytes as Potential Link between Diabetes and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:276. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00276>.
177. Gang L, Lifang W. Association of the Elevated Red Blood Cell Distribution Width with the Risk of Developing Diabetes Mellitus. *Intern Med.* 2016;55(15):1959-65. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.5956>.
178. Ganz T. Anemia of Inflammation. *N Engl J Med.* Sep 19 2019;381(12):1148-1157. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1804281>.
179. S AlSalhi M, Devanesan S, K EA, et al. Impact of Diabetes Mellitus on Human Erythrocytes: Atomic Force Microscopy and Spectral Investigations. *Int J Environ Res Public Health.* Oct 26 2018;15(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph15112368>.
180. Bhutto AR, Abbasi A, Abro AH. Correlation of Hemoglobin A1c with Red Cell Width Distribution and Other Parameters of Red Blood Cells in Type II Diabetes Mellitus. *Cureus.* Aug 30 2019;11(8):e5533. <https://doi.org/10.7759/cureus.5533>.
181. Tziakas D, Chalikias G, Grapsa A, Gioka T, Tentis I, Konstantinides S. Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012;51(4):243-54. <https://doi.org/10.3233/CH-2012-1530>.

182. Yip R, Mohandas N, Clark MR, Jain S, Shohet SB, Dallman PR. Red cell membrane stiffness in iron deficiency. *Blood*. Jul 1983;62(1):99-106.
183. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, van Wijk R. Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol*. 2018;9:656. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00656>.
184. Priyadarshini KH, Latha PA, Pradnya S, Juhi A, Samatha P, Ratnam KM. Comparative study of erythrocyte fragility in diabetes mellitus and non diabetes mellitus. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*. 2015;4(1):183-185. <https://doi.org/10.5958/2319-5886.2015.00029.6>.
185. Ibanga IA, Usoro CA, Nsonwu AC. Glycaemic control in type 2 diabetics and the mean corpuscular fragility. *Niger J Med*. Jul-Sep 2005;14(3):304-6.
186. Ramana Devi CH, Hema Prasad M, Padmaja Reddy T, Reddy PP. Glycosylation of hemoglobin and erythrocyte membrane proteins mediated changes in osmotic fragility of erythrocytes. *Indian J Med Sci*. Jan 1997;51(1):5-9.
187. Kung CM, Tseng ZL, Wang HL. Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;43(4):345-51. <https://doi.org/10.3233/CH-2009-1245>.

Capítulo 2

Red Cell Distribution Width and Erythrocyte Osmotic Stability in Type 2 *Diabetes Mellitus*

Red Cell Distribution Width and Erythrocyte Osmotic Stability in Type 2 *Diabetes Mellitus*

[Amplitude da distribuição de volume e da estabilidade osmótica de eritrócitos no *diabetes mellitus* tipo 2]

Maria Aparecida Knychala, Mario da Silva Garrote-Filho*, Breno Batista da Silva, Samantha Neves de Oliveira, Sarah Yasminy Luz, Manuela Ortega Marques Rodrigues, Nilson Penha-Silva

Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

*Correspondent author: msgarrotefilho@ufu.br

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar a relação entre a variabilidade de distribuição de volume (RDW) e da estabilidade osmótica de eritrócitos em indivíduos diabéticos e não diabéticos de ambos os sexos. A amostra do estudo (N = 122) foi constituída por 53 diabéticos tipo 2 (T2D) e 69 não diabéticos (ND), sendo 21 e 22 homens em cada grupo, respectivamente. A estabilidade osmótica dos eritrócitos foi obtida pela variação da concentração salina (dX) capaz de determinar a lise hiposmótica. Maiores valores de RDW e menores concentrações de ferro sérico foram encontrados no grupo diabético quando comparados aos voluntários não diabéticos. No grupo de mulheres diabéticas, o RDW foi positivamente correlacionado com o índice de reticulócitos, e tanto RDW e dX foram negativamente correlacionados com ferro, hemoglobina, índice de saturação de transferrina, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média. Em todos os grupos estudados, o RDW correlacionou-se positivamente com o dX, principalmente no grupo diabético, onde a correlação foi mais forte. A elevação do RDW em mulheres e homens com *diabetes mellitus* tipo 2 foi associada a diminuição dos indicadores de ferro sérico. Além disso, o RDW

apresentou um significado semelhante ao dX, uma vez que eritrócitos menores, com menor teor de hemoglobina, resultaram em aumento de RDW e dX.

Palavras-chave: eritrócitos (RBC), RDW, ferro, hemoglobina, resistência osmótica eritrocitária, teste de fragilidade osmótica, T2D

Abstract

This study aimed to investigate the relationship between red cell distribution width (RDW) and erythrocyte osmotic stability in non-diabetic and diabetic individuals in both sexes. The study sample (N=122) was constituted by 53 type 2 diabetics (T2D) and 69 non-diabetics (ND), being 21 and 22 men in each group, respectively. The osmotic stability of erythrocytes was obtained by the variation in saline concentration (dX) capable of determining hypoosmotic lysis. Higher RDW values and lower serum iron concentrations were found in the diabetic group when compared to the non-diabetic volunteers. In the group of diabetic women, RDW was positively correlated with the reticulocyte index, and both RDW and dX were negatively correlated with iron, hemoglobin, transferrin saturation index, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration. In all the groups studied, RDW was positively correlated with dX, especially in the diabetic group, where the correlation was the strongest. RDW elevation in both women and men with type 2 diabetes mellitus was associated with decreased serum iron indicators. Furthermore, RDW has a similar meaning to dX, since small erythrocytes have less hemoglobin, resulting in both an increase of RDW and dX.

Keywords: red blood cells (RBC), RDW, iron, hemoglobin, erythrocyte osmotic resistance, osmotic fragility test, T2D

Introduction

Hyperglycemia, present in type 2 diabetes mellitus (T2D), has diverse effects on erythrocytes, far beyond the known process of hemoglobin glycation. These

effects include a decrease of both deformability and fluidity ¹⁻³ and lifespan ^{4,5} of these cells, in addition to increased adhesion ⁶.

The decreased erythrocyte deformability in T2D has been attributed to increased blood glucose, glycations, oxidative stress, and increased content of saturated fatty acids in its membrane ^{7,8}. Less deformable erythrocytes would contribute to the development of T2D-associated vascular complications ^{9,10}.

One of the manifestations of the lower erythrocyte deformability would be increased volume variability ¹¹, which is given by the Red Cell Distribution Width (RDW), a hematological index determined in a complete blood count. Indeed, the retrospective study of Nada and colleagues found that RDW is higher in diabetic than in non-diabetic individuals ¹². This makes sense, since elevated RDW values have been associated with diseases in which inflammatory status is elevated ¹³⁻¹⁸.

The present study further investigates the relationship between diabetes and RDW, using a transversal approach in the evaluation of blood samples of female subjects without diabetes, or T2D. Important biochemical and hematimetric variables, and erythrocyte osmotic stability parameters were analyzed.

The evaluation of erythrocyte osmotic stability is very important for the study of these cells ¹⁹⁻²⁵ and constitutes a relevant clinical tool, not only for the characterization of erythrocytopathies, but also for the study of several diseases, such as type 1 diabetes ²⁶, malaria and preeclampsia ^{27,28} and clinical interventions such as bariatric surgery ²⁹ and physical exercise ³⁰ among other situations that may affect red blood cells.

As far as we know, the present study is the first to investigate the causes of higher RDW value in type 2 diabetes, with important contributions about this issue.

Materials and Methods

Population

This study was previously authorized by the Research Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia (UFU) under registry # 56557516.0.0000.5152. The study sample had 122 individuals in all, 53 being type 2 diabetics (T2D) and 69 non-diabetics (ND). The male amount in each group was 21 and 22, respectively

(**Figure 1**). All volunteers were treated at the outpatient clinic of the UFU Clinical Hospital, dully classified according to the diagnostic criteria. The following criteria were used for diabetes diagnosis: fasting plasma glucose ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) or HbA1c $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol). The criteria used for non-diabetics were fasting plasma glucose ≤ 99 mg/dL (5.5 mmol/L) or HbA1c $\leq 5.6\%$ (38 mmol/mol). These criteria were established by the American Diabetes Association ³¹. At first the fasting was 8h, but it was considered a 12h fasting for cholesterol measurement.

Among the patients eligible to participate in the study, those with cognitive impairment and hereditary erythrocytopathies, as well as a history of abuse of alcohol and other drugs were not included. Patients, who had signed the informed consent form and decided to abandon the study, regardless of the reason, were excluded.

The diabetic patients took drugs commonly used by those affected by this disease. Such medications include: metformin from 500 to 2000 mg; statins such as simvastatin (20 to 40 mg) and rosuvastatin (10 to 20 mg); anti hypertensives such as losartan or atenolol (25 to 100 mg) or enalapril (20 to 40 mg); aspirin at 100 mg; insulin from 20 to 40 UI. Besides that, all participants with a proven vitamin B12 deficiency, especially those using metformin, received vitamin B12 supplementation with pills of 3000 or 5000 mcg.

We considered the value of HbA1c of 7% as an indicator of good glycemic control and a value of 6.5% in the diagnosis of T2D. We also established a cut off of 7% at HbA1c to compare our results with those of other authors that also studied the relationship between T2D and RDW ¹². In our study, we included just diabetics that already had the disease.

The data that support the findings of this study are openly available in Synapse at <https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn23567519>.

Collection of blood samples

Blood samples (20 mL) were collected by intravenous puncture after a night fasting of 8-12 hours, directly in evacuated tubes (Vacutainer, BD, Juiz de Fora, MG, Brazil), two containing K3EDTA, for determination of blood count and

erythrocytes osmotic stability, and two containing separating gel for the biochemical assays.

Equipment

Mass measurements were made on a precision digital scale (AND, model 870, Japan) and volume measurements were made using automatic pipettes (Labsystems, model Finnpipette Digital, Helsinki, Finland). Incubations at 37 °C were performed in a thermostated water bath (Marconi, model MA 184, Piracicaba, SP, Brazil). Centrifugations were performed in a temperature-controlled centrifuge (Hitachi Koki, model CF15RXII, Hitachinaka, Japan) and absorbance readings on UVU-VIS spectrophotometer (Hach, model DR 5000, Düsseldorf, Germany).

Determination of erythrocyte osmotic stability

Osmotic stability of the erythrocyte membrane was determined according to a previously established protocol ³², using blood samples as fast as possible, preferably on the same day, taken no more than 12 hours before assay. Blood aliquots of 10 µL were added to a duplicate set of polyethylene tubes (Eppendorf, Mexico City, Mexico) containing 1.0 mL of 0.0-1.0 g.dL⁻¹ NaCl solution, previously incubated for 10 minutes in the thermostated water bath (Marconi, model MA-184, Piracicaba, SP, Brazil) at 37 °C. After being hermetically sealed and gently agitated, the tubes were incubated under the same conditions for 30 minutes and then centrifuged at 1600 x g (Hitachi Koki, model CFR15XRII, Hitachinaka, Japan) for 10 minutes for supernatant separation and absorbance reading at 540 nm (A₅₄₀) against water (control) on a UV-VIS spectrophotometer (model DR 5000, Hach, Düsseldorf, Germany).

The hemoglobin absorbance at 540 nm (A) was plotted as a function of NaCl (X) concentration, using a sigmoidal regression routine based on the Boltzmann equation ³²,

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

in order to determine the parameter values: A_{max} and A_{min}, which represent the mean absorbance values at 540 nm in the maximum and minimum sigmoid

plateaus; H_{50} , which is the concentration of NaCl that causes 50% of hemolysis; and dX , which represents $\frac{1}{4}$ of the variation in NaCl concentration responsible for the transition between intact (A_{min}) and lysate (A_{max}) erythrocytes. The values determined by the program were accepted only when the statistical adjustment of the curve data was statistically significant ($p \leq 0.05$).

The near NaCl concentrations where lysis begins (H_0) and ends (H_{100}) were then determined according to the following equations:

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

and

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

as previously described ²⁸.

A_{min} , H_0 , H_{50} , and H_{100} are osmotic fragility variables and therefore have inverse relationships with the erythrocyte osmotic stability, but dX is effectively a stability variable, i.e., dX increases with increasing osmotic stability of these cells.

Determination of blood count and blood biochemical variables

Routine blood tests were performed at the Clinical Analysis Laboratory of the Clinical Hospital-of the Federal University of Uberlandia.

Blood counts were determined using an automated system (Sysmex America Inc., model XN 3.000, Kobe, Japan). Reticulocyte counts were performed visually. The erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined in an automated analysis system (Alifax SPA, Padova, Italy).

Dosages of total cholesterol (t-C), HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), VLDL-cholesterol (VLDL-C), triglycerides (TGC), glucose (Glu) and C-reactive protein. (CRP) were made on a Roche automated analyzer (Cobas 6000, Tokyo, Japan). Glycated hemoglobin (HbA1c) was measured by high-performance liquid chromatography (BIORAD D-10, Hercules, CA, USA).

Statistical analysis

The nature of data distribution in each group was made using the Shapiro-Wilk test. Data from most of the analyzed variables were not normally distributed and, therefore, they were expressed as median (Q1 – Q3), where Q1 and Q3 correspond to the value found in 25 and 75% of the data, organized in an ascending way. The

median, or Q2, is the value of half of the data. In a normal distribution, the median is equivalent to the mean, whereas Q1-Q3 has a similar meaning to standard deviation. The comparison between groups was made using the Mann-Whitney.

All correlation analyses were performed using the Spearman method since data distribution was not normal for most of the variables studied.

The existence of statistical significance in each analysis was admitted when the p -value was less than 0.05.

All comparative statistical analyses were performed using SPSS 21 (SPSS Inc, IBM, Chicago, IL, USA). OriginPro 2016 (Microcal, Northampton, MA, USA) was used to obtain osmotic stability parameters from Boltzmann sigmoid and R (version 3.6.1 com R studio 1.2.1335 and package corrplot) was employed to make a colored correlation matrix shown in Figure 3.

Results

Figure 2 shows an interval of a typical erythrocyte osmotic fragility curve used to determine the osmotic fragility and osmotic stability parameters considered in this study. This figure also illustrates the proposed mechanism by the increase of dX from an extension of H₁₀₀ toward lower salt concentrations. According to this idea, the bigger erythrocytes are negatively selected insofar as the size and MCHC decreases.

Table 1 presents the basic characteristics of the groups of volunteers without diabetes and with type 2 diabetes mellitus (T2D), as well as the results of the comparison between the groups of each of the studied variables. Among the differences observed in the diabetic group concerning the non-diabetic group in both sexes, there were higher RDW values and lower serum iron, transferrin saturation index (TSI), MCHC, MCH, and total cholesterol. Men did not show exclusive differences regarding baseline, however, women alone presented higher levels of CRP, leucocyte count and lower MCV.

In **Table 2** the parameters studied here were compared with individuals grouped into better (HbA1c < 7%) and worse (HbA1c ≥ 7%) glycemic control for males and females. In the case of women, we found that the volunteers with worse

glycemic control curiously presented lower levels of total cholesterol, although they had higher BMI. Still, in women with worse glycemic control, it was observed higher values of RDW, dX, reticulocytes, CRP, and lymphocytes. However, in this same group, it was also noted lower levels of plasma iron, TSI, hemoglobin, MCH and vitamin D. In both groups male and female there were higher levels of both glucose and glycated hemoglobin, which was already expected. In men with worse glycemic control there were few differences compared to the ones with better glycemic control. Among these differences the higher level of ferritin draws the attention, however there was no difference in CRP between men with worse and good glycemic control.

Figure 3 presents the results of the RDW correlation analysis with the parameters studied in the ND and T2D groups. Some of the statistically significant correlations deserve attention. In both sexes and in all or at least most groups there was positive correlation of RDW with dX and negative correlation of RDW with the following variables: H₁₀₀, MCHC, MCH and ferritin. In the correlations with all or almost all groups, the non-significant correlations presented p-values near borderline values, that is, $p = 0.1$. However, there were many important correlations found just in one of the sexes. For example, RDW presented negative correlation with both Amin and Amax just in women. On the other hand, only in men RDW presented positive correlation with CRP and negative correlation with both glucose and HbA1c.

The main correlations found in both sexes or just in men or women persisted even when adjusted for age and BMI, however, in some cases this procedure resulted in decrease of p value and correspondent beta value. Even though, the p value was still significant or borderline significant.

Discussion

RDW in T2D

The occurrence of higher RDW in T2D in relation to ND in both sexes (Table 1) was already expected since high RDW values have been found in the most diverse diseases ^{33,34}, especially chronic diseases ³⁵, among which stand out type 2 diabetes mellitus ¹². However, our work is the first one to investigate the possible

causes of high RDW in type 2 diabetes. It is possible that our findings also apply to other chronic diseases.

Most studies that have analyzed the relationship between RDW and disease are retrospective studies that use test results routinely requested to follow-up patients with a specific disease. In general, such studies do not have a great control group. Furthermore, the control group in these publications do not usually undergo the same exams that are performed on the test group. This was the case of the paper done by Nada and colleagues, which found that RDW is higher in diabetics than in non-diabetics ¹². Our study was cross-sectional and thus we could include more specific exams that are not routinely requested in diabetics and even less in non-diabetics. Such exams include, for example: iron, reticulocytes, vitamins, and many others.

It seems that one of the main factors linked to RDW elevation is linked to iron homeostasis. Indeed, higher RDW values and lower serum iron concentrations were found in diabetic than in non-diabetic volunteers of both sexes (Table 1). Although iron levels are normal, increased transferrin saturation index (TSI) in both sexes indicates a tendency towards iron deficiency anemia by inflammation ³⁶. Apparently diabetic women are suffering more from lower iron levels, since women with poor glycemic control, but not men, presented lower values of iron, TSI, hemoglobin, MCH, MCHC, and higher RDW, dX, reticulocyte (Table 2).

Other strong evidence of the relationship between RDW increase and iron homeostasis damage comes from the analysis of the correlations in Figure 3. Significant negative correlations were found of RDW with iron, TSI and hemoglobin, but just in females. In practically all groups, however, RDW correlates both with MCH and MCHC.

RDW, iron and CRP

Although type 2 diabetes could be associated with elevated serum iron levels related to undiagnosed hemochromatosis ³⁷, in the present study, both the male diabetic group and female diabetic group had lower iron levels compared to the non-diabetic counterpart (Table 1). Furthermore, women with worse glycemic control, that is, HbA1c higher than 7, also presented lower levels of iron (Table 2). However,

it should be noted that the observed values do not characterize anemia since they are within the serum iron reference range, which is 33-193 µg/dL. Despite that, the lower iron concentrations found in diabetic women indicate a tendency towards iron deficiency anemia, even because transferrin saturation is lower in the diabetic women group than in the other groups (Table 1).

One possible explanation for the lower levels of iron in our diabetic patients could be an exacerbation of inflammation, since elevated values of C-reactive protein (CRP) were found and leukocytes in women with T2D (Table 1). There is also indication that diabetic men had considerable inflammation, since the ferritin was increased in males with poor glycemic control (Table 2). In inflammation, the serum iron is diminished because of both reduced absorption and increased storage³⁸. It is improbable that the lower level of iron was because of malnourishment, since levels of vitamins were normal and without differences among the groups (Table 1).

CRP had a curious behavior in relation to sex. It was increased in diabetic women in relation to non-diabetic women but presented positive correlation with RDW just in men. However, there is indication of positive association of CRP and RDW in both sexes. It is in concordance with authors that showed involvement of inflammation in higher RDW values³⁹.

RDW, iron, MCV and reticulocytes

The mean corpuscular volume (MCV) value of diabetic women was smaller than in non-diabetic women (Table 1), possibly due to the tendency to microcytosis driven by lower iron levels in the female diabetic group (Table 1) and in women with poor glycemic control (Table 2). It is an interesting result, since other authors have reported that erythrocytes from diabetics are bigger than those from non-diabetics⁴⁰⁻⁴³. These findings were obtained either by Atomic Force Microscopy^{40,41} or automated hematologic analyzer by the Coulter method^{42,43}, like our case.

The discrepancy between the MCV value we found in diabetics in relation to scientific literature probably occurred because our patients in both groups were treated for vitamin B12 deficiency, especially those treated with metformin, whose risk of presenting a vitamin B12 deficiency is higher^{44,45}. The treatment with vitamin B12 probably masked signs of a tendency toward iron deficiency. If the patients were not treated, possibly, the RDW in diabetics would be even higher. One could

ask: What if the diabetic patients receive iron supplementation? We think it would not have an effect over RDW, since the increased levels of both ferritin and CRP in diabetics suggest that the lower iron in diabetics were due to an inflammatory state^{36,46}. Furthermore, the positive correlation observed between RDW and reticulocyte index in diabetic women (Figure 3) supports the contribution of reticulocyte increase in RDW elevation.

The increase of reticulocytes probably resulted from a higher glucose media, which decrease the lifespan of erythrocyte with a resultant increase of reticulocytes^{5,47,48}. In our study it could be inferred by higher value of reticulocytes in females with poor glycemic control (Table 2).

Men probably did not present lower levels of MCV because diabetic males had significantly higher levels of iron than diabetic females ($p = 0.042$). The same occurred for non-diabetic males in relation to non-diabetic women ($p = 0.038$). The increased levels of iron in both diabetic and non-diabetic men compared to the women counterpart do not seem to be a consequence of diabetes. Naturally women require more iron than men because of menstruation and pregnancy⁴⁹. However, most women in the present study were in post menopause.

Another possible tendency to macrocytosis is metformin usage, which was used by 23% of diabetic females and by 14.3% of diabetic males. It is known that metformin is associated with vitamin B12 deficiency^{44,45}. However, there was no difference in the levels of this vitamin between the groups in the present study (Table 1), at least in part due to prophylactic supplementation in vegan patients and those with blood levels of the vitamin in the lower limit of the reference range. Other medications also commonly used by diabetics, such as statins, hypotensors, aspirin, and even insulin, does not seem to have an effect on MCV since we have not found papers reporting it *in vivo* in people with T2D. However, more studies should be done to clarify this question.

In the population studied here the RDW increases under the simultaneous influence of a factor associated with volume increase (reticulocyte) and other factors associated with volume decrease (lower iron levels)⁵⁰. Since RDW represents heterogeneity in the volume distribution of erythrocytes, this explains why, then, RDW was not correlated with MCV (Figure 3), although a positive correlation between those variables was reported in patients who underwent bariatric surgery

²⁹ and a negative correlation has been found in pregnant women with preeclampsia ²⁸.

RDW, MCHC, cholesterol and osmotic stability

Lower MCH and MCHC values were found in diabetics compared to non-diabetics (Table 1), certainly due to the lower iron levels found in that group. Lower MCHC values would result in greater erythrocyte osmotic stability, because of the lowering of internal osmotic pressure ²⁷. However, the parameters of osmotic stability were not significantly different between the studied groups (Table 1). This lack of difference in osmotic stability between the groups could, at least in part, be justified by the antagonistic influence of factors affecting this erythrocyte property. On the one hand, lower MCHC values would tend to promote increased osmotic stability ²⁷. On the other hand, lower levels of total cholesterol and LDL-cholesterol (LDL-C) in the diabetic group (Table 1), would contribute to decreased osmotic stability ⁵¹. However, it is noteworthy that there is an increased dX in women with poor glycemic control (Table 2), indicating that, in fact, erythrocyte osmotic stability really tends to be increased in diabetes, at least in women.

The lower LDL-C levels in both diabetic women and men do not seem to have a desirable meaning, as one might infer since lower LDL-cholesterol levels were associated with poor glycemic control (Table 2). These lower total cholesterol and LDL-cholesterol levels observed in the diabetic group usually are not a primary characteristic of the disease ⁵², in part by an increased synthesis of cholesterol in T2D ⁵³. Apparently, low level of cholesterol in our diabetic patients could be a consequence of cholesterol-lowering drugs, such as statins ⁵⁴. However, performed statistical analysis without statin-using participants still indicated lower levels of cholesterol in the diabetic group of both sexes. Due to its clinical relevance, it is a question that deserves further investigation.

In the bloodstream, erythrocytes interact with lipoproteins, so they can receive or deliver cholesterol to these structures ⁵⁵. Thus, much lower levels of LDL-C in diabetic women would lead to lower cholesterol levels in the erythrocyte membrane, which would lead to lower osmotic resistance, since cholesterol makes

the erythrocyte less rigid membrane ⁵⁶⁻⁵⁸ and thus more resistant to swelling due to water entry when in hypotonic medium ⁵⁶.

Some authors found positive relation between high cholesterol levels in erythrocyte membranes associated with higher RDW values in coronary artery disease patients ⁵⁹. Unfortunately, the membrane cholesterol content was not evaluated in this study, but was presumably lower in diabetic volunteers, since they presented lower levels of LDL-cholesterol. It indicates that cholesterol is not a good predictor for RDW values, since cholesterol can be increased or decreased according to the disease, whereas cholesterol tends to be increased.

RDW, dX and H100

Although the osmotic stability parameters were not different among the groups, there was important correlation of RDW with both dX (positive) and H₁₀₀ (negative) in practically all groups. The dX by itself is not enough to indicate if osmotic stability has increased or decreased. According to our hypothesis shown in Figure 2, reticulocytes would increase dX by increasing values of H₀, whereas small erythrocytes with low MCHC would increase dX by decreasing values of H₁₀₀. Thus, the negative correlation between dX and H₁₀₀ (Figure 3) is not surprising. Correlations involving osmotic stability parameters like dX and its boundaries (H₀ and H₁₀₀) are very scarce in the literature. Some correlations containing these parameters are just present in more recent publications of our research group, specifically in a study with pregnant women ^{27,28,60}. However, this is the first time that a solid hypothesis is made to clarify the positive correlation between RDW and dX (Figure 2), although this correlation has also been found in a study comprehending healthy subjects ⁶⁰. Essentially, with few exceptions indicated along the text, all correlations which have stability parameters appear here for the first time.

The association of RDW with dX, not only in the diabetic group but also in the other groups (Figure 3) shows that dX has an equivalent meaning to that of the RDW in expressing heterogeneity in the distribution of erythrocyte population volumes (Figure 2). This similarity certainly comes from the fact that an increase in the amount of smaller erythrocyte, is due to the tendency of an iron deficiency anemia ³⁸, which is responsible for both the elevation of RDW and osmotic

resistance. The RDW would rise because these smaller erythrocytes enhance the volume difference among erythrocytes. On the other hand, these smaller erythrocytes are also hypochromic, i.e. they have lesser hemoglobin content, resulting in an increase of osmotic resistance ²⁷.

Interestingly, dX showed significant negative correlations with MCHC in both sexes (Figure 3). This means that the increase in erythrocyte stability is being driven by the decrease in hemoglobin concentration in erythrocytes, certainly due to decreased osmotic pressure ^{28,61}. Indeed, this corroborates the negative correlation observed between RDW and H₁₀₀ in the diabetic women group (Figure 3), since H₁₀₀ represents the lowest saline concentration in which the most osmotically resistant erythrocytes will suffer lysis. The negative correlation of dX with MCHC shows that these osmotically more resistant erythrocytes are probably those with lower hemoglobin content.

The negative correlation of RDW with both HbA1c and glucose in diabetic men is very intriguing and there is not a simple answer for that. For example, Engstrom and colleagues found positive correlation between RDW and HbA1c in both male and female diabetics, but negative correlation between RDW and glucose ⁶². Other authors also found positive correlation between RDW and HbA1c, but in non-diabetics ^{63,64}. However, concerning diabetes, some authors, like us, found negative correlation between RDW and HbA1c ⁶⁵, whereas other authors also studying T2D did not find any correlation between these two variables neither in male nor in female ⁶⁶. Thus, there is no consensus about the true direction of the correlation between RDW and HbA1c in diabetes yet.

Engstrom and colleagues explained their results based on the short duration of erythrocytes in glucose rich media, as characteristic of T2D. However, this hypothesis better explains the negative correlation of RDW and glucose, in accordance with our results ⁶². In our study, contrary to that of Engstrom and colleagues, the correlations of RDW with both HbA1c and glucose had the same direction, since both were negative. However, such correlations were restricted to the diabetic men group. We hypothesized that our results regarding these two correlations could be explained by increase of reticulocytes as a result of reduction of erythrocyte lifespan ⁶⁷.

Limitations and perspectives

Unfortunately, this study did not evaluate membrane cholesterol content, which certainly represents an important limitation. But surely this is a question that deserves further exploration since the evident equivalence of meaning between RDW and dX suggests that this osmotic stability variable may also have the same predictive power that has been attributed to RDW. Another important limitation is the lack of a test for erythropoietin.

Our study would be even better if we had measured the erythrocyte lifespan. Some studies have shown that older erythrocytes present decreased osmotic resistance ^{68,69}. It is in accordance with our study, since we have signs that the erythrocyte lifespan was decreased, with a lower number of older erythrocytes, as indicated by the increase in reticulocytes. Thus, whereas old erythrocytes decrease osmotic resistance, the young ones, especially reticulocytes, would increase the osmotic resistance. The measure of erythrocyte aging was not performed because of technical limitations.

The small number of men in the study can also be considered a limitation. Although, for some authors, an amount of about 10 individuals would be enough to perform a correlation. ⁷⁰ Others propose a sample size much higher, especially in the case of the Spearman correlation. In general, the higher the correlation coefficient, the lower the sample necessary ⁷¹. However, a correlation coefficient above 0.7 can be a sign of collinearity and deserve attention ⁷². Thus, even a very high correlation coefficient can be useless, even with a sufficient sample size. Otherwise, many statistical values are based on conventions, as the own value of significance.

Conclusion

In the present study, the increase in red cell distribution width (RDW) observed in women and men with type 2 diabetes mellitus occurred mainly by decreased iron levels in both groups. The iron lowering presumably resulted in lower MCHC and, consequently, an increase in osmotic stability. Decreasing of MCV should be expected, but that certainly did not happen because of increased

reticulocyte index as a result of reduction of erythrocyte lifespan due to high glucose media typical of type 2 diabetes.

Since RDW was positively correlated with dX and negatively with H₁₀₀ in virtually all studied groups, it indicates that an increase of RDW is related to an increase of erythrocyte osmotic stability independently of the presence of type 2 diabetes. Thus, both dX and H₁₀₀ could be considered intrinsic properties of erythrocytes.

Our results suggest that RDW has a similar meaning to dX, especially because of small hypochromic erythrocytes, which are due to the tendency towards iron deficiency anemia. However, the increase of both RDW and osmotic resistance will be driven mainly by small erythrocytes, with lower MCHC.

Acknowledgments

We would like to thank Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support that has enabled the development of this study.

Conflict of interest declaration

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

Author contribution

Conceptualization: MAK, MSGF and NPS. Data curation: MAK, MSGF, BBS and SNO. Formal analysis: MSGF and BBS. Funding acquisition: NPS. Investigation: all authors. Methodology: MAK and NPS. Project administration: MAK, MSGF and NPS. Resources: MAK. Software: MSGF and BBS. Supervision and validation: MSGF and NPS. Visualization: MAK and MSGF. Writing - original draft: all authors. Writing - review & editing: MAK and MSGF.

Correspondence

Av Acre, 1004. Bloco 2E. Sala 231. Bloco 2E. Campus Umuarama. Universidade Federal de Uberlândia. CEP 38.405-325.

e-mail: msgarrotefilho@ufu.br

Table 1. Baseline Characteristics of non-diabetic (ND) and diabetic (T2D) female and male*

Parameters	Women			Men		
	ND (n=47)	T2D (n=32)	p	ND (n=22)	T2D (n=21)	p
Age (years)	58.5 (50.8-66.3)	62.5 (58-69.8)	0.10	60.5 (44-67.5)	60.5 (56-71)	0.43
Body Mass Index (kg/m ²)	26.3 (24-28.1)	29.6 (25.7-32.4)	<0.01	27.8 (24.4-29.5)	28.6 (26.3-31.8)	0.13
Ethnicity**						
White	46.8% (22)	53.1% (17)		59.1% (13)	28.6% (6)	
Mixed	31.9% (15)	34.4% (11)		36.4% (8)	42.9% (9)	
Black	21.3% (10)	12.5% (4)		4.5% (1)	28.6% (6)	
Glucose (mmol/L)	5.2 (5-5.4)	8.2 (6.5-9.6)	<0.01	5.2 (5-5.6)	7.5 (6.1-9.9)	<0.01
HbA1c (%)	5.4 (5.3-5.6)	7.9 (6.9-9.6)	<0.01	5.4 (5.4-5.6)	7.5 (6.6-8.6)	<0.01
Total Cholesterol (mmol/L)	4.9 (4.4-5.6)	4.3 (3.6-4.9)	<0.01	4.9 (4.1-5.8)	4.3 (3.5-4.7)	0.02
LDL-Cholesterol (mmol/L)	2.8 (2.3-3.4)	2.1 (1.6-2.7)	<0.01	2.8 (2.1-3.7)	2.3 (1.8-2.9)	0.04
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1.4 (1.1-1.6)	1.2 (1-1.5)	0.08	1.1 (1-1.4)	1.1 (1-1.3)	0.56
Creatinine (mmol/L)	0.1 (0.1-0.1)	0.1 (0.1-0.1)	0.77	0.1 (0.1-0.1)	0.1 (0.1-0.1)	0.76
C-Reactive Protein (mg/L)	2.1 (1.1-4.2)	4.7 (2.1-9.5)	0.02	2.3 (0.9-5)	3.7 (1.3-5.8)	0.51
Ferritin (nmol/L)	0.4 (0.2-0.6)	0.2 (0.1-0.6)	0.18	0.5 (0.3-0.9)	0.5 (0.2-0.8)	0.98
Iron (µmol/L)	16.7 (14.8-20.8)	12.5 (10.2-19)	<0.01	21.4 (16.2-24.9)	15.1 (12.4-20.6)	<0.01
Transferin Saturation Index (%)	32.8 (25.2-41.6)	22.5 (18-27.7)	<0.01	38.6 (29.2-50.2)	29 (22.8-37)	0.04
TIBC (mmol/L)	0.5 (0.5-0.6)	0.5 (0.5-0.6)	0.11	0.5 (0.5-0.6)	0.5 (0.5-0.6)	0.50
Hemoglobin (g/dL)	135 (130-140.5)	132 (126.3-137.5)	0.06	147.5 (142.5-159)	148 (136-157.5)	0.56
Hematocrit (%)	39.7 (37.4-41.2)	39.1 (37.6-40.8)	0.42	42.8 (41.5-45)	42.9 (39.9-45.4)	0.95
RBC (million/mm ³)	4.6 (4.3-4.8)	4.6 (4.3-4.8)	0.75	4.9 (4.6-5.2)	4.9 (4.6-5.6)	0.32
MCV (fL)	86.8 (83-88.8)	84.5 (80.5-87.2)	0.03	88.5 (84.1-91.3)	85.6 (81.4-89.8)	0.13
MCH (pg)	29.9 (28.9-30.8)	28.9 (26.8-29.7)	<0.01	30.8 (29.8-31.3)	29.3 (27.6-30.7)	0.02
MCHC (mmol/L)	21.4 (20.9-21.8)	20.9 (20.4-21.3)	<0.01	21.6 (21-22.2)	21.3 (20.8-21.8)	0.09
RDW (%)	12.8 (12-13.2)	13.2 (12.6-14.6)	<0.01	12.7 (12.1-13.2)	13.2 (12.8-14)	0.02

Reticulocyte Index (%)	1.1 (0.7-1.6)	1.2 (0.8-1.8)	0.40	1.1 (0.4-2.3)	1.3 (0.6-1.9)	0.54
Leukocyte (10 ⁹ cells/mm ³)	5.7 (4.7-6.3)	7 (6-8)	<0.01	6.2 (5.3-7.3)	6.4 (5.4-7.3)	0.89
Vitamin B9 (nmol/L)	26.2 (20.6-32.6)	25.5 (20-31.6)	0.93	23.9 (15.8-31.4)	24.8 (19.8-30.9)	0.40
Vitamin B12 (pmol/L)	279.5 (230.2-409.8)	275.5 (236.4-367.6)	0.71	307.9 (227.5-392.6)	296.7 (225.6-334.6)	0.58
Medication**						
Statin	12.8% (6)	21.9% (7)		9.1% (2)	14.3% (3)	
Oral Hypoglycemic Drugs	19.1% (9)	31.3% (10)		13.6% (3)	19% (4)	
Insulin	2.1% (1)	12.5% (4)		0% (0)	19% (4)	
Anti Hypertensives	25.5% (12)	25% (8)		22.7% (5)	66.7% (14)	
Diuretics	8.5% (4)	15.6% (5)		13.6% (3)	4.8% (1)	
Anxiolytics	2.1% (1)	15.6% (5)		9.1% (2)	4.8% (1)	
Antidepressants	4.3% (2)	9.4% (3)		9.1% (2)	9.5% (2)	
Levothyroxine	2.1% (1)	9.4% (3)		9.1% (2)	4.8% (1)	
Others	21.3% (10)	34% (11)		13.6% (3)	14.3% (3)	

*The comparison between groups was made using the Mann-Whitney test, with *p*-values < 0.05 indicating statistically significant difference. **Categorical data: percentual (number). Since the amount of data in each category was too low, statistical tests between diabetics and non-diabetics were not performed

Table 2. Comparison of studied variables between groups of volunteers with better (HbA1c < 7%) and worse glycemic control (HbA1c ≥ 7%)

Parameters	Women HbA1c			Men HbA1c		
	< 7% (n=43)	≥ 7% (n=36)	p	< 7% (n=23)	≥ 7% (n=20)	p
Age (years)	58.5 (51-69.5)	61 (58-68)	0.23	63 (54-68)	58 (45-72)	0.71
Body Mass Index (kg/m ²)	26.1 (24.3-28.7)	27.9 (25.8-31.5)	0.03	27.7 (24.9-31.1)	28.7 (26.3-30.6)	0.41
Glucose (mmol/L)	5.3 (5-5.5)	7.6 (5.4-9.5)	<0.01	5.3 (5.1-5.9)	8.2 (5.3-11.2)	<0.01
HbA1c (%)	5.5 (5.3-5.9)	8.8 (7.6-10.4)	<0.01	5.5 (5.4-6.5)	8.5 (7.5-10.2)	<0.01
Total Cholesterol (mmol/L)	4.6 (4.2-5.6)	4.5 (3.9-5)	0.23	4.6 (3.9-5.7)	4.5 (3.8-5.1)	0.83
LDL-Cholesterol (mmol/L)	2.7 (1.9-3.5)	2.4 (1.8-3)	0.19	2.6 (2.1-3.6)	2.3 (1.9-2.9)	0.22
VLDL-Cholesterol (mmol/L)	0.6 (0.5-0.9)	0.5 (0.5-1)	0.35	0.6 (0.4-0.9)	0.7 (0.5-0.8)	0.65
HDL-Cholesterol (mmol/L)	1.3 (1.1-1.6)	1.3 (1-1.5)	0.33	1 (0.9-1.4)	1.1 (1-1.4)	0.47
Creatinine (mmol/L)	0.1 (0.1-0.1)	0.1 (0.1-0.1)	0.84	0.1 (0.1-0.1)	0.1 (0.1-0.1)	0.70
C-Reactive Protein (mg/L)	2.3 (0.9-6.6)	4.2 (1.8-5.7)	0.15	2.6 (1.2-9.2)	3.2 (1.1-4.7)	0.70
Ferritin (nmol/L)	0.4 (0.2-0.7)	0.2 (0.1-0.5)	0.17	0.4 (0.2-0.7)	0.6 (0.5-1)	0.02
Iron (μmol/L)	16.4 (13.7-21)	13.7 (10.9-19.3)	0.03	19.7 (14.9-23)	15.3 (14.3-22.3)	0.53
Transferrin Saturation Index (%)	32.5 (23.5-42)	24.9 (18.3-35.7)	<0.01	35.5 (25-48)	30.2 (24.4-41.7)	0.39
Total Iron Binding Capacity (mmol/L)	0.5 (0.5-0.6)	0.5 (0.5-0.6)	0.15	0.5 (0.5-0.6)	0.6 (0.5-0.6)	0.16
Hemoglobin (g/dL)	135.5 (130-140.3)	132 (124-140)	0.05	148 (141-161)	146.5 (137.8-157.8)	0.50
Hematocrit (%)	39.6 (37.7-41.2)	39 (35.9-40.7)	0.28	43.8 (41.8-45.1)	42.2 (39.9-44.7)	0.26
RBC (million/mm ³)	4.6 (4.3-4.8)	4.7 (4.2-4.8)	1.00	4.9 (4.6-5.2)	4.9 (4.6-5.5)	0.82
MCV (fL)	86.8 (83-88.7)	84.6 (82.3-88.1)	0.11	87.9 (83.8-91)	86.3 (82.2-90.4)	0.43
MCH (pg)	29.9 (28.6-30.8)	29 (27.3-29.7)	<0.01	30.7 (29.2-31.2)	29.9 (27.9-31.2)	0.36
MCHC (mmol/L)	21.3 (20.9-21.8)	20.9 (20.6-21.5)	0.03	21.2 (20.8-22)	21.4 (21.1-21.9)	0.51
Red-Cell Distribution Width (%)	12.8 (12.1-13.3)	13.2 (12.6-14.2)	<0.01	13.2 (12.7-13.9)	13 (12.3-13.3)	0.19
Reticulocyte Index (%)	1 (0.6-1.5)	1.3 (0.9-1.9)	0.03	1.1 (0.4-1.9)	1.2 (0.5-2.2)	0.82

Leukocyte Count (10 ⁹ cells/mm ³)	5.8 (5-6.7)	6.2 (5.4-7.4)	0.15	5.6 (5.2-7.3)	6.6 (5.5-7.5)	0.15
Vitamin B9 (nmol/L)	26.3 (21.1-32)	25.9 (19.4-35.6)	0.92	24.8 (15.8-31.3)	24.6 (20.9-26.7)	0.85
Vitamin B12 (pmol/L)	262 (228.5-401)	291.2 (237.2-448.6)	0.32	307.4 (217.4-375.2)	304.3 (246.1-339.3)	0.80

* Values of $p < 0.05$ indicate statistically significant differences (Mann-Whitney test).

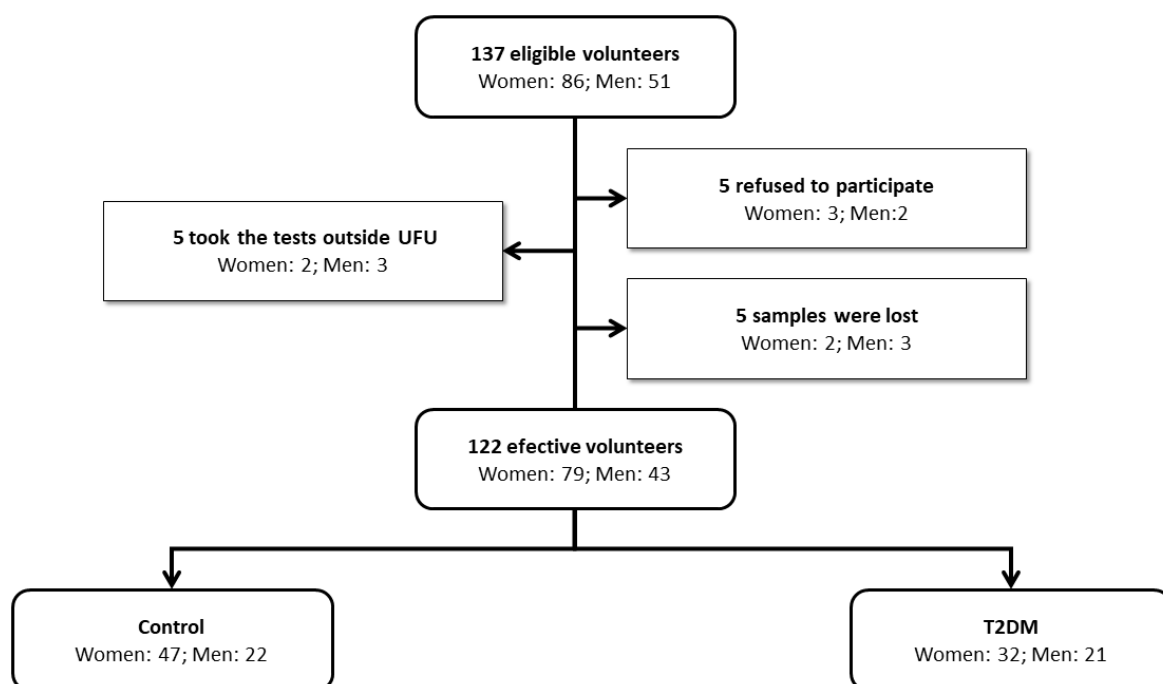


Figure 1. Flow chart of volunteers of the study.

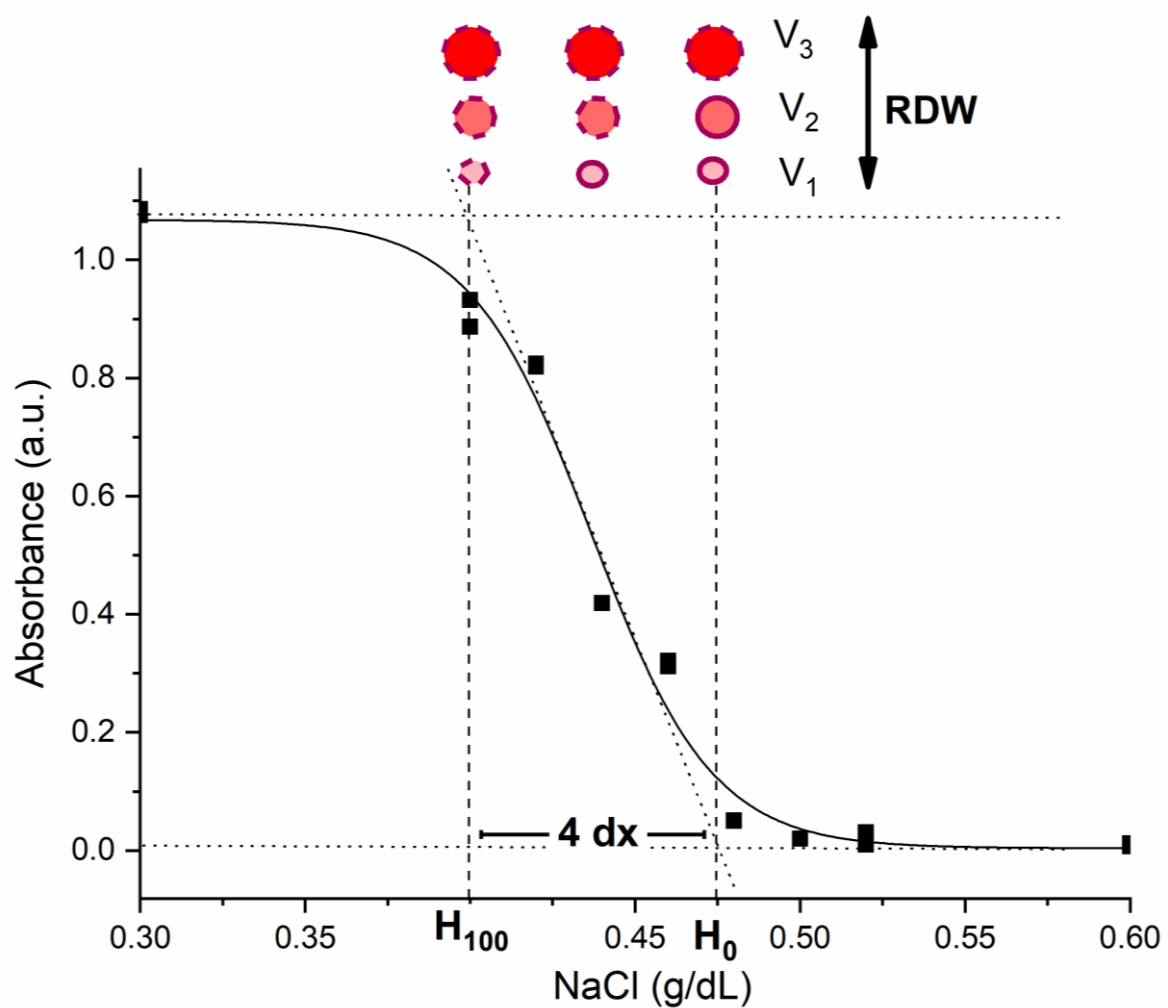


Figure 2. Osmotic fragility curve excerpt of one of the study participants. The interval $4 dx$ is delimited by H_0 and H_{100} . Reticulocytes are supposed to increase H_0 , whereas microcytic erythrocytes with low MCHC are presumed to decrease H_{100} . Thus, both micro and macrocytic erythrocytes will increase both RDW and dx . In the upper side of the figure, the circle represents erythrocytes. Each row of circles represents erythrocytes of the same size in different saline concentrations. The number of rows is correspondent to an increase in RDW. The intensity color of the circle indicates the hemoglobin concentration, which is expected to lessen insofar as erythrocytes become smaller. Circles with a continuous line around them indicate integer erythrocytes, whereas circles with a discontinuous line represent lysed erythrocytes.

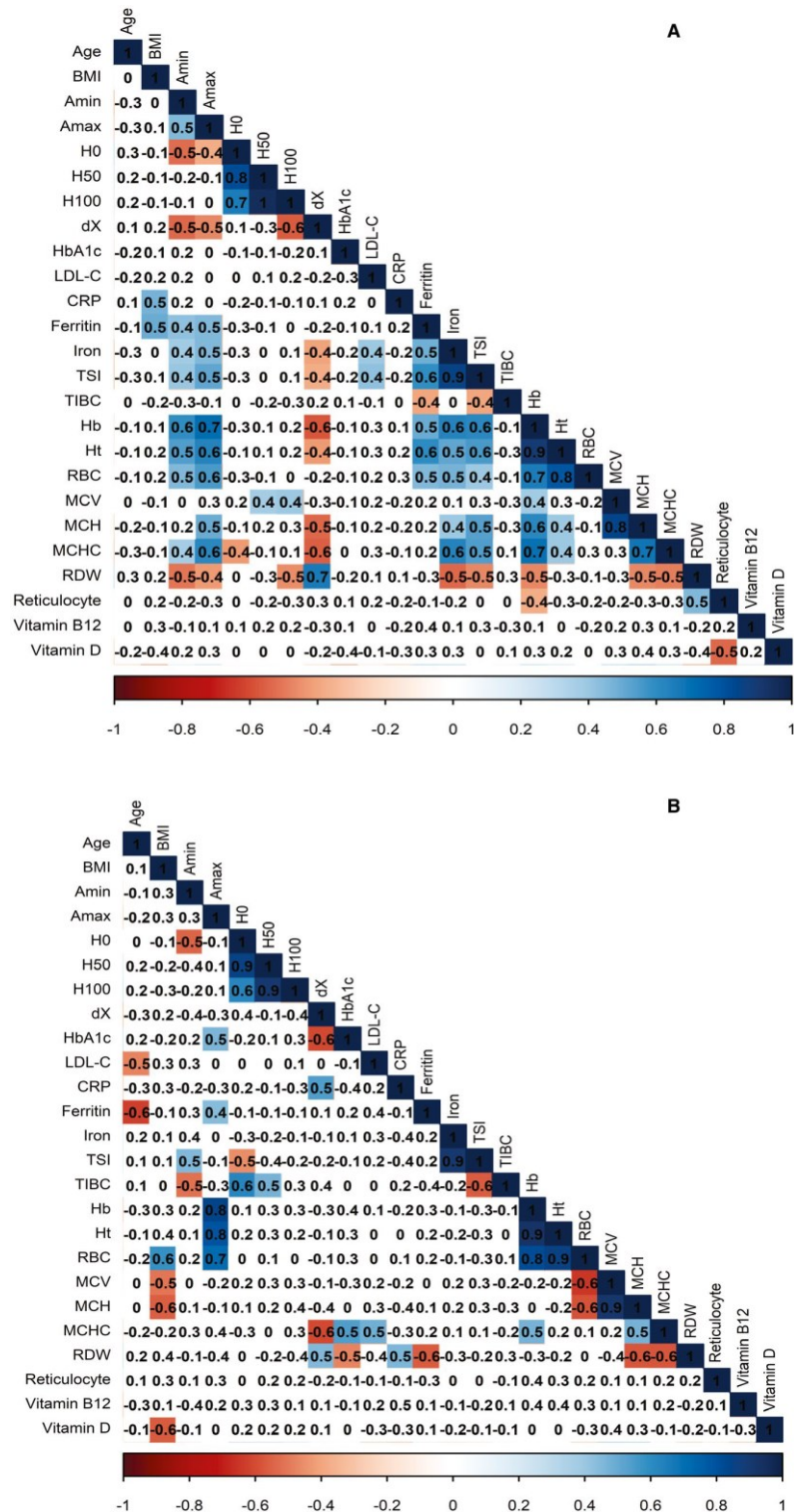


Figure 3. Spearman correlations between pairs of variables studied in the group of diabetic women (A) and men (B). The number within each box represents the Spearman's coefficient (ρ) for a specific correlation under consideration. Significant correlations were highlighted by colored shading and the color density is proportional to the correlation strength (ρ).

References

1. Kamada T, McMillan DE, Yamashita T, Otsuji S. Lowered membrane fluidity of younger erythrocytes in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* Apr 1992;16(1):1-6.
2. Singh DK, Winocour P, Farrington K. Erythropoietic stress and anemia in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* Apr 2009;5(4):204-10. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.17>.
3. Moon JS, Kim JH, Kim JH, et al. Impaired RBC deformability is associated with diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* Dec 2016;42(6):448-452. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2016.04.008>.
4. Peterson CM, Jones RL, Koenig RJ, Melvin ET, Lehrman ML. Reversible hematologic sequelae of diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* Apr 1977;86(4):425-9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-86-4-425>.
5. Virtue M, Furne J, Nuttall F, MD L. Relationship Between GHb Concentration and Erythrocyte Survival Determined From Breath Carbon Monoxide Concentration. *Diabetes Care.* 2004;27.
6. Grossin N, Wautier MP, Wautier JL. Red blood cell adhesion in diabetes mellitus is mediated by advanced glycation end product receptor and is modulated by nitric oxide. *Biorheology.* 2009;46(1):63-72. <https://doi.org/10.3233/BIR-2009-0519>.
7. Garnier M, Attali JR, Valensi P, Delatour-Hanss E, Gaudey F, Koutsouris D. Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. *Metabolism.* Aug 1990;39(8):794-8.
8. Weijers RN. Membrane flexibility, free fatty acids, and the onset of vascular and neurological lesions in type 2 diabetes. *J Diabetes Metab Disord.* 2015;15:13. <https://doi.org/10.1186/s40200-016-0235-9>.
9. Brown CD, Ghali HS, Zhao Z, Thomas LL, Friedman EA. Association of reduced red blood cell deformability and diabetic nephropathy. *Kidney Int.* Jan 2005;67(1):295-300. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00082.x>.
10. Agrawal R, Smart T, Nobre-Cardoso J, et al. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. *Sci Rep.* Mar 15 2016;6:15873. <https://doi.org/10.1038/srep15873>.
11. Patel KV, Mohanty JG, Kanapuru B, Hesdorffer C, Ershler WB, Rifkind JM. Association of the red cell distribution width with red blood cell deformability. *Adv Exp Med Biol.* 2013;765:211-216. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4989-8_29.
12. Nada AM. Red cell distribution width in type 2 diabetic patients. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.* 2015;8:525-33. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S85318>.

13. Cohen RM, Franco RS, Joiner CH. Is Poor Glycemic Control Associated With Reduced Red Blood Cell Lifespan? *Diabetes Care*. 2004;27.
14. Forhecz Z, Gombos T, Borgulya G, Pozsonyi Z, Prohaszka Z, Janoskuti L. Red cell distribution width in heart failure: prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state. *Am Heart J*. Oct 2009;158(4):659-66. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2009.07.024>.
15. Borne Y, Smith JG, Melander O, Hedblad B, Engstrom G. Red cell distribution width and risk for first hospitalization due to heart failure: a population-based cohort study. *Eur J Heart Fail*. Dec 2011;13(12):1355-61. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr127>.
16. Montagnana M, Cervellin G, Meschi T, Lippi G. The role of red blood cell distribution width in cardiovascular and thrombotic disorders. *Clin Chem Lab Med*. Dec 17 2011;50(4):635-41. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.831>.
17. Lippi G, Mercadanti M, Aloe R, Targher G. Erythrocyte mechanical fragility is increased in patients with type 2 diabetes. *Eur J Intern Med*. Mar 2012;23(2):150-3. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2011.11.004>.
18. Yin Y, Ye S, Wang H, et al. Red blood cell distribution width and the risk of being in poor glycemic control among patients with established type 2 diabetes. *Ther Clin Risk Manag*. 2018;14:265-273. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S155753>.
19. Connor DE, Cooley-Andrade O, Goh WX, Ma DD, Parsi K. Detergent sclerosants are deactivated and consumed by circulating blood cells. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Apr 2015;49(4):426-31. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.12.029>.
20. Stier A, Reichert S, Criscuolo F, Bize P. Red blood cells open promising avenues for longitudinal studies of ageing in laboratory, non-model and wild animals. *Exp Gerontol*. Nov 2015;71:118-34. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.001>.
21. Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pognas JL, Perrin C. Hemolysis by surfactants--A review. *Adv Colloid Interface Sci*. Feb 2016;228:1-16. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.10.011>.
22. Duranti G, Ceci R, Patrizio F, et al. Chronic consumption of quercetin reduces erythrocytes oxidative damage: Evaluation at resting and after eccentric exercise in humans. *Nutr Res*. Feb 2018;50:73-81. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.12.002>.
23. Lopez de Frutos L, Cebolla JJ, Irun P, Kohler R, Giraldo P. The erythrocyte osmotic resistance test as screening tool for cholesterol-related lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta*. May 2018;480:161-165. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.010>.
24. Qian H, Luo Z, Xiao C, et al. Red cell distribution width in coronary heart disease: prediction of restenosis and its relationship with inflammatory markers and lipids. *Postgrad Med J*. Sep 2018;94(1115):489-494. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2018-135806>.

25. Masuch A, Budde K, Kastenmuller G, et al. Metabolic signature associated with parameters of the complete blood count in apparently healthy individuals. *J Cell Mol Med*. Aug 2019;23(8):5144-5153. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14383>.
26. Rodrigues R, de Medeiros LA, Cunha LM, et al. Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment. *Diabetes Res Clin Pract*. Oct 2018;144:153-160. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.01.031>.
27. Aires Rodrigues de Freitas M, Vieira da Costa A, Alves de Medeiros L, da Silva Garrote Filho M, Lemos Debs Diniz A, Penha-Silva N. Are There Differences in the Anthropometric, Hemodynamic, Hematologic, and Biochemical Profiles between Late- and Early-Onset Preeclampsia? *Obstet Gynecol Int*. 2018;2018:9628726. <https://doi.org/10.1155/2018/9628726>.
28. de Freitas MAR, da Costa AV, Medeiros LA, et al. The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia. *PLoS One*. 2019;14(3):e0212763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212763>.
29. de Arvelos LR, Rocha VC, Felix GP, et al. Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. *J Membr Biol*. Mar 2013;246(3):231-42. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9524-0>.
30. Paraiso LF, Goncalves EOAF, Cunha LM, et al. Effects of acute and chronic exercise on the osmotic stability of erythrocyte membrane of competitive swimmers. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171318>.
31. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*. Jan 2019;42(Suppl 1):S13-S28. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>.
32. Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, et al. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*. Jul-Aug 2007;128(7-8):444-9. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.06.007>.
33. Perlstein TS, Weuve J, Pfeffer MA, Beckman JA. Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort. *Arch Intern Med*. Mar 23 2009;169(6):588-94. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.55>.
34. Bazick HS, Chang D, Mahadevappa K, Gibbons FK, Christopher KB. Red cell distribution width and all-cause mortality in critically ill patients. *Crit Care Med*. Aug 2011;39(8):1913-21. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31821b85c6>.
35. Li N, Zhou H, Tang Q. Red Blood Cell Distribution Width: A Novel Predictive Indicator for Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases. *Dis Markers*. 2017;2017:7089493. <https://doi.org/10.1155/2017/7089493>.
36. Ganz T. Anemia of Inflammation. *N Engl J Med*. Sep 19 2019;381(12):1148-1157. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1804281>.

37. Altamura S, Kopf S, Schmidt J, et al. Uncoupled iron homeostasis in type 2 diabetes mellitus. *J Mol Med (Berl)*. Dec 2017;95(12):1387-1398. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1596-3>.
38. Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med*. May 7 2015;372(19):1832-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401038>.
39. Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, Zoppini G, Guidi GC. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. *Arch Pathol Lab Med*. Apr 2009;133(4):628-32. <https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.4.628>.
40. Jin H, Xing X, Zhao H, et al. Detection of erythrocytes influenced by aging and type 2 diabetes using atomic force microscope. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 22 2010;391(4):1698-702. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.133>.
41. Buys AV, Van Rooy MJ, Soma P, Van Papendorp D, Lipinski B, Pretorius E. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovasc Diabetol*. Jan 28 2013;12:25. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-25>.
42. Bock H, Flückiger R, Berger W. Real and artefactual erythrocyte swelling in hyperglycaemia. *Diabetologia*. 1985;28(6):335-338.
43. Alamri B, Bahabri A, Aldereihim A, et al. Hyperglycemia effect on red blood cells indices. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2019;23:2139-2150.
44. Adams J, Clark J, Ireland J, Kesson C, Watson W. Malabsorption of vitamin B 12 and intrinsic factor secretion during biguanide therapy. *Diabetologia*. 1983;24(1):16-18.
45. Aroda VR, Edelstein SL, Goldberg RB, et al. Long-term Metformin Use and Vitamin B12 Deficiency in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *J Clin Endocrinol Metab*. Apr 2016;101(4):1754-61. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3754>.
46. Sultana G, Haque S, Sultana T, Ahmed A. Value of red cell distribution width (RDW) and RBC indices in the detection of iron deficiency anemia. *Mymensingh medical journal: MMJ*. 2013;22(2):370-376.
47. Piva E, Brugnara C, Spolaore F, Plebani M. Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clin Lab Med*. Mar 2015;35(1):133-63. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.10.004>.
48. Huang YX, Wu ZJ, Mehrishi J, et al. Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties. *J Cell Mol Med*. Dec 2011;15(12):2634-42. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01310.x>.
49. Murphy WG. The sex difference in haemoglobin levels in adults - mechanisms, causes, and consequences. *Blood Rev*. Mar 2014;28(2):41-7. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2013.12.003>.

50. Salvagno GL, Sanchis-Gomar F, Picanza A, Lippi G. Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(2):86-105. <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.992064>.
51. Bernecker C, Kofeler H, Pabst G, et al. Cholesterol Deficiency Causes Impaired Osmotic Stability of Cultured Red Blood Cells. *Front Physiol*. 2019;10:1529. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01529>.
52. Nesto RW. LDL Cholesterol Lowering in Type 2 Diabetes: What Is the Optimum Approach? *Clinical Diabetes*. 2008;26(1):8-13. <https://doi.org/10.2337/diaclin.26.1.8>.
53. Scoppola A, Testa G, Frontoni S, et al. Effects of insulin on cholesterol synthesis in type II diabetes patients. *Diabetes Care*. Oct 1995;18(10):1362-9. <https://doi.org/10.2337/diacare.18.10.1362>.
54. Forsyth AM, Braunmuller S, Wan J, Franke T, Stone HA. The effects of membrane cholesterol and simvastatin on red blood cell deformability and ATP release. *Microvasc Res*. May 2012;83(3):347-51. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.02.004>.
55. Quarfordt SH, Hilderman HL. Quantitation of the in vitro free cholesterol exchange of human red cells and lipoproteins. *Journal of lipid research*. 1970;11(6):528-535.
56. Cooper RA, Arner EC, Wiley JS, Shattil SJ. Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest*. Jan 1975;55(1):115-26. <https://doi.org/10.1172/JCI107901>.
57. Ejima J, Ijichi T, Ohnishi Y, et al. Relationship of high-density lipoprotein cholesterol and red blood cell filterability: cross-sectional study of healthy subjects. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2000;22(1):1-7.
58. Meurs I, Hoekstra M, van Wanrooij EJ, et al. HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Exp Hematol*. Nov 2005;33(11):1309-19. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.07.004>.
59. Tziakas D, Chalikias G, Grapsa A, Gioka T, Tentis I, Konstantinides S. Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2012;51(4):243-54. <https://doi.org/10.3233/CH-2012-1530>.
60. Bernardino Neto M, de Avelar EB, Jr., Arantes TS, et al. Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*. 2013;50(5-6):305-20. <https://doi.org/10.3233/BIR-130641>.
61. Lurie S, Mamet Y. Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Dec 2000;93(2):185-92.
62. Engstrom G, Smith JG, Persson M, Nilsson PM, Melander O, Hedblad B. Red cell distribution width, haemoglobin A1c and incidence of diabetes mellitus. *J Intern Med*. Aug 2014;276(2):174-83. <https://doi.org/10.1111/joim.12188>.

63. Veeranna V, Zalawadiya SK, Panaich SS, Ramesh K, Afonso L. The association of red cell distribution width with glycated hemoglobin among healthy adults without diabetes mellitus. *Cardiology*. 2012;122(2):129-32.
<https://doi.org/10.1159/000339225>.
64. Lippi G, Salvagno GL, Guidi GC. Red blood cell distribution width is significantly associated with aging and gender. *Clin Chem Lab Med*. Sep 2014;52(9):e197-9.
<https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0353>.
65. Chinmay S, Manjula S, Bekur R, Rao R. Association of increased levels of Glycated hemoglobin with variations in Red blood cell parameters in Diabetes mellitus. *International Journal of Advanced Research*. 2015;3(6).
66. Demir AD, Durmaz ZH, Kılınç Ç, Güçkan R. Correlation between red blood cell distribution width and glycated hemoglobin in diabetic and nondiabetic patients. *Russian Open Medical Journal*. 2016;5(3):e0301.
<https://doi.org/10.15275/rusomj.2016.0301>.
67. Krzyzanski W, Brier ME, Creed TM, Gaweda AE. Reticulocyte-based estimation of red blood cell lifespan. *Exp Hematol*. Sep 2013;41(9):817-22.
<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.05.001>.
68. Marks PA, Johnson AB. Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. *J Clin Invest*. Nov 1958;37(11):1542-8. <https://doi.org/10.1172/JCI103746>.
69. Orbach A, Zelig O, Yedgar S, Barshtein G. Biophysical and Biochemical Markers of Red Blood Cell Fragility. *Transfus Med Hemother*. Jun 2017;44(3):183-187.
<https://doi.org/10.1159/000452106>.
70. Aggarwal R, Ranganathan P. Common pitfalls in statistical analysis: The use of correlation techniques. *Perspect Clin Res*. Oct-Dec 2016;7(4):187-190.
<https://doi.org/10.4103/2229-3485.192046>.
71. Bonett DG, Wright TA. Sample size requirements for estimating Pearson, Kendall and Spearman correlations. *Psychometrika*. 2000;65(1):23-28.
72. Dormann CF, Elith J, Bacher S, et al. Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*. 2013;36(1):27-46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x>.

ANEXO 1

Avaliação da Estabilidade Osmótica de Eritrócitos

Avaliação da Estabilidade Osmótica de Eritrócitos

Elaborado por:	Breno Batista da Silva Manuela Ortega Marques Rodrigues Maria Aparecida Knychala Samanta Batista Silva
Revisado por:	Mario da Silva Garrote Filho
Revisado e aprovado por:	Nilson Penha-Silva

1- Preparo da Solução-Estoque de NaCl

Descrição da solução a ser preparada: 100 mL de solução-estoque de NaCl a 20% (w/v), ou seja, a 20 g/dL, utilizando reagente comercial com grau de pureza PA (Pró-Análise) ou ACS (American Chemical Society).

Material necessário: **1)** NaCl com grau de pureza PA (Pró-Análise) ou ACS (American Chemical Society, **2)** balança de precisão analítica, **3)** papel de seda com 8 por 8 cm de medida; **4)** espátula ou colher de plástico; **5)** calculadora; **6)** balão volumétrico com 100 mL de capacidade limpo e seco; **7)** frasco âmbar limpo e seco com 100 mL de capacidade; **8)** papel parafinado (*Parafilm*); **9)** etiqueta de rótulo para identificação da solução; **10)** geladeira para conservação da solução.

Protocolo Experimental Padrão (POP):

- Antes de efetuar a pesagem, corrija a massa de NaCl a ser utilizada com base em seu grau de pureza, utilizando a seguinte fórmula: **massa = 20 g x 100% ÷ pureza (%)**. Assim, para uma pureza de 99%, a massa de NaCl a ser medida deverá ser de **20,2020 g**.
- Ligue a balança de precisão analítica, prestando atenção na voltagem apropriada para o equipamento.
- Confira se a balança está nivelada, certificando-se que a bolha indicadora do nível esteja no centro do dispositivo.
- Certifique-se de que a balança esteja limpa, limpando-a com pincel e papel fino para não deixar resíduos de sal, se ela estiver suja. Faça isto antes e depois do uso.

- E. Tare a balança sem adicionar o papel de seda a ser utilizado na pesagem e depois com o papel de seda, cortado em formato quadrado e com dobras nos vértices para facilitar a retenção do sal a ser pesado e depois também o seu escoamento para dentro do balão volumétrico.
- F. Use uma espátula ou colher de plástico para fazer a transferência dos 20,2 g de NaCl para o papel de seda que está na balança. Não precisa pesar exatamente os 20,2 g. Você pode anotar um valor aproximado que tenha transferido para a seda, como um valor de 20,2082 g, por exemplo. Depois é só usar essa massa efetivamente medida na balança para fazer a correção da concentração de NaCl. A concentração da solução-estoque de NaCl será dada por: **concentração corrigida = $20,2082 \text{ g} \times 20,0000 \text{ g/dL} \div 20,2020 \text{ g} = 20,0061 \text{ g/dL}$** .
- G. Transfira a massa medida de NaCl para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade, seco, sem deixar cair sal nas paredes do balão.
- H. Adicione um volume de água ultrapura (cerca de 80 mL) para dissolver o sal, sem deixar cair gotas de água na lateral da parede interna do balão acima da marca indicativa do volume a ser completado para preparar 100 mL de solução.
- I. Tampe o balão (para evitar que alguma fração da mistura seja espirrada para fora) e agite-o cuidadosamente e em círculos, até dissolução completa do sal, sem inverter a posição do balão para não deixar gotas de água acima da marca indicativa do volume a ser completado.
- J. Complete o volume do balão com água ultrapura, utilizando o alinhamento do menisco inferior da solução com o referencial da marca indicativa do volume (de 100 mL) a ser completado. Este procedimento é feito com o balão à altura dos olhos e contra um fundo claro, para evitar erro de paralaxe. O volume da solução deve coincidir com a parte inferior da semicircunferência, concavidade ou menisco (menisco inferior) da solução para que o volume de solução preparada seja exatamente de 100 mL.
- K. Tampe o balão e homogeneíze novamente a solução, cuidadosamente e em círculos, até dissolução completa do sal, sem inverter a posição do balão para não deixar gotas de água acima da marca indicativa do volume (de 100 mL) agora completado.

- L. Transfira esta solução para um frasco de cor âmbar, identificado com nome e concentração (corrigida) da solução, nome do pesquisador e data de preparo. Guarde na geladeira. Esta é sua solução-estoque de NaCl a **20.0XY** g/dL.
- M. Vede o frasco com *Parafilm* para evitar a evaporação e/ou contaminação da solução preparada.

2- Preparo das soluções de uso de NaCl

Descrição das soluções a serem preparadas: 100 mL de soluções de uso de NaCl nas concentrações 0.10; 0.20; 0.30; 0.40; 0.42; 0.44; 0.46; 0.48; 0.50; 0.52; 0.60; 0.70; 0.80 e 0.90 g/dL (ao todo são 15 as concentrações, considerando também a concentração 0, que constitui um controle da hemólise total).

Material necessário: 1) Calculadora; 2) 15 frascos âmbar de 100 mL de capacidade e com tampa que possa vedar hermeticamente; 3) solução-estoque de NaCl a **20.0XY** g/dL (preparada segundo descrição anterior); 4) papel parafinado (*Parafilm*); 5) balões volumétricos limpos e secos com 100 mL de capacidade;

Protocolo Experimental Padrão (POP):

- A. Para obter 100 mL (V_{final}) de cada concentração final desejada de NaCl (C_{final}) a partir da solução estoque (C_{inicial}), você pode utilizar a equação $C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$ para calcular o volume da solução de NaCl (V_{inicial}) a ser utilizado. Assim, para obter as concentrações finais de NaCl descritas na coluna 2 da tabela seguinte, você precisaria usar os volumes da solução-estoque de NaCl que são apresentados em mL e em μL na terceira e quarta coluna desta tabela. Se a concentração da solução-estoque fosse exatamente igual a 20 g/dL, as suas concentrações reais obtidas de NaCl seriam aquelas descritas na segunda coluna desta tabela. Entretanto, como você partiu de uma solução-estoque de NaCl com uma concentração um pouquinho diferente, você terá concentrações finais de NaCl um pouquinho diferentes. Usando aquela mesma equação anterior, a equação $C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$, se a concentração da

solução-estoque corrigida para o grau de pureza do sal fosse de 20,0061 g/dL (C_{inicial}), como no exemplo anterior, para obter 100 mL (V_{final}) de cada solução, usando os volumes descritos nas colunas 3 e 4 (V_{inicial}), as concentrações finais corrigidas de NaCl seriam aquelas observadas na quinta coluna desta tabela. É importante destacar que a concentração final corrigida da solução de uso de NaCl mostrada na quinta coluna desta tabela é só uma simulação. Você deve calcular cada concentração final corrigida a partir da concentração corrigida de sua solução-estoque de NaCl e lançar os seus valores na quinta coluna desta tabela. São esses valores de concentração final corrigida de NaCl que você deverá usar nos seus cálculos das constantes de estabilidade de membrana de eritrócitos.

Solução de uso (#)	C_{final} (g/dL)	V_{inicial} (mL)	V_{inicial} (μL)	C_{final} corrigida (g/dL)
1	0.90	4,50	4500	0.9003
2	0.80	4,00	4000	0.8024
3	0.70	3,50	3500	0.7002
4	0.60	3,00	3000	0.6002
5	0.52	2,60	2600	0.5202
6	0.50	2,50	2500	0.5002
7	0.48	2,40	2400	0.4802
8	0.46	2,30	2300	0.4601
9	0.44	2,20	2200	0.4401
10	0.42	2,10	2100	0.4201
11	0.40	2,00	2000	0.4001
12	0.30	1,50	1500	0.3001
13	0.20	1,00	1000	0.2001
14	0.10	0,50	500	0.1000
15	0	0	0	0

- B- Adicione um volume de água ultrapura (cerca de 80 mL) em cada balão volumétrico limpo e seco de 100 mL de capacidade sem deixar cair gotas de água na lateral da parede interna do balão acima da marca indicativa do volume a ser completado para preparar 100 mL de solução.
- C- Usando uma pipeta automática apropriada, transfira o volume descrito em μ L na coluna 4 da tabela anterior para cada balão volumétrico. Feche o balão e homogeneíze cuidadosamente a mistura, completando depois, cuidadosamente, com água ultrapura o volume de 100 mL do balão, sem deixar cair gotas de água na lateral da parede interna do balão acima da

marca indicativa do volume a ser completado para preparar 100 mL de solução. Este procedimento é feito com o balão à altura dos olhos e contra um fundo claro, para evitar erro de paralaxe. O volume da solução deve coincidir com a parte inferior da semicircunferência, concavidade ou menisco (menisco inferior) da solução para que o volume de solução preparada seja exatamente de 100 mL.

D- Transfira cada solução (são 15 no total) para frascos de cor âmbar, vede-os com Parafilm, fechando hermeticamente cada frasco. Identifique-os com a concentração (corrigida) da solução, nome do pesquisador e data de preparo. Guarde-os na geladeira. Estas são suas soluções de uso de NaCl nas concentrações a serem utilizadas em cada experimento. A solução 15 é na realidade água ultrapura e será utilizada para promoção de hemólise total.

3- Determinação da Estabilidade Osmótica de Eritrócitos

Material necessário: **1)** Soluções de uso de NaCl em concentrações de 0.10; 0.20; 0.30; 0.40; 0.42; 0.44; 0.46; 0.48; 0.50; 0.52; 0.60; 0.70; 0.80 e 0.90 g/dL (as concentrações reais corrigidas podem ser um pouco diferentes, dependendo da concentração real corrigida de sua solução-estoque); **2)** 30 minitubos (Eppendorf) com tampa para fechamento hermético; **3)** grade ou estante para os minitubos que seja apropriada para incubação em banho de imersão; **4)** pipeta automatizada; **5)** amostra de sangue coletado com anticoagulante; **6)** banho termostatizado com controle de temperatura; **7)** centrífuga com controle de temperatura; **8)** espectrofotômetro.

Protocolo Experimental Padrão (POP):

A. Prepare com antecedência em uma estante apropriada para banho de imersão uma série duplicada de 15 minitubos de ensaio do tipo Eppendorf (são 30 minitubos no total) a serem utilizados no experimento, sendo, portanto, dois tubos para cada uma das 14 concentrações de NaCl e dois para o controle de hemólise total (água ultrapura).

- B. Identifique cada tubo com as respectivas concentrações: 0,00; 0,00; 0,10; 0,10; 0,20; 0,20; 0,30; 0,30; 0,40; 0,40; 0,42; 0,42; 0,44; 0,44; 0,46; 0,46; 0,48; 0,48; 0,50; 0,50; 0,52; 0,52; 0,60; 0,60; 0,70; 0,70; 0,80; 0,80; 0,90; 0,90.
- C. Coloque 1 mL de cada uma das soluções de uso na respectiva duplicata da série de 15 tubos na concentração identificada em cada tubo cada tubo identificado com as respectivas concentrações de NaCl, fechando hermeticamente cada tubo. Lembre-se que cada tubo está devidamente identificado com a concentração da solução de uso a ser utilizada.
- D. Pré-incube a estante ou grade com os minitubos por cerca de 5 minutos em banho termostatizado de água à temperatura em que o experimento será feito (37 °C, por exemplo). Ligar o botão de refrigeração do banho se a temperatura ultrapassar os 37 °C.
- E. Abra um a um os tubos, adicionando alíquotas de 10 µL de sangue total em cada um, feche-os hermeticamente, e depois homogeneíze (ou seja, agite suavemente) os tubos.
- F. Incube a bateria de 30 tubos em banho termostatizado de água à temperatura desejada (37 °C, por exemplo) por 30 minutos.
- G. Escolha o rotor (32) para centrifugação de minitubos de Eppendorf e coloque-o bem adaptado na centrífuga.
- H. Certifique-se de que os minitubos estejam hermeticamente fechados antes de colocar na centrífuga e estejam colocados de forma balanceada no rotor.
- I. Centrifugue esses tubos por 10 minutos a 1.600 x g (3000 rpm) e 25 °C.
- J. Retire o sobrenadante de cada tubo, um a um, usando uma ponteira diferente para cada concentração salina utilizada, transferindo para a cubeta e lendo sua absorbância a 540 nm em espectrofotômetro, após zerar o aparelho com água. Não se esqueça de tocar apenas nos lados foscos da cubeta durante o procedimento e de anotar cada leitura de absorvância feita.
- K. Ao terminar de usar a cubeta de leitura, lavar várias vezes com água ultrapura, secar e guardar na caixa.
- L. Depois de cada experimento, vá para a etapa seguinte e faça imediatamente os cálculos, como descrito, para checar se o experimento foi feito com sucesso ou se serão necessárias mudanças nas concentrações salinas utilizadas. Populações com diferenças maiores na estabilidade osmótica de eritrócitos

vão demandar utilização de diferentes concentrações salinas para definir com precisão a curva de estabilidade de membrana de eritrócitos.

4- Cálculo das constantes de estabilidade osmótica de eritrócitos

Material necessário: 1) Computador *desktop* ou *notebook*; 2) aplicativos de cálculo e análise estatística, como *OriginPro* (Northampton, Massachusetts, EUA) e *SPSS* (IBM, Chicago, IL, EUA).

Protocolo Experimental Padrão (POP):

- A- É necessária a utilização de programas estatísticos específicos, como o *OriginPro* (Northampton, Massachusetts, USA) e o *SPSS* (IBM, Chicago, IL, EUA), para obtenção das curvas de fragilidade osmótica e a determinação das constantes de fragilidade ou estabilidade osmótica. Os valores obtidos dessas constantes só devem ser considerados satisfatórios se os ajustes estatísticos feitos para sua determinação tiverem valores de $p \leq 0,05$. É importante destacar que as curvas de fragilidade osmótica devem ser sempre analisadas no sentido da lise hiposmótica, ou seja, no sentido em que a concentração de NaCl diminui.
- B- Lance em uma mesma coluna da planilha (worksheet) de um desses aplicativos, definida como X (abscissa), os valores das concentrações salinas. Note que cada concentração vai aparecer repetidamente na mesma coluna. É importante que as concentrações salinas lançadas sejam aquelas obtidas após correção para a concentração efetiva da solução-estoque de NaCl utilizada.
- C- Lance em outra coluna da planilha, definida como Y (ordenada), o valor de absorbância correspondente a cada uma das concentrações salinas lançadas anteriormente.
- D- Faça a dispersão dos pontos em um gráfico de absorbância versus concentração salina.
- E- Comande o programa para fazer um ajuste estatístico não linear com base na equação de Boltzman, que para a relação da absorbância a 540 nm (A) com a concentração salina é dada pela seguinte forma da equação:

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

onde A_{\max} e A_{\min} representam os valores médios de absorbância nos platôs máximo e mínimo da sigmoide, H_{50} é a concentração de NaCl que corresponde à liberação de 50% das moléculas de hemoglobina dos eritrócitos lisados pela diminuição da concentração salina, e dX representa $\frac{1}{4}$ da variação na concentração de NaCl responsável pela lise completa de toda a população de eritrócitos presente na amostra de sangue analisada.

- F- Determine também as constantes H_0 e H_{100} , que representam as concentrações salinas onde a lise hiposmótica começa (o que ocorre no final do platô A_{\min}) e termina (o que ocorre no início do platô A_{\max}), respectivamente, a partir dos valores de H_{50} e dX determinados pela regressão sigmoideal com base na equação de Boltzmann, utilizando as seguintes equações:

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

e

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

É importante lembrar que as curvas de fragilidade osmótica devem ser sempre analisadas no sentido da lise hiposmótica, ou seja, no sentido em que a concentração de NaCl diminui.

- G- Em algumas situações, é interessante converter os valores de absorbância em percentagem de hemólise, antes de fazer o ajuste estatístico. A percentagem de hemólise em cada concentração salina pode ser obtida com a utilização da seguinte equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A}{A_{\max} - A_{\min}} \times 100\% \quad (4).$$

ANEXO 2

Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56557516.0.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Genética e Bioquímica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.688.263

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: Trata-se de um estudo observacional transversal, a ser realizado com amostra de conveniência. Serão convidados a participar desse estudo pacientes adultos a partir de 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de pré-diabetes ou DM2, atendidos no ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). O convite será feito no ambulatório de clínica médica durante as consultas de rotina. Os dados serão coletados por meio de questionários analíticos e de medidas da força muscular (por dinamometria), da massa muscular (por impedância bioelétrica, BIA) da estabilidade de membrana de eritrócitos e de variáveis hematimétricas e bioquímicas sanguíneas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Investigar em indivíduos com pré-diabetes e DM2 a relação entre as alterações na estabilidade de membrana dos eritrócitos, a hiperglicemia crônica e a redução da massa e da força muscular e funcionalidade.

Objetivos Específicos:

- Avaliar os resultados de exames laboratoriais de glicemia de jejum e hemoglobina glicada em pacientes diagnosticados com pré diabetes ou DM2.
- Identificar alterações na estabilidade cinética da membrana de eritrócitos em pacientes diagnosticados com pré diabetes ou DM2.
- Avaliar a massa muscular magra por meio de impedância bioelétrica (BIA).
- Medir a força muscular por meio da dinamometria manual.
- Comparar a prevalência da alteração da hemoglobina glicada com a estabilidade da membrana celular e com a redução de massa e de força muscular em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos tipo 2.
- Verificar o risco de má nutrição por meio da Ferramenta Universal para Rastreamento de Malnutrição (MUST) e analisar se a redução da força e massa muscular em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos tipo 2 se correlaciona com o estado nutricional.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.688.263

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos: Os riscos citados pelos pesquisadores envolvem os procedimentos de coleta de sangue e identificação do voluntário, entretanto, serão adotadas medidas cabíveis para a prevenção destes riscos.

Benefícios: Em relação aos benefícios, o estudo irá trazer maiores esclarecimentos à literatura médica e isso poderá reorientar tratamentos. Além disso, serão realizados vários exames complementares que permitirão ao médico e paciente melhor acompanhamento da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os autores demonstram, por meio de revisão de literatura, a importância da realização do presente estudo. O projeto de pesquisa está adequadamente descrito e permite adequada interpretação para a elaboração do parecer ético deste comitê.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências listadas anteriormente no parecer consubstanciado 1.603.436, de 20 de Junho de 2016, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2017. Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2018. Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Dezembro de 2019.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

UF: MG

Telefone: (34)3239-4131

CEP: 38.408-144

Município: UBERLÂNDIA

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.688.263

Orientações ao pesquisador:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_697488.pdf	18/07/2016 16:24:58		Aceito
Orçamento	Orcamentofinanceiroestimado20160718.docx	18/07/2016 16:22:34	Maria Aparecida Knychala	Aceito
Outros	CartaRespostaPendenciasCEP1807.doc	18/07/2016 16:21:31	Maria Aparecida Knychala	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	20160718ProjetoCEPMariaAparecida.doc	18/07/2016 16:14:38	Maria Aparecida Knychala	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	18/07/2016 15:27:24	Maria Aparecida Knychala	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaoinstituicaoocoparticipante20160523.pdf	23/05/2016 19:33:33	Maria Aparecida Knychala	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto20160523.pdf	23/05/2016 19:32:44	Maria Aparecida Knychala	Aceito
Outros	DocumentocomoslinksdoscurriculosLattes.docx	18/05/2016 22:13:45	Maria Aparecida Knychala	Aceito
Outros	Modelodoinstrumentodecoletadedados.docx	18/05/2016 22:08:04	Maria Aparecida Knychala	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaodepesquisadores.pdf	17/05/2016 16:00:08	Maria Aparecida Knychala	Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

UF: MG

Telefone: (34)3239-4131

CEP: 38.408-144
Município: UBERLÂNDIA

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE UBERLÂNDIA



Continuação do Parecer: 1.688.263

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 16 de Agosto de 2016

Assinado por:
Sandra Terezinha de
Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

UF: MG

Telefone: (34)3239-4131

CEP: 38.408-144
Município: UBERLÂNDIA

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br