



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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E  
VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM MULHERES SUBMETIDAS  
A CIRURGIA BARIÁTRICA E EM MULHERES SOBREVIVENTES DE CÂNCER DE  
MAMA**

Discente: **Wener Barbosa Resende**

**UBERLÂNDIA, MG**

**2017**



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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E  
VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM MULHERES SUBMETIDAS  
A CIRURGIA BARIÁTRICA E EM MULHERES SOBREVIVENTES DE CÂNCER DE  
MAMA**

Discente: **Wener Barbosa Resende**  
Orientador: **Dr. Nilson Penha-Silva**  
Coorientador: **Dr. Ubirajara Coutinho 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**

**2017**

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

---

- R433a  
2017      Resende, Wener Barbosa, 1988-  
            Associação entre estabilidade de membrana de eritrócitos e variáveis  
            hematológicas e bioquímicas em mulheres submetidas a cirurgia  
            bariátrica e em mulheres sobreviventes de câncer e mama [recurso  
            eletrônico] / Wener Barbosa Resende. - 2017.
- Orientador: Nilson Penha-Silva.  
            Coorientador: Ubirajara Coutinho Filho.  
            Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
            de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.  
            Modo de acesso: Internet.  
            Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.5000>  
            Inclui bibliografia.  
            Inclui ilustrações.
1. Bioquímica. I. Penha-Silva, Nilson, 1957-, (Orient.). II. Coutinho  
            Filho, Ubirajara, 1970-, (Coorient.). III. Universidade Federal de  
            Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV.  
            Título.

---

CDU: 577.1

André Carlos Francisco  
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408



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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS E  
VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM MULHERES SUBMETIDAS  
A CIRURGIA BARIÁTRICA E EM MULHERES SOBREVIVENTES DE CÂNCER DE  
MAMA**

Estudante: **Wener Barbosa Resende**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

<b>Presidente:</b>	<b>Prof. Dr. Nilson Penha-Silva</b>	[UFU]
<b>Examinador:</b>	<b>Prof. Dr. Miguel Júnior Sordi Bortolini</b>	[UFAC]
<b>Examinador:</b>	<b>Prof. Dra. Lara Ferreira Paraiso</b>	[IMEPAC]
<b>Examinador:</b>	<b>Prof. Dra. Nadia Carla Cheik</b>	[UFU]
<b>Examinador:</b>	<b>Prof. Dr. Mario da Silva Garrote Filho</b>	[UFU]

Data da defesa: **30/11/2017**

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

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

## **Dedicatória**

Aos meus pais, Lucimara Barbosa Leal e Divino Raimundo Resende;

Aos meus irmãos, Lucas Barbosa Resende e Milne Barbosa Resende;

À minha esposa, Luciana Domingos da Silva;

Aos meus filhos, Hadassa Gabrielli Silva Resende e Wener Barbosa Resende Filho.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por mais essa conquista e por ter guiado e iluminado meus passos.

Agradeço à nação brasileira por ter financiado todos os meus anos de estudo.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Nilson Penha Silva e ao meu coorientador, prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, pelo apoio, paciência e ajuda durante todo esse processo.

Agradeço também a todas as pessoas que fizeram parte da minha formação, em especial:

Luciana Domingos da Silva, Hadassa Gabrielli Silva Resende, Wener Barbosa Resende Filho, Lucimara Barbosa Leal, Divino Raimundo Resende, Lucas Barbosa Resende, Milne Barbosa Resende, Benedito Resende Cunha, Helena Palmira Naves, Ildeu Leal Barbosa, Sebastiana Aparecida Barbosa Leal, Rafaela Amado Resende, Sophia Silva Rodrigues, Tiago Amado Resende, José Domingos da Silva, Marta da Silva, Diane Rodrigues Amado Resende, Larissa Barbosa dos Santos, Leandro Domingos da Silva, Vanessa Aparecida Domingos da Silva Rodrigues, Jonas Antônio Rodrigues Júnior, Karen Manoela Matos Guedes, Maria Luiza Pereira dos Santos Resende, Brunello Couto Noll, Cedrick Willian Silva, Polyana Cristina da Silva, Taís Basílio Pereira de Souza Gondim, Dayane Ferreira Rodrigues, João Paulo Pereira Rosa, Alice Vieira da Costa, Lucas Moreira Cunha, Marcelo Costa Junior, Marco Aurélio Ferreira de Jesus Leite, Mario da Silva Garrote Filho, Rodney Coelho da Paixão, Maria Conceição Francisco Souto dos Santos, Françoise Vasconcelos Botelho, Carlos Eduardo Caetano, Cesar Augusto França Abrahão, Marco Aurélio Tomaz, Eliane Maria de Carvalho, Gilmar da Cunha Sousa, Miguel Júnior Sordi Bortolini, Nadia Carla Cheik e Nívea de Macedo Oliveira Morales.

Estendo também meus agradecimentos a todos os familiares dos que aqui foram mencionados, porque indiretamente, também contribuíram para minha formação.

[...] e o encheu do espírito de Deus, no tocante à sabedoria, ao entendimento, à ciência e a todo ofício [...]

Êxodo 35.31

## Lista de figuras

	Página
<b>Figura 1.1</b> Curva de lise hiposmótica de eritrócitos em gradiente de concentração de NaCl .....	24
<b>Figura 1.2</b> Equilíbrio pró-oxidante e antioxidante em indivíduos não obesos e obesos ...	25
<b>Figura 1.3</b> Condições que geram estresse oxidativo na patogenia da obesidade e seu papel no desenvolvimento de doenças associadas .....	26
<b>Figura 2.1</b> <i>Percentage variation explained by each of the eighteen principal components</i> .....	47
<b>Figura 2.2</b> <i>Correlations circle of the first two principal components (PC)</i> .....	48
<b>Figura 2.3</b> <i>Influence of the levels of LDL- and HDL-cholesterol on the relations between the variables of erythrocyte membrane stability (invH50 and dX) and the hematologic variable red cell distribution width (RDW), according to analyses done with use of Support Vector Machine (SVM)</i> .....	49
<b>Figura 3.1</b> <i>Typical curve of the osmotic lysis kinetics of erythrocytes from a study volunteer</i> .....	67



## Lista de tabelas

	Página
<b>Tabela 1.1</b> Percentual de homens e mulheres com 18 anos ou mais de idade com sobrepeso e obesidade nas capitais brasileiras .....	27
<b>Tabela 1.2</b> Capitais brasileiras com maiores e menores percentuais de sobrepeso e obesidade .....	28
<b>Tabela 1.3</b> Classificação de sobrepeso em adultos de acordo com IMC .....	29
<b>Tabela 2.1</b> <i>Values of r for the correlations of the first ten principal components with the original data</i> .....	50
<b>Tabela 3.1</b> <i>Characterization of the study population</i> .....	68
<b>Tabela 3.2</b> <i>Hematologic profile of study volunteers</i> .....	69
<b>Tabela 3.3</b> <i>Biochemical profile of the study volunteers</i> .....	70
<b>Tabela 3.4</b> <i>Daily nutritional intake estimated from food recall</i> .....	71
<b>Tabela 3.5</b> <i>Coefficients of correlation between pairs of studied variables</i> .....	72

## Abreviaturas

%BF	Porcentagem de Peso Corporal, do inglês <i>Percentage of Body Fat</i>
AC	Acre
AEV	Variabilidade Explicada Acumulada, do inglês <i>Accumulated Explained Variability</i>
AM	Amazonas
A <sub>max</sub>	Absorvância Máxima, do inglês <i>Maximum Absorbance</i>
AP	Amapá
ASA	Sociedade Americana de Anestesiologistas, do inglês <i>American Society of Anesthesiologists</i>
BCS	Sobreviventes de Câncer de Mama, do inglês <i>Breast Cancer Survivors</i>
BIA	Análise de Bioimpedância Elétrica, do inglês <i>Electric Bioimpedance Analysis</i>
BM	Massa Corporal, do inglês <i>Body Mass</i>
BMI	Índice de Massa Corporal, do inglês <i>Body Mass Index</i>
CM	Câncer de mama
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dX	¼ da variação da concentração de NaCl necessária para promover 100% de hemólise
EME	Estabilidade da Membrana dos Eritrócitos
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FFM	Massa Livre de Gordura, do inglês <i>Fat Free Mass</i>
FM	Massa Gordurosa, do inglês <i>Fat Mass</i>
FOE	Fragilidade Osmótica Eritrocitária
Glu	Glicose, do inglês <i>Glucose</i>
GO	Goiás
H <sub>50</sub>	Concentração de NaCl que causa 50% de hemólise
Hb	Hemoglobina
HbA1C	Fração A1c da Hemoglobina Glicada
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>High-Density Lipoprotein Cholesterol</i>
Ht	Hematócrito
IMC	Índice de Massa Corporal
invH <sub>50</sub>	Inverso da concentração de NaCl que causa 50% de hemólise
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i>
LM	Massa Magra, do inglês <i>Lean mass</i>
MA	Maranhão
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>
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul

MS	Ministério da Saúde
MT	Mato Grosso
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paraíba
PCA	Análise de Componente Principal, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PCs	Componentes Principais, do inglês <i>Principal Components</i>
PI	Piauí
Plt	Plaquetas, do inglês <i>Platelets</i>
RBC	Células Vermelhas do Sangue ou Eritrócitos, do inglês <i>Red Blood</i> ou <i>Erythrocytes</i>
RDW	Distribuição de volume das células vermelhas do sangue, do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i>
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
Rtc	Reticulócitos, do inglês <i>Reticulocytes</i>
RYGB	Desvio Gástrico em Y de Roux, do francês e inglês <i>Roux-en-Y Gastric Bypass</i>
SC	Santa Catarina
$t_{1/2}$	Tempo para promoção de lise de metade da população de eritrócitos
t-C	Colesterol total, do inglês <i>total Cholesterol</i>
TGC	Triglicérides, do inglês <i>Triglycerides</i>
TO	Tocantins
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL-C	Colesterol da Lipoproteína de Muito Baixa Densidade, do inglês <i>Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol</i>
VSM	Máquina de Vetor Suporte, do inglês <i>Support Vector Machine</i>

## Sumário

	Página
<b>Lista de Figuras</b> .....	vi
<b>Lista de Tabelas</b> .....	vii
<b>Abreviaturas</b> .....	viii
<b>Apresentação</b> .....	11
<b>Capítulo 1 [Fundamentação Teórica]</b> .....	12
Obesidade .....	13
Câncer .....	15
Membranas Biológicas .....	18
Membrana Eritrocitária: Obesidade e Câncer .....	20
Considerações Finais .....	22
Referências .....	30
<b>Capítulo 2 [<i>Erythrocyte membrane stability is associated with the red cells distribution width, under the antagonistic influences of the levels of LDL- and HDL-cholesterol</i>]</b>	37
Resumo .....	38
<i>Abstract</i> .....	39
<i>Introduction</i> .....	40
<i>Material and Methods</i> .....	41
<i>Results and Discussion</i> .....	43
<i>References</i> .....	51
<b>Capítulo 3 [<i>Influence of hematologic, biochemical and nutritional variables on the kinetics of osmotic lysis of erythrocytes in women breast cancer survivors</i>]</b>	56
Resumo .....	57
<i>Abstract</i> .....	58
<i>Introduction</i> .....	59
<i>Material and Methods</i> .....	60
<i>Results</i> .....	62
<i>Discussion</i> .....	63
<i>Conclusion</i> .....	65
<i>References</i> .....	73

## **Apresentação**

A obesidade é uma doença crônica não transmissível caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura, o qual pode ser desenvolvido por questões genéticas e ambientais. Os fatores ambientais relacionados ao desequilíbrio energético são os mais importantes para levar essa doença a um nível epidêmico no mundo, sobressaindo a desnutrição e a fome no século XXI, e é um dos principais motivos para as mortes prematuras. Sendo por essa razão um dos maiores desafios da atualidade em saúde pública. Estima-se que um terço da população mundial esteja com sobrepeso e/ou obesidade, representando 39% dos homens e 40% das mulheres. No Brasil, a condição epidêmica não é diferente, pois ele ocupa o quinto lugar entre os países com maior índice de obesidade. Nos últimos 11 anos o sobrepeso e a obesidade têm aumentado, independentemente da região geográfica brasileira, mesmos em Estados que até a década de 90 apresentavam um alto índice de desnutrição.

Outra doença crônica não transmissível tão incidente quanto a obesidade é o câncer, o qual se caracteriza por uma proliferação descontrolada de células anormais em um ou mais tecidos corporais, levando à falência do órgão ou à morte do paciente. Dentre todos os tipos da doença que acometem homens e mulheres, o câncer de maior prevalência no mundo é o de mama em mulheres. No sexo feminino, o câncer de mama representa cerca de 25% dos casos de câncer no cenário mundial. No Brasil, estimou-se para 2016-2017, que 28,1% dos casos de câncer em mulheres seriam de mama. As regiões brasileiras com maior ocorrência desse tipo de câncer são as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

Tanto na obesidade quanto no câncer acontecem alterações fisiopatológicas que podem alterar a funcionalidade das membranas biológicas. A estabilidade da membrana celular está principalmente relacionada às proteínas que compõem sua estrutura. Entretanto, a membrana plasmática também é composta por um grande percentual de lipídios. Assim, a estabilidade das membranas pode ser alterada tanto por danos causados às proteínas quanto aos lipídios de sua membrana. No estudo da estabilidade das membranas biológicas, o eritrócito é um modelo prático, por ser obtido de forma pouco invasiva e pela liberação de hemoglobina que facilita análise após sua lise.

Analisar a estabilidade da membrana do eritrócito nessas doenças é importante, pois pode apresentar informações ainda desconhecidas da fisiopatologia da obesidade e do câncer de mama e contribuir para proporcionar um melhor manejo, tratamento e qualidade de vida dos pacientes.

## **Capítulo 1**

# **Fundamentação Teórica**

## Obesidade

As mudanças sociais, que estão relacionadas com os padrões de consumo alimentar, nível de atividade física, mudanças culturais e demográficas, influenciam o comportamento humano de várias formas, podendo levar à obesidade. A gênese da obesidade compreende fatores genéticos e ambientais, sendo que na população em geral os fatores comportamentais ou ambientais são os mais importantes. Dessa maneira, a origem patológica da obesidade está relacionada a uma desregulação entre a ingestão de alimentos e o gasto energético, que levam ao ganho de peso por influenciar o equilíbrio energético diário. Conforme os princípios da homeostase energética, uma diminuição no gasto de energia em um contexto de equilíbrio energético poderia levar a um aumento do peso. Entretanto, existem fenótipos metabólicos diferentes, considerados como “dispendiosos” ou “econômicos”, que são resultantes de mecanismos de detecção de energia ligados ao gasto energético e à ingestão de alimentos, tornando a obesidade uma doença complexa e de origem multifatorial [1, 2].

Por esse motivo, a obesidade é um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI, pois pode afetar diversas áreas da vida, ocasionando alterações sistêmicas, anatômicas, funcionais, psicológicas e sociais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)[3], o sobrepeso e a obesidade são o “acúmulo de gordura anormal ou excessiva que apresenta risco para a saúde”, sendo considerados os maiores fatores de risco de doenças crônicas não transmissíveis como *diabetes mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão, acidente vascular encefálico isquêmico, asma, apneia do sono, distúrbios musculoesqueléticos e câncer (do endométrio, da mama, do ovário, da próstata, do fígado, da vesícula biliar, do rim e do cólon), além de serem os principais contribuintes para mortes prematuras. Sendo assim, o excesso de peso e a obesidade são considerados um problema tanto em países de alta renda, com em países de baixa e média renda, principalmente nas áreas urbanas [3-5].

Em 2016, em todo mundo, 39% dos homens e 40% das mulheres com mais de 18 anos de idade estavam com sobrepeso e 11% dos homens e 15% das mulheres eram obesas. Deste modo, quase 2 bilhões (1,9 bilhões) de adultos tinham excesso de peso e mais de meio milhão (650 milhões) eram obesos [4, 5]. Nas Américas o sobrepeso e a obesidade têm atingido proporções epidêmicas, onde 62% dos adultos estão acima do peso, sendo a região da OMS com maior prevalência de sobrepeso e obesidade. No Egito, Bahrein, Jordânia, Kuwait, Arábia Saudita e Emirados Árabes Unidos, que fazem parte da região do mediterrâneo oriental, a prevalência de sobrepeso e obesidade varia de 74% a 86% nas mulheres e de 69% a 77% nos homens [3].

Na recente pesquisa de Ng *et al.* (2014)[6], em que eles analisaram mais de três décadas e 188 países (sendo o Brasil um desses países), foi relatado que em torno de um terço da população mundial está com sobrepeso e/ou obesidade. Esses dados nos mostram que atualmente há mais pessoas obesas que pessoas com baixo peso no mundo. Cinquenta por cento dos obesos do mundo estão concentrados em dez países. Os Estados Unidos da América (EUA) estão em primeiro lugar na lista, em segundo lugar está a China e em terceiro a Índia, sendo seguida pela Rússia, Brasil, México, Egito, Alemanha, Paquistão e Indonésia. Segundo os autores, em 2010 o número de mortes, causadas por dia pela doença no mundo, foi de aproximadamente 8.220.

No Brasil, o sobrepeso e a obesidade vêm crescendo assim como nos outros países do mundo. Após uma análise de todas as pesquisas realizadas pelo Ministério da Saúde (MS) através da vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL), dos últimos 11 anos foi observado que o excesso de peso e de obesidade têm aumentado e há uma alternância entre as capitais que apresentam os menores e maiores percentuais de excesso de peso e obesidade no Brasil (Tabela 1.1 e 1.2) [7-17].

De acordo com as cinco regiões geográficas do Brasil, apenas o Nordeste não apresentou nenhuma capital com habitantes entre os maiores percentuais de excesso de peso de 2006 a 2016. Em contrapartida, em todas regiões brasileiras, já houve pelo menos uma capital com o maior percentual de indivíduos com obesidade, em pouco mais de uma década (Tabela 1.2) [7-17].

Conforme a pesquisa mais recente da VIGITEL realizada em 2016 [17], que contemplou as 26 capitais brasileiras e o Distrito Federal, com um tamanho amostral mínimo de aproximadamente 2 mil pessoas por cidade, e um total de 53.210 entrevistas, a variação do excesso de peso em homens brasileiros foi de 50,6%, no Distrito Federal, a 65,8% em Rio Branco, no estado do Acre (AC), e entre as mulheres a variação foi de 41,7%, em Palmas, no estado do Tocantins (TO) a 55,8%, em Rio Branco (AC). No que se refere à obesidade entre os sexos, a variação entre as capitais foi de 24,8%, em Rio Branco (AC), a 12,5%, em São Luiz, no estado Maranhão (MA) entre os homens e de 22,8%, em Rio Branco (AC), a 14,5%, em Goiânia, no estado de Goiás (GO). A capital do estado de Minas Gerais (MG), Belo Horizonte, apresentou um excesso de peso de 49,6% e 16,6% de obesidade. No que diz respeito ao sexo, 52,7% dos homens e 46,9% das mulheres estavam com sobrepeso em Belo Horizonte (MG). Quanto à obesidade, 14,9% dos homens e 18,0% das mulheres entrevistados em Belo Horizonte (MG) estavam obesos.



Em todas as pesquisas realizadas pelo MS do Brasil, de 2006 a 2016 [7-17] ficou evidente que quanto menor a escolaridade maior o percentual de pessoas com sobrepeso e obesidade. O excesso de peso entre as pessoas com até 8 anos de escolaridade, em 2016, foi de 59,2% e entre as pessoas com mais de 12 anos de estudo o percentual foi de 48,8. A obesidade nos entrevistados com até 8 anos apresentou um percentual de 23,5, enquanto que entre os entrevistados com 12 anos ou mais de escolaridade o percentual foi de 14,5 [17].

Quanto à faixa etária, os adultos que apresentam menor percentual de sobrepeso são os que estão entre 18 e 24 anos de idade, tanto em homens quanto em mulheres. Nessa faixa etária, 30,3% dos entrevistados estavam com excesso de peso. Já nas faixas etárias acima de 24 anos, todas tinham mais de 50% dos entrevistados com sobrepeso. Da mesma forma, a faixa etária menos obesa foi a de 18 a 24 anos de idade, com menos de 10% dos entrevistados. Todas as outras faixas etárias maiores que 24 anos tinham mais de 15% de obesos [17].

O sobrepeso e a obesidade são classificados a partir do índice de massa corporal (IMC) ou índice de Quételet, pois sua fórmula foi criada pelo matemático Lambert Adolphe Jacques Quételet, que divide a massa corporal em quilogramas pela altura em metros elevada ao quadrado, ou seja,  $IMC = \text{massa corporal (kg)} \div \text{Altura (m)}^2$ . Esse índice é utilizado pela OMS desde 1997 para estadiar o sobrepeso e a obesidade (Tabela 1.3) [18-20].

## **Câncer**

Uma das principais causas de morbidade e mortalidade na atualidade é o câncer, pois afeta populações de todas as regiões e em todos os países do mundo. Em 2012, houve aproximadamente 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer. Em 2011, 8,7 milhões de pessoas, com mais de 15 anos de idade, já tinham sido diagnosticadas com câncer. De 2009 a 2012 e de 2007 a 2012, mais de 22,0 milhões e de 32,6 milhões de pessoas tiveram diagnóstico de câncer, respectivamente. No mundo, os tipos de câncer mais ocorrentes foram o de pulmão (1,82 milhão de casos, 12,9% do total), o de mama (1,67 milhão de casos, 11,9% do total), o de colorretal (1,36 milhão de casos) e de próstata (1,1 milhão de casos), sendo esperado anualmente mais de 20 milhões de novos casos já em 2025 [21, 22].

Entre os homens, em 2012, os cânceres mais comuns no mundo foram o de pulmão com 16,7% do total, de próstata (15,0%), de colorretal (10,0%), de estômago (8,5%) e de fígado (7,5%). Entre as mulheres, os mais comuns foram o câncer de mama com 25,2% do total, de colorretal (9,2%), de pulmão (8,7%), de colo de útero (7,9%) e de estômago (4,8%). A

incidência de câncer de mama nas mulheres foi maior do que a incidência de qualquer outro tipo de câncer, com uma incidência de 43,3 para cada 100 mil mulheres. A segunda maior incidência de câncer é o de pulmão, com 34,2 para cada 100 mil homens, e a terceira é de câncer de próstata, com uma incidência de 31,1 por 100 mil homens [21, 22].

Excluindo o câncer de pele não melanoma, mas combinando todos outros tipos de câncer, no ano de 2012 as taxas mais altas de incidências de câncer estão relacionadas aos países desenvolvidos da América do Norte, da Europa Ocidental, Japão, República da Coreia, Austrália e Nova Zelândia. Porém, mais de 60% dos casos de câncer no mundo ocorrem na África, Ásia e nas Américas Central e do Sul, representando aproximadamente 70% (8 milhões) das mortes causadas por câncer em todo mundo [22]. No *ranking* de mortalidade, o câncer de pulmão foi responsável por 1,6 milhão (19,4%) de mortes, sendo o que mais causou mortes entre todos os tipos de câncer, enquanto que, o câncer de mama ocupou a 5ª posição, com 522 mil mortes, que equivalem a 6,4% do total das mortes causadas por câncer no mundo. Essa “baixa” ocorrência de mortalidade por câncer de mama, quando comparada com sua incidência, se deve a um prognóstico relativamente favorável. Porém, o câncer de mama é a causa mais frequente de morte entre as mulheres das regiões menos desenvolvidas do mundo, representando 324 mil (14,3%) do total de mortes, e é a segunda causa de morte, entre as mulheres acometidas pela doença, nas regiões mais desenvolvidas (198 mil mortes, 15,4%) [21].

Na América Latina e na região do Caribe, foi estimada para 2012 uma incidência de 1,1 milhão de novos casos de câncer, com exceção do câncer de pele não melanoma. Desses, cerca de 530 mil novos casos de câncer que foram estimados para o sexo masculino, o mais frequente foi o de próstata (com 152 mil, que representa 28,6% dos casos), acompanhado pelo câncer de pulmão (9,8%) e de colorretal (8,0%). Nas mulheres, dos 560 mil novos casos, os tipos de câncer mais ocorrentes foram o de mama, com 152 mil (27%), seguido pelos cânceres de colo do útero (12,2%) e de colorretal (7,9%) [21]. No Brasil, foi estimada uma incidência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer no biênio 2016-2017, onde cerca de 180 mil desses novos casos de câncer seriam de pele não melanoma [23]. A incidência brasileira de novos casos é semelhante à incidência das regiões da América Latina e do Caribe, onde os cânceres mais frequentes no biênio 2016-2017 por 100 mil habitantes, são o de próstata, com 61.200 mil casos, entre homens e o de mama (57.960 mil) entre as mulheres. Excluindo o câncer de pele não melanoma, os cânceres de próstata (28,6%), de traquéia, de brônquio e de pulmão, com 17.330 mil casos (8,1%), e de cólon e reto, com 16.660 mil (7,8%) casos, são os que apresentam maior ocorrência entre os homens brasileiros. Nas brasileiras, 28,1% (57.960)

dos casos são de câncer de mama, 8,6% (17.620 mil casos) de câncer de cólon e reto e 7,9% (16.340 mil casos) de câncer de colo do útero [23].

Na região Sudeste do Brasil, para cada 100 mil habitantes, foi estimado que nos homens 26,9% (25.800 mil) dos casos de câncer seriam de próstata, seguido do câncer do cólon e reto com 10,5% (10.040 mil) e dos cânceres de traquéia, brônquio e pulmão, com 8,2% (7.870 mil). Com 29.760 mil (30,3%) dos casos de câncer em mulheres, o câncer de mama é o principal, em segundo lugar, com 9.910 mil casos (10,1%), está o câncer do cólon e reto e em terceiro lugar, com 4.940 casos (5,0%), o câncer do colo do útero. No estado de Minas Gerais a previsão para 2016-2017 é de 5.160 mil novos casos de câncer de mama para cada 100 mil mulheres [23].

A taxa de incidência estimada de câncer de mama, por 100 mil mulheres em 2016-2017, varia entre os estados brasileiros. Nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia e Roraima, a variação é de 14,93 a 26,52; de 26,53 a 42,55 nos estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Piauí, Sergipe e Tocantins; de 42,46 a 57,95 nos estados do Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pernambuco e Rio Grande do Norte; e de 57,96 a 91,25 nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo e no Distrito Federal [23]. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama também é o mais frequente nas mulheres das regiões Nordeste, com 38,74 casos por 100 mil mulheres, Centro-Oeste (55,87/100 mil), Sudeste (68,08/100 mil) e Sul (74,30/100 mil). Apenas na região Norte o câncer de mama não se apresenta como o mais ocorrente entre as mulheres, porém ele ocupa a segunda posição entre os cânceres mais comuns nas mulheres dessa região com 22,26 casos a cada 100 mil mulheres [23].

Em relação à etiologia da doença, o câncer é consequência de um contínuo aumento de células anormais, oriundas de um tecido normal após um estímulo, como reações fisiológicas espontâneas ou por agentes carcinogênicos, que podem modificar a estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA) [24]. As células danificadas passam por modificações mutagênicas, podendo acometer e ativar genes especiais conhecidos como proto-oncogenes, que se convertem em oncogenes causadores da malignização das células normais. À medida que as células cancerígenas substituem as células normais, os tecidos que foram invadidos passam a ter disfunções nas suas atividades, podendo levar a falha do órgão ou até mesmo à morte [25].

De forma específica, o câncer de mama (CM) apresenta mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, que são os causadores da proliferação desordenada e anormal das células do tecido. No CM as mutações podem ser causadas inicialmente nos ductos mamários de tamanho médio,

nos ductos terminais e nos lóbulos, sendo caracterizados como carcinoma ductal infiltrante e carcinoma lobular infiltrante, quando invasivo, e carcinoma ductal *in situ* ou carcinoma lobular *in situ*, quando não há infiltração de células, ou seja, local. Em algumas circunstâncias, o crescimento tumoral no CM pode depender do estrogênio, pois esse hormônio interage com os receptores da mama, aumentando a proliferação e o crescimento celular tanto em células saudáveis quanto em células tumorais [25-27].

A sobrevida das pacientes com CM é aumentada pelos tratamentos e ou manejos atuais da doença, pois esses diminuem os riscos de mortalidade. De acordo com especificidade do câncer e da individualidade de cada paciente são definidas as estratégias, que podem ser as abordagens cirúrgicas (radical ou conservadora), a linfadenectomia (esvaziamento axilar de linfonodos), a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia e a terapia anti-hormonal, dentre outros [28, 29]. Alguns dos efeitos adversos da quimioterapia e da terapia anti-hormonal nos pacientes com CM são a diminuição da contagem das células imunológicas, aumento dos níveis de triglicerídeos (TGC), diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) e sobrepeso [30-33].

O quadro clínico dos pacientes com CM, independentemente do tratamento/manejo da doença, como a intervenção neoadjuvante, a cirurgia e a intervenção adjuvante, existem algumas complicações desagradáveis, dolorosas e até incapacitantes [34]. Essas complicações podem ser apresentadas na forma de fadiga muscular [35], distúrbios do sono [36], aumento do processo inflamatório [37], diminuição da aptidão física [38], da massa magra [39], das funções cardiovasculares [40] e da qualidade de vida [41].

## **Membranas Biológicas**

As membranas biológicas são complexos celulares formados por uma bicamada lipídica, composta basicamente por fosfolipídios associados a outras moléculas, como glicolipídeos, colesterol e proteínas [42, 43]. Estas membranas celulares desempenham diversas funções como o transporte seletivo de substâncias entre o meio intracelular e extracelular, a adesão a outras células, a captação de sinais internos e externos e a manutenção da integridade física das células [44, 45].

Para manter sua integridade física, as membranas devem ser capazes de se manterem íntegras, diante dos diversos fatores e condições que podem promover alterações desfavoráveis à sua estrutura, através de uma propriedade definida como estabilidade. Esta propriedade é

desempenhada principalmente pelas proteínas de membranas associadas ao citoesqueleto, que são classificadas em proteínas periféricas e integrais, onde as proteínas periféricas estão voltadas para a parte interna e/ou externa da membrana e as proteínas integrais penetram ou transpõem a bicamada lipídica e interagem com a fração hidrofóbica das moléculas de lipídios [44, 46-50].

A membrana plasmática dos eritrócitos é composta por aproximadamente 52% de proteínas, 40% de lipídios e 8% de carboidratos [51]. O colesterol, a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina, a esfingomielina e a fosfatidilserina representam respectivamente 25%, 25%, 22%, 18% e 10%, dos lipídios constituintes da sua membrana [52]. Os eritrócitos são células bicôncavas, anucleadas, incapazes de se reproduzir, com tempo de vida aproximado de 120 dias e basicamente compostas por hemoglobina, pois perderam suas organelas durante a diferenciação [53-55].

O eritrócito constitui um modelo primário para o estudo das membranas biológicas, pelo fato dele ser desprovido de núcleo e organelas [52]. Além disso, os eritrócitos podem ser considerados um modelo prático de estudo das membranas biológicas, por serem obtidos através de uma ação minimamente invasiva e por apresentarem uma lise celular com a liberação de hemoglobina no meio, a qual pode ser facilmente quantificada por espectrofotometria na região visível do espectro [56].

A composição química e estrutural da membrana, o volume, tamanho e forma dos eritrócitos, o tipo e a quantidade de hemoglobina e a viscoelasticidade são exemplos dos diversos fatores e condições que podem afetar a estabilidade da membrana dos eritrócitos (EME) [57]. A EME pode ser alterada por variações fisiológicas como as variações pós-prandiais, ou por doenças como as hemoglobinopatias, a presença de hematozoários, uremia, cirrose, processos autoimunes, hepatopatias, insuficiência renal e dislipidemias [58-60]. Outros fatores, como alterações no pH, temperatura, idade, quantidade de O<sub>2</sub> e de CO<sub>2</sub> e drogas também afetam a EME [59, 61, 62].

A EME é bastante estudada através da submissão destas células em diferentes gradientes de concentração de NaCl, teste denominado de fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) [62-67]. A FOE permite entender o comportamento dos eritrócitos quando são submetidos a diferentes condições de hipotonicidade, sendo mensurada através do teor de hemoglobina liberada e medida pela absorvância a 540 nm ( $A_{540}$ ) (Figura 1.1) [62-64, 66, 67].

A análise da EME a partir do FOE é uma técnica que avalia de forma termodinâmica o comportamento das membranas. Já o teste de análise de hemólise através de uma abordagem cinética, que é derivada da FOE, permite avaliar a influência do tempo sobre a hemólise,

podendo oferecer um melhor entendimento não só da alteração no estado final do processo, comparado ao inicial, mas também do comportamento dos eritrócitos ao longo do tempo quando submetidos a um estresse hipotônico [68].

Contudo, as alterações físicas ou químicas que podem acometer a estrutura destas membranas estão associadas a alterações na sua funcionalidade. Porém, a estabilidade e a funcionalidade não seguem um padrão linear de sentido absoluto, uma vez que, uma maior estabilidade de membrana nem sempre está associado a uma maior funcionalidade, uma vez que, para garantir uma melhor funcionalidade, a membrana deve apresentar um nível necessário de estabilidade.

### **Membrana Eritrocitária: Obesidade e Câncer**

Até o presente momento apenas dois estudos [64, 69] analisaram a relação entre a obesidade e a fragilidade osmótica dos eritrócitos de forma direta. De Arvelos e colaboradores (2013)[64] verificaram que, em mulheres obesas após serem submetidas a cirurgia bariátrica, o aumento da hemoglobina levou à diminuição da estabilidade de membrana dos eritrócitos, possivelmente por um processo mediado pelo aumento no volume corpuscular médio (VCM). Por outro lado, foi encontrado que a estabilidade de membrana dessas células varia diretamente com a hemoglobina corpuscular média (HCM), provavelmente porque maiores valores de HCM estão relacionados a menores contagens de eritrócitos [64].

Huss (2012) [69] verificou, em adolescentes obesos, o efeito de um programa de tratamento multiprofissional sobre a relação da estabilidade de membrana eritrocitária com as variáveis sanguíneas. Nesse estudo, com 44 adolescentes obesos (16 do sexo masculino e 28 do sexo feminino), após cinco meses de tratamento multiprofissional que incluía orientação nutricional e psicológica e quatro sessões semanais de 30 minutos de exercícios físicos aeróbicos e resistidos, foi constatado um aumento na estabilidade da membrana de eritrócitos, que foi conduzido pelo aumento na distribuição de volume das células vermelhas do sangue (RDW) e provavelmente pela diminuição nos níveis de hemoglobina glicada (Hb1AC) [69].

Contudo, não é possível afirmar que essas alterações na estabilidade de membrana eritrocitária estejam relacionadas apenas à obesidade, uma vez que após a cirurgia bariátrica os pacientes sofrem uma restrição alimentar que leva a um grande impacto sobre sua composição sanguínea, assim como um tratamento multiprofissional com orientação nutricional, psicológica e a prática regular de exercícios físicos também pode modificar a composição do sangue.

No entanto, de forma indireta, podemos inferir que a obesidade por si só, causaria alterações na estabilidade de membrana dos eritrócitos, uma vez que a obesidade é uma doença que provoca, dentre outros problemas, dislipidemia e estresse oxidativo [70-73], sendo que, os níveis de lipídios na corrente sanguínea influenciam a composição da membrana eritrocitária e suas propriedades físicas e químicas podem ser alteradas pelo excesso de colesterol [74-76].

De acordo com Feingold e Grunfeld (2015)[70], cerca de 50% a 60% das pessoas com sobrepeso apresentam dislipidemia e de 60% a 70% dos obesos são dislipidêmicos e quanto maior o aumento do IMC maiores são as anormalidades no metabolismo lipídico, que incluem níveis plasmáticos aumentados de triglicérides e de colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C) e diminuídos do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C).

O estresse oxidativo acontece devido a uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou pela diminuição das defesas antioxidantes. Na obesidade, o estresse oxidativo é um problema sistêmico, pois há um déficit antioxidante e uma formação excessiva de EROs, o que cria condições para vários tipos de doenças (Figuras 1.2 e 1.3) [71-73].

As EROs podem ocasionar danos oxidativos às membranas celulares por terem uma maior solubilidade nos lipídios que constituem a bicamada lipídica que na solução aquosa, de acordo com um processo conhecido como lipoperoxidação ou peroxidação lipídica [77, 78], e por reagirem com proteínas estruturais de membrana, proteínas de transporte de íons e proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinais da membrana [59, 79-81]. A lipoperoxidação da bicamada lipídica do eritrócito promove alterações prejudiciais na permeabilidade, deformabilidade, longevidade, microviscosidade e estabilidade dessa membrana [82, 83].

Em relação ao câncer, Yeo *et al.* (2017)[84] mostram que o câncer de mama também pode levar à dislipidemia, pois em seu estudo, com 280 voluntárias, foi observado que 34,3% e 56,1% das participantes estavam com o colesterol total e o colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) alterados, respectivamente. Quanto à fragilidade osmótica e câncer, ainda não há um consenso na literatura, pois há uma grande variabilidade de tipos de câncer, de tratamentos e manejos da doença. Em animais, a irradiação de todo o corpo levou ao aumento da peroxidação lipídica nos tecidos e nos componentes sanguíneos, incluindo os eritrócitos. Porém esse aumento na lipoperoxidação nos eritrócitos não resultou em uma maior tendência à hemólise [85]. Já em humanos, a exposição a irradiação levou a mudanças na fluidez da membrana dos eritrócitos [86].

De acordo com Alzahrani e Al-Sewaidan (2017)[87] a irradiação gama pode causar danos às membranas das células vermelhas do sangue e é dependente da dose. As modificações,

causadas ao nível de nano-escala, podem afetar as propriedades biofísicas das membranas, resultando em comprometimento da sua função. Já radiação alfa afeta a estabilidade da membrana de eritrócitos, mesmo em doses baixas. No entanto, a hemólise depende, dentre outros fatores, do tempo de exposição à radiação [88].

Pacientes com câncer do colo do útero, quando comparados com indivíduos saudáveis, apresentaram anormalidades estruturais e funcionais nos eritrócitos, como aumento na fragilidade osmótica, aumento na permeabilidade de membrana e perda de fluidez, que são causadas, dentre outros fatores, por um aumento da peroxidação lipídica e insuficiência no potencial antioxidante [89]. Em contrapartida, Khoshbin *et al.* (2015)[90] verificaram que em mulheres com câncer de mama, em um programa de tratamento padrão com radioterapia e quimioterapia, não houve um aumento significativo na peroxidação lipídica e na fragilidade osmótica de eritrócitos nos diferentes estágios do tratamento.

## **Considerações Finais**

A obesidade tem sido considerada uma doença epidêmica, porque há uma grande incidência tanto em países em desenvolvimento com em países desenvolvidos. Hoje essa doença é um dos principais problemas de saúde pública nesses países, uma vez que pode desencadear várias outras doenças como doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, respiratórias, articulares, *diabetes mellitus* do tipo 2, distúrbios musculoesqueléticos e câncer, além de contribuir para mortes prematuras.

Assim como a obesidade, o câncer tem uma grande incidência em todos os países do mundo e em todas as regiões do globo terrestre, sem fazer distinção do nível de desenvolvimento do país. O câncer de mama é o principal tipo de câncer em mulheres, e tem a maior ocorrência entre todos os tipos de câncer no mundo.

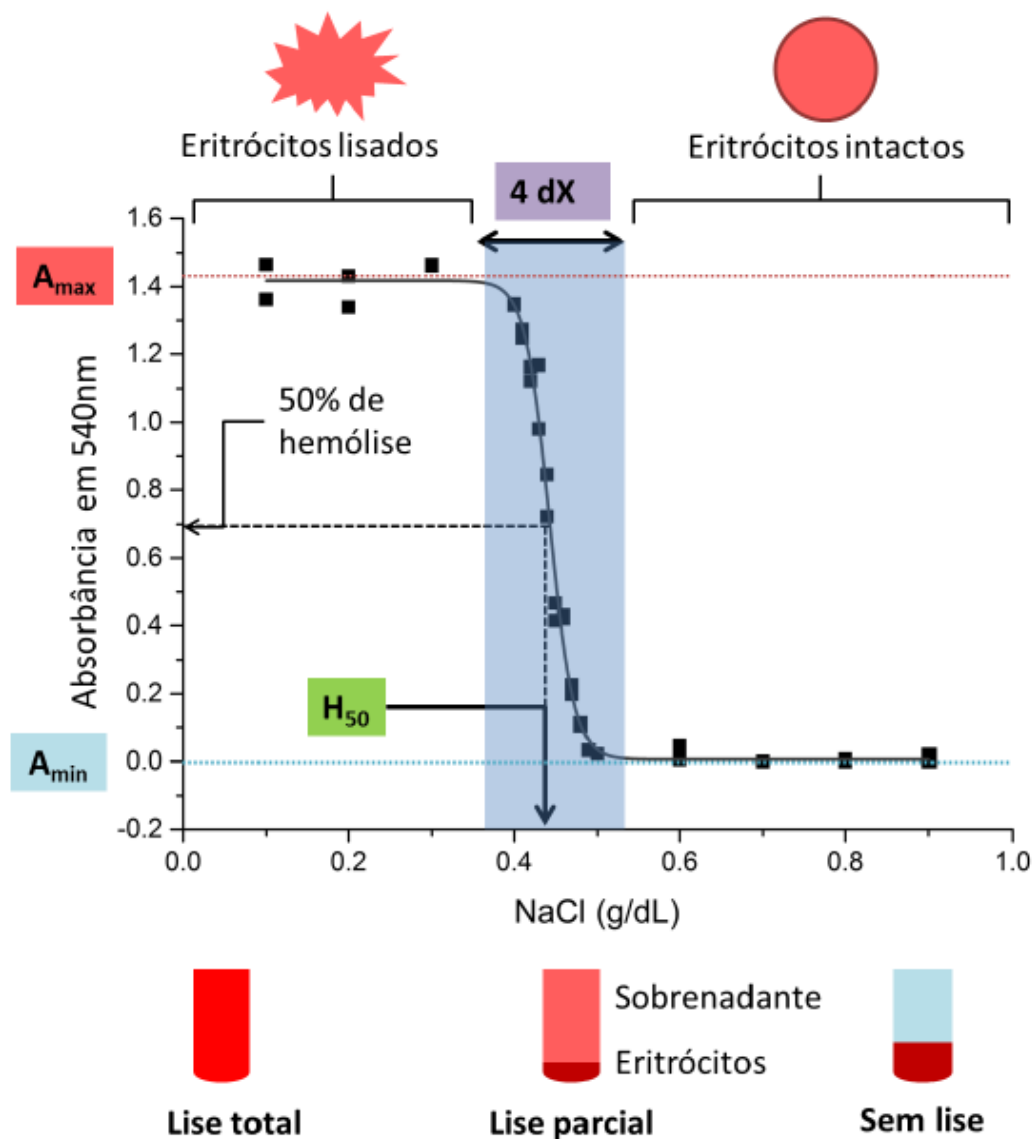
Analisar a estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos em doenças como a obesidade e o câncer de mama se faz necessário para podermos entender mais sobre cada uma delas e assim poder auxiliar no manejo, no tratamento e na melhora da qualidade de vida das pessoas acometidas por essas doenças.

No capítulo 2 será abordada a associação entre a estabilidade de membrana de eritrócitos com a distribuição de volume das células vermelhas do sangue (RDW), sob a influência antagônica dos níveis do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e

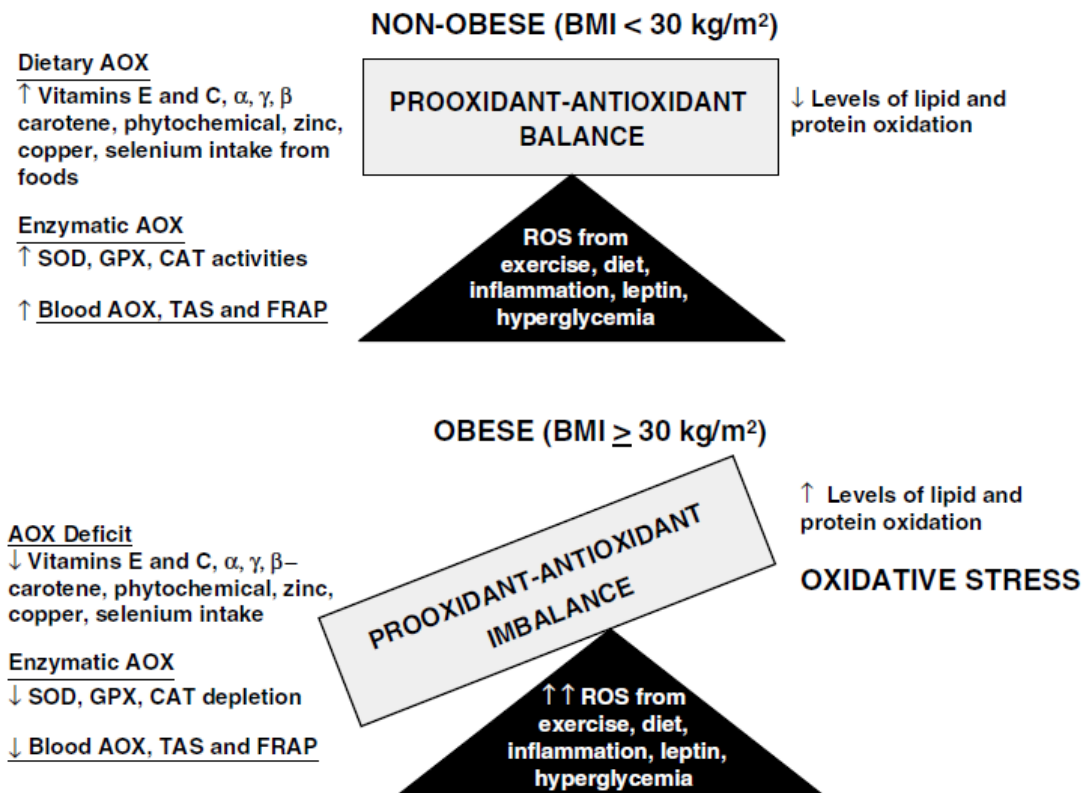


do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) em mulheres obesas submetidas a cirurgia bariátrica.

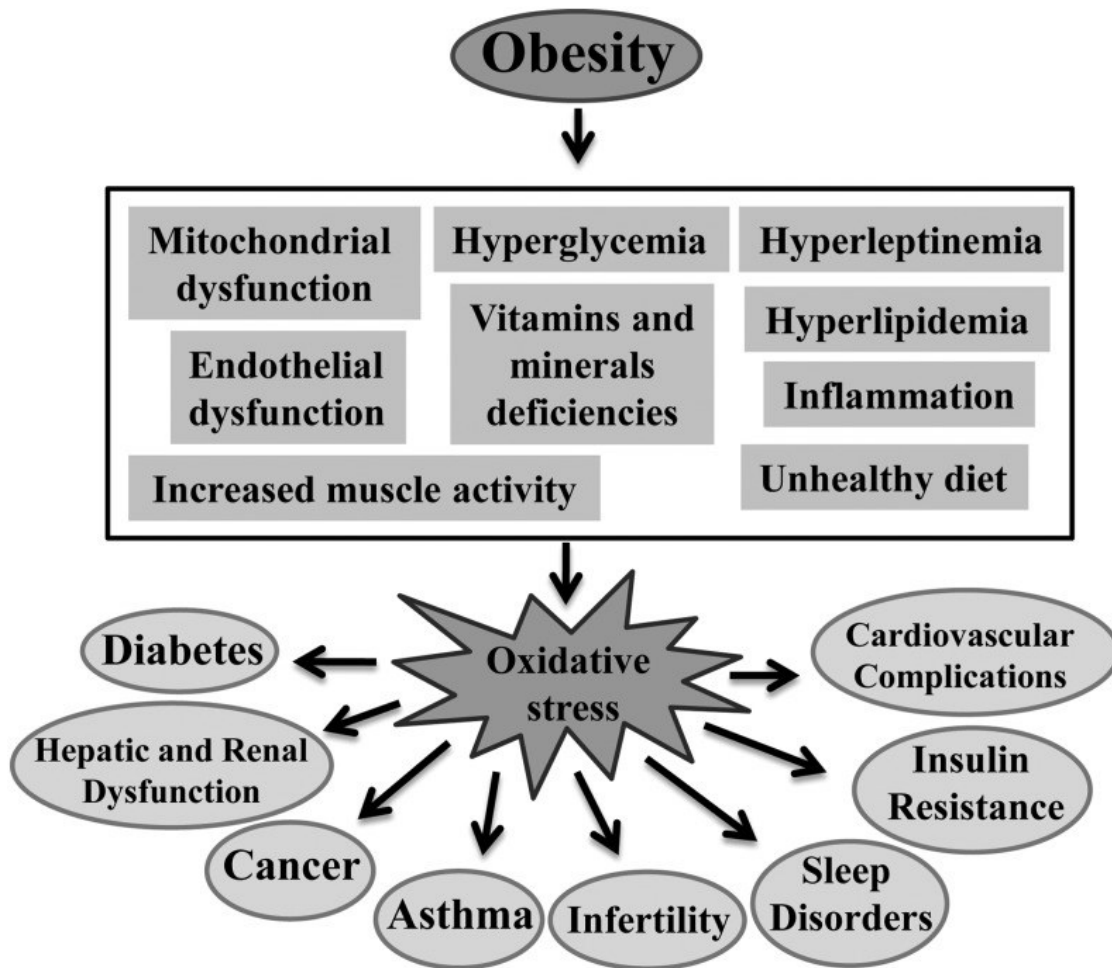
E no capítulo 3 será abordada a relação entre a estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos com variáveis hematológicas, bioquímicas e nutricionais em mulheres sobreviventes de câncer de mama.



**Figura 1.1.** Curva de lise hipotônica de eritrócitos em gradiente de concentração de NaCl. Fonte: Garrote Filho, (2014)[91].



**Figura 1.2.** Equilíbrio pró-oxidante e antioxidante em indivíduos não obesos e obesos. BMI, Índice de Massa Corporal; ROS, Espécies Reativas de Oxigênio; AOX, Antioxidante; SOD, Superóxido Dismutase; GPX, Glutathiona Peroxidase; CAT, Catalase; TAS, Estado Antioxidante Total; FRAP, Potencial de Redução de Ácido Férrico. Fonte: Vincent e Taylor, (2006)[73].



**Figura 1.3.** Condições que geram estresse oxidativo na patogenia da obesidade e seu papel no desenvolvimento de doenças associadas. Fonte: Manna e Jain, (2015)[71].

**Tabela 1.1.** Percentual de homens e mulheres com 18 anos ou mais de idade com sobrepeso e obesidade nas capitais brasileiras.

Ano	Sobrepeso (IMC $\geq$ 25 kg/m <sup>2</sup> )			Obesidade (IMC $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> )		
	Homens (%)	Mulheres (%)	Total (%)	Homens (%)	Mulheres (%)	Total (%)
2006	47,3	38,8	43,0	11,3	11,5	11,4
2007	49,2	37,8	43,4	13,7	12,0	12,9
2008	47,3	39,5	43,3	12,4	13,6	13,0
2009	51,0	42,3	46,6	13,7	14,0	13,9
2010	52,1	44,3	48,1	14,4	15,5	15,0
2011	52,6	44,7	48,5	15,6	16,0	15,8
2012	54,5	48,1	51,0	16,5	18,2	17,4
2013	54,7	47,4	50,8	17,5	17,5	17,5
2014	56,5	49,1	52,5	17,6	17,2	17,9
2015	60,4	45,9	52,3	18,0	16,2	17,0
2016	57,7	50,5	53,8	18,1	19,6	18,9

Adaptado de Brasil (2007, 2009a, 2009b, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2017a e 2017b)[7-17].

**Tabela 1.2.** Capitais brasileiras com maiores e menores percentuais de sobrepeso e obesidade

Ano	Sobrepeso (IMC $\geq$ 25 kg/m <sup>2</sup> )		Obesidade (IMC $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> )	
	Menor % (Cidade)	Maior % (Cidade)	Menor % (Cidade)	Maior % (Cidade)
2006	34,1 (São Luiz, MA)	- 48,3 (Rio de Janeiro, RJ)	8,7 (Belo Horizonte, MG e São Luís, MA)	- 13,9 (João Pessoa, PB)
2007	33,4 (Palmas, TO)	- 49,7 (Cuiabá, MT)	8,8 (Palmas, TO)	- 16,1 (Macapá, AP)
2008	36,6 (Teresina, PI)	- 49,0 (Porto Alegre, RS)	9,5 (São Luís, MA)	- 15,9 (Porto Alegre, RS)
2009	36,2 (Brasília, DF)	- 52,2 (Rio Branco, AC)	8,8 (Palmas, TO)	- 17,7 3 (Rio de Janeiro, RJ)
2010	36,6 (Palmas, TO)	- 55,2 (Rio Banco, AC)	9,5 (Brasília, DF)	- 18,7 (Cuiabá, MT)
2011	39,9 (São Luís, MA)	- 55,4 (Porto Alegre, RS)	12,5 (Palmas, TO)	- 21,4 (Macapá, AP)
2012	45,3 (São Luís, MA)	- 56,3 (Campo Grande, MS)	13,2 (São Luís, MA)	- 21,3 (Rio Banco, AC)
2013	41,7 (São Luís, MA)	- 54,9 (Cuiabá, MT)	13,2 (São Luís, MA)	- 22,4 (Cuiabá, MT)
2014	46,4 (São Luís, MA)	- 56,2 (Manaus, AM)	14,3 (Florianópolis, SC)	- 21,8 (Campo Grande, MS)
2015	45,3 (Goiânia, GO)	- 59,7 (Campo Grande, MS)	11,1 (Goiânia, GO)	- 22,3 (Campo Grande, MS)
2016	47,7 (Palmas, TO)	- 60,6 (Rio Banco, AC)	14,5 (Florianópolis, SC)	- 23,8 (Rio Banco, AC)

Abreviações: AC = Acre; AM = Amazonas; AP = Amapá; DF = Distrito Federal; GO = Goiás; MA = Maranhão; MG = Minas Gerais; MS = Mato Grosso do Sul; MT = Mato Grosso; PB = Paraíba; PI = Piauí; RJ = Rio de Janeiro; RS = Rio Grande do Sul; SC = Santa Catarina; TO = Tocantins.

Adaptado de Brasil (2007, 2009a, 2009b, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2017a e 2017b) [7-17].

**Tabela 1.3.** Classificação de sobrepeso em adultos de acordo com IMC.

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Abaixo do peso	< 18,5
Peso normal	18,5 – 24,9
Sobrepeso	≥ 25,0
Pré-Obesidade	25,0 – 29,9
Obesidade grau I	30,0 – 34,9
Obesidade grau II	35,0 – 39,9
Obesidade grau III	≥ 40,0

IMC = Índice de massa corporal. Adaptado de WHO, (1998 e 2000)[19, 20].

## Referências

1. Piaggi P, Vinales KL, Basolo A, Santini F, Krakoff J. Energy expenditure in the etiology of human obesity: spendthrift and thrifty metabolic phenotypes and energy-sensing mechanisms. *J Endocrinol Invest*. 2017. Epub 2017/07/26. doi: <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0732-9>. PubMed PMID: 28741280.
2. Serra-Majem L, Bautista-Castano I. Etiology of obesity: two "key issues" and other emerging factors. *Nutr Hosp*. 2013;28 Suppl 5:32-43. Epub 2013/10/22. doi: 10.3305/nh.2013.28.sup5.6916. PubMed PMID: 24010742. Available from: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/6916.pdf>.
3. WHO. Health topics: Obesity 2017a [cited 2017 20/10/2017]. Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>.
4. WHO. Global Health Observatory (GHO) data 2017b [cited 2017 20/10/2017]. Available from: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/).
5. WHO. Obesity and overweight 2017c [cited 2017 20/10/2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
6. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-81. Epub 2014/06/02. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60460-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8). PubMed PMID: 24880830; PubMed Central PMCID: PMC4624264.
7. Brasil. Vigitel Brasil 2006: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2007. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2006.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2006.pdf).
8. Brasil. Vigitel Brasil 2007: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2009a. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2007.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2007.pdf).
9. Brasil. Vigitel Brasil 2008: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2009b. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2008.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2008.pdf).
10. Brasil. Vigitel Brasil 2009: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2010. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2009.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2009.pdf).
11. Brasil. Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2011. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_2010.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_2010.pdf).
12. Brasil. Vigitel Brasil 2011: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2012. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2011\\_fatores\\_risco\\_doencas\\_cronicas.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2011_fatores_risco_doencas_cronicas.pdf).
13. Brasil. Vigitel Brasil 2012: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.



- Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2013. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2012\\_vigilancia\\_risco.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2012_vigilancia_risco.pdf).
14. Brasil. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2014. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2013.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2013.pdf).
  15. Brasil. Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2015. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2014.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2014.pdf).
  16. Brasil. Vigitel Brasil 2015: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2017a. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2015.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2015.pdf).
  17. Brasil. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa; 2017b. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2016\\_fatores\\_risco.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2016_fatores_risco.pdf).
  18. Garrow JS, WEBSTER J. Quetelet's index (W/H<sup>2</sup>): as a measure of fatness. *Int J Obesity*. 1985;9:147-53.
  19. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity: 1997. Geneva: World Health Organization; 1998.
  20. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity: 1999. Geneva: World Health Organization; 2000.
  21. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. Epub 2014/09/16. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>. PubMed PMID: 25220842.
  22. Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization; 2014.
  23. INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2015. Available from: <https://santacasadermatoazulay.com.br/wp-content/uploads/2017/06/estimativa-2016-v11.pdf>.
  24. INCA. ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. 3 ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.; 2017. Available from: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/colecionasus/2017/35569/35569-1489.pdf>.
  25. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2 ed. Science G, editor 2013.
  26. Amendola LCB, Vieira RA. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Rev Bras Cancerol*. 2005;51(4):325-30. doi: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2005v51n4.1927>.
  27. Buitrago F, Uemura G, Sena MCF. Fatores prognósticos em câncer de mama. *Com Ciências Saúde*. 2011;22(1):S69-S82. Available from: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/fatores\\_prognosticos.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/fatores_prognosticos.pdf).
  28. Chen ZL, Shen YW, Li ST, Li CL, Zhang LX, Yang J, et al. The efficiency and safety of trastuzumab and lapatinib added to neoadjuvant chemotherapy in Her2-positive breast cancer patients: a randomized meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:3233-47. Epub 2016/06/18. doi: <https://doi.org/10.2147/OTT.S106055>. PubMed PMID: 27313469; PubMed Central PMCID: PMC4892834.

29. Steward LT, Gao F, Taylor MA, Margenthaler JA. Impact of radiation therapy on survival in patients with triple-negative breast cancer. *Oncol Lett.* 2014;7(2):548-52. Epub 2014/01/08. doi: <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1700>. PubMed PMID: 24396485; PubMed Central PMCID: PMC3881939.
30. Alexopoulos CG, Pournaras S, Vaslamatzis M, Avgerinos A, Raptis S. Changes in serum lipids and lipoproteins in cancer patients during chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1992;30(5):412-6. Epub 1992/01/01. PubMed PMID: 1505080. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00689971>.
31. Love RR, Wiebe DA, Newcomb PA, Cameron L, Leventhal H, Jordan VC, et al. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1991;115(11):860-4. Epub 1991/12/01. PubMed PMID: 1952472. doi: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-115-11-860>.
32. Makari-Judson G, Braun B, Jerry DJ, Mertens WC. Weight gain following breast cancer diagnosis: Implication and proposed mechanisms. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):272-82. Epub 2014/08/13. doi: <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.272>. PubMed PMID: 25114844; PubMed Central PMCID: PMC4127600.
33. Sewell HF, Halbert CF, Robins RA, Galvin A, Chan S, Blamey RW. Chemotherapy-induced differential changes in lymphocyte subsets and natural-killer-cell function in patients with advanced breast cancer. *Int J Cancer.* 1993;55(5):735-8. Epub 1993/11/11. PubMed PMID: 7902339. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910550506>.
34. NIC. Breast cancer: U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Cancer Institute; 2017 [cited 2017 01/11/2017]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp>.
35. Barton-Burke M. Cancer-related fatigue and sleep disturbances. Further research on the prevalence of these two symptoms in long-term cancer survivors can inform education, policy, and clinical practice. *Am J Nurs.* 2006;106(3 Suppl):72-7. Epub 2006/02/17. PubMed PMID: 16481861. doi: <https://doi.org/10.1097/00000446-200603003-00025>.
36. Ray M, Rogers LQ, Trammell RA, Toth LA. Fatigue and sleep during cancer and chemotherapy: translational rodent models. *Comp Med.* 2008;58(3):234-45. Epub 2008/07/01. PubMed PMID: 18589865; PubMed Central PMCID: PMC2704115. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704115/pdf/cm2008000234.pdf>.
37. LaVoy EC, Fagundes CP, Dantzer R. Exercise, inflammation, and fatigue in cancer survivors. *Exerc Immunol Rev.* 2016;22:82-93. Epub 2016/02/09. PubMed PMID: 26853557; PubMed Central PMCID: PMC4755327. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4755327/pdf/nihms757716.pdf>.
38. Davis MP, Walsh D. Mechanisms of fatigue. *J Support Oncol.* 2010;8(4):164-74. Epub 2010/09/09. PubMed PMID: 20822034.
39. Gordon JN, Trebble TM, Ellis RD, Duncan HD, Johns T, Goggin PM. Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. *Gut.* 2005;54(4):540-5. Epub 2005/03/09. doi: <https://doi.org/10.1136/gut.2004.047563>. PubMed PMID: 15753541; PubMed Central PMCID: PMC1774430.
40. Vigo C, Gatzemeier W, Sala R, Malacarne M, Santoro A, Pagani M, et al. Evidence of altered autonomic cardiac regulation in breast cancer survivors. *J Cancer Surviv.* 2015;9(4):699-706. Epub 2015/04/23. doi: [10.1007/s11764-015-0445-z](https://doi.org/10.1007/s11764-015-0445-z). PubMed PMID: 25899303. doi: <https://doi.org/10.1007/s11764-015-0445-z>.
41. Matisakova I, Bielik J, Kormancova R, Bystricky B, Melus V. Quality Of Life In Patients With Breast Cancer In Slovakia. *Value Health.* 2015;18(7):A475. Epub 2015/11/05. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jval.2015.09.1272>. PubMed PMID: 26532668.

42. Cooper RA. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med.* 1977;297(7):371-7. Epub 1977/08/18. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM197708182970707>. PubMed PMID: 327326.
43. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972;175(4023):720-31. Epub 1972/02/18. PubMed PMID: 4333397. doi: <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
44. Campbell MK. *Bioquímica.* 3 ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed; 2000.
45. Storry JR. A review: modification of the red blood cell membrane and its application in blood group serology. *Immunohematology.* 2000;16(3):101-4. Epub 2004/09/18. PubMed PMID: 15373612. doi: <https://doi.org/10.21307/immunohematology-2019-586>.
46. Evans EA, Hochmuth RM. A solid-liquid composite model of the red cell membrane. *J Membr Biol.* 1977;30(4):351-62. Epub 1977/01/28. PubMed PMID: 839527. doi: <https://doi.org/10.1007/BF01869676>.
47. Fischer TM, Haest CW, Stohr M, Kamp D, Deuticke B. Selective alteration of erythrocyte deformability by SH-reagents: evidence for an involvement of spectrin in membrane shear elasticity. *Biochim Biophys Acta.* 1978;510(2):270-82. Epub 1978/07/04. PubMed PMID: 667045. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90027-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90027-5).
48. Mohandas N, Chasis JA, Shohet SB. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *Semin Hematol.* 1983;20(3):225-42. Epub 1983/07/01. PubMed PMID: 6353591.
49. Smith DK, Palek J. Sulfhydryl reagents induce altered spectrin self-association, skeletal instability, and increased thermal sensitivity of red cells. *Blood.* 1983;62(6):1190-6. Epub 1983/12/01. PubMed PMID: 6640108. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V62.6.1190.1190>.
50. van den Akker E, Satchwell TJ, Williamson RC, Tøye AM. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(1):1-8. Epub 2010/03/30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcmbd.2010.02.019>. PubMed PMID: 20346715.
51. Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1994;23:787-818. Epub 1994/01/01. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.23.060194.004035>. PubMed PMID: 7919799.
52. Murray RK, Granner DK. Membranas: estrutura, montagem e função. In: Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Harper's Biochemistry.* São Paulo: Atheneu; 2002.
53. Gordon-Smith T. Red blood cells. *Surgery.* 2007;25(2):57-60. doi: [10.1016/j.mpsur.2006.12.004](https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2006.12.004). doi: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2006.12.004>.
54. Gordon-Smith T. Structure and function of red and white blood cells. *Medicine.* 2013;41(4):193-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.01.023>.
55. Smith JA. Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Med.* 1995;19(1):9-31. Epub 1995/01/01. PubMed PMID: 7740249. doi: <https://doi.org/10.2165/00007256-199519010-00002>.
56. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 6 ed. New York: Freeman; 2012.
57. Perk K, Frei YF, Herz A. Osmotic Fragility of Red Blood Cells of Young and Mature Domestic and Laboratory Animals. *Am J Vet Res.* 1964;25:1241-8. Epub 1964/07/01. PubMed PMID: 14266876.
58. Stasiw DM, Rosato S, Mazza J, Cerny LC. Quantitative osmotic fragility and disease states: a preliminary study. *J Lab Clin Med.* 1977;89(2):409-13. Epub 1977/02/01. PubMed PMID: 833476.

59. Uydu HA, Yildirmis S, Orem C, Calapoglu M, Alver A, Kural B, et al. The effects of atorvastatin therapy on rheological characteristics of erythrocyte membrane, serum lipid profile and oxidative status in patients with dyslipidemia. *J Membr Biol.* 2012;245(11):697-705. Epub 2012/06/19. doi: <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9441-7>. PubMed PMID: 22706680.
60. Uydu HA, Bostan M, Atak M, Yilmaz A, Demir A, Akcan B, et al. Cholesterol forms and traditional lipid profile for projection of atherogenic dyslipidemia: lipoprotein subfractions and erythrocyte membrane cholesterol. *J Membr Biol.* 2014;247(2):127-34. Epub 2013/11/19. doi: <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9611-2>. PubMed PMID: 24240543; PubMed Central PMCID: PMC3905181.
61. Suess J, Limentani D, et al. A quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility. *Blood.* 1948;3(11):1290-303. Epub 1948/11/01. PubMed PMID: 18886505. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V3.11.1290.1290>.
62. 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.* 2010;233(1-3):127-34. Epub 2010/02/11. doi: <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9232-y>. PubMed PMID: 20146058.
63. 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.* 2007;39(4):341-7. Epub 2007/10/06. doi: <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9092-z>. PubMed PMID: 17917799.
64. de Arvelos LR, Rocha VC, Felix GP, da Cunha CC, Bernardino Neto M, da Silva Garrote Filho M, 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.* 2013;246(3):231-42. Epub 2013/01/25. doi: <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9524-0>. PubMed PMID: 23344659.
65. 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.* 2010;9:29. Epub 2010/06/24. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-925X-9-29>. PubMed PMID: 20569460; PubMed Central PMCID: PMC32895611.
66. Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, da Costa Huss JC, de Souza TM, de Freitas MV, et al. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev.* 2007;128(7-8):444-9. Epub 2007/08/08. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.06.007>. PubMed PMID: 17681589.
67. Penha-Silva N, Arvelos LR, Cunha CC, Aversi-Ferreira TA, Gouvea-e-Silva LF, Garrote-Filho MS, et al. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry.* 2008;73(1):23-9. Epub 2008/05/23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.04.002>. PubMed PMID: 18495554.
68. Cunha LM, Bernardino-Neto M, Garrote-Filho MS, Avelar CB, de Freitas MV, Netto RCM, et al. Kinetics of hypotonic lysis of human erythrocytes. *Analytical Methods.* 2014;6(5):1377-83. doi: <https://doi.org/10.1039/c3ay41404c>.
69. Huss JCC. Efeito do tratamento multiprofissional sobre a relação da estabilidade de membrana de eritrócitos com variáveis sanguíneas em adolescentes obesos. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2012. Available from: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15865/1/EfeitoTratamentoMultiprofissional.pdf>.
70. Feingold KR, Grunfeld C. Obesity and Dyslipidemia. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA)2015.

71. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015;13(10):423-44. Epub 2015/11/17. doi: <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>. PubMed PMID: 26569333; PubMed Central PMCID: PMCPMC4808277.
72. Rupérez AI, Gil A, Aguilera CM. Genetics of oxidative stress in obesity. *Int J Mol Sci*. 2014;15(2):3118-44. Epub 2014/02/25. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms15023118>. PubMed PMID: 24562334; PubMed Central PMCID: PMCPMC3958901.
73. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(3):400-18. Epub 2005/11/23. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803177>. PubMed PMID: 16302012.
74. Bhandaru R, Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. Effects of diabetes and high fat-high cholesterol diet on plasma lipid levels and on erythrocyte membrane composition. *Atherosclerosis*. 1982;42(2-3):263-72. Epub 1982/04/01. PubMed PMID: 6462153. doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(82\)90156-3](https://doi.org/10.1016/0021-9150(82)90156-3).
75. Cooper RA, Durocher JR, Leslie MH. Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. *J Clin Invest*. 1977;60(1):115-21. Epub 1977/07/01. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI108747>. PubMed PMID: 874076; PubMed Central PMCID: PMCPMC372349.
76. Hui DY, Harmony JA. Interaction of plasma lipoproteins with erythrocytes. I. Alteration of erythrocyte morphology. *Biochim Biophys Acta*. 1979;550(3):407-24. Epub 1979/02/02. PubMed PMID: 217429. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(79\)90145-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90145-7).
77. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1175-213. Epub 2007/10/12. doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2006>. PubMed PMID: 17928583.
78. Moreau R, Nguyen BT, Doneanu CE, Hagen TM. Reversal by aminoguanidine of the age-related increase in glycooxidation and lipoxidation in the cardiovascular system of Fischer 344 rats. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(1):29-40. Epub 2004/12/14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.09.006>. PubMed PMID: 15588711.
79. Koter M, Franiak I, Strychalska K, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J. Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(2):205-15. Epub 2003/12/04. PubMed PMID: 14643886. doi: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00195-X).
80. 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. Epub 2009/12/10. doi: <https://doi.org/10.3233/CH-2009-1245>. PubMed PMID: 19996523.
81. Mason RP, Walter MF, Day CA, Jacob RF. Active metabolite of atorvastatin inhibits membrane cholesterol domain formation by an antioxidant mechanism. *J Biol Chem*. 2006;281(14):9337-45. Epub 2006/02/09. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M513000200>. PubMed PMID: 16464853.
82. Arslan M, Metin Comu F, Kucuk A, Ozturk L, Yaylak F. Dexmedetomidine protects against lipid peroxidation and erythrocyte deformability alterations in experimental hepatic ischemia reperfusion injury. *Libyan J Med*. 2012;7. Epub 2012/05/31. doi: <https://doi.org/10.3402/ljm.v7i0.18185>. PubMed PMID: 22645631; PubMed Central PMCID: PMCPMC3360891.
83. Sivilotti ML. Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicol Rev*. 2004;23(3):169-88. Epub 2005/05/03. PubMed PMID: 15862084. Available from: <https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00004>.
84. Yeo W, Mo FKF, Pang E, Suen JJS, Koh J, Loong HHF, et al. Profiles of lipids, blood pressure and weight changes among premenopausal Chinese breast cancer patients after

- adjuvant chemotherapy. *BMC Womens Health*. 2017;17(1):55. Epub 2017/07/29. doi: <https://doi.org/10.1186/s12905-017-0409-8>. PubMed PMID: 28750616; PubMed Central PMCID: PMC5532788.
85. Kergonou JF, Thiriot C, Barquet M, Ducouso R, Rocquet G. Influence of whole-body  $\gamma$ -irradiation upon rat erythrocyte: lipid peroxidation and osmotic fragility. *Biochimie*. 1986;68:311 - 8. doi: [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(86\)80028-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(86)80028-1).
  86. Schön W, Ziegler C, Gartner H, Kraft G. Heavy ion induced membrane damage: hemolysis of erythrocytes and changes in erythrocyte membrane fluidity. *Radiat Environ Biophys*. 1994;33(3):233-41. Epub 1994/01/01. PubMed PMID: 7809369. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF01212679>.
  87. AlZahrani K, Al-Sewaidan HA. Nanostructural Changes in the Cell Membrane of Gamma-Irradiated Red Blood Cells. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2017;33(1):109-15. Epub 2017/02/15. doi: <https://doi.org/10.1007/s12288-016-0657-z>. PubMed PMID: 28194066; PubMed Central PMCID: PMC5280849.
  88. Kaczmarek M, Zydek D, Wilklacz-Potoczny J, Fornal M, Grodzicki T, Kochowska E, et al. The influence of very small doses of alpha radiation on the stability of erythrocytes. *Microsc Res Tech*. 2017;80(1):131-43. Epub 2016/11/20. doi: <https://doi.org/10.1002/jemt.22803>. PubMed PMID: 27859863.
  89. Kolanjiappan K, Manoharan S, Kayalvizhi M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2002;326(1-2):143-9. Epub 2002/11/06. PubMed PMID: 12417105. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00300-5).
  90. Khoshbin AR, Mohamadabadi F, Vafaeian F, Babania A, Akbarian S, Khandozi R, et al. The effect of radiotherapy and chemotherapy on osmotic fragility of red blood cells and plasma levels of malondialdehyde in patients with breast cancer. *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*. 2015;20(4):305-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.11.002>. PubMed PMID: 26109919; PubMed Central PMCID: PMC4477123.
  91. Garrote Filho MS. Análise multivariada da estabilidade osmótica de eritrócitos em indivíduos saudáveis dos gêneros masculino e feminino. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2014. Available from: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15752/1/AnaliseMultivariadaEstabilidade.pdf>.

## Capítulo 2

# **Erythrocyte membrane stability is associated with the red cells distribution width, under the antagonistic influences of the levels of LDL- and HDL-cholesterol**

### **Cholesterol, red-cells stability and distribution width**

Wener Barbosa-Resende<sup>1</sup>, Vanessa Custódio Afonso Rocha<sup>2</sup>, Leticia Ramos de Arvelos<sup>1</sup>, Lucas Moreira Cunha<sup>1</sup>, Alice Vieira da Costa<sup>1</sup>, Elmiro Santos Resende<sup>2</sup>, Ubirajara Coutinho Filho<sup>3</sup>, Nilson Penha-Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

## Resumo

**A estabilidade da membrana dos eritrócitos está associada à distribuição de volume das células vermelhas do sangue, sob a influência antagônica dos níveis de LDL- e HDL-colesterol**

**Fundamentação:** A obesidade causa mudanças bioquímicas que podem afetar a composição e o comportamento de muitas células no corpo, como os eritrócitos. **Métodos:** O objetivo deste estudo foi entender melhor como a estabilidade da membrana dos eritrócitos é afetada pelo tipo de cirurgia bariátrica conhecida como desvio gástrico em Y-de-Roux (*RYGB*), usando análise de componentes principais (*PCA*) e máquina de vetores de suporte (*VSM*). Uma população de 24 mulheres obesas ( $36,46 \pm 9,8$  anos) foi avaliada antes e aos 14, 28, 42 e 56 dias após a cirurgia. **Resultados:** As relações entre estabilidade de membrana de eritrócitos e índices antropométricos, hematimétricos e bioquímicos foram analisadas por *PCA* e *VSM*. A *PCA* mostrou que 1) a perda de peso das voluntárias do estudo foi associada a uma diminuição da contagem de glóbulos vermelhos e ao aumento nos índices hematológicos, volume corpuscular médio (*MCV*), hemoglobina corpuscular média (*MCH*) e concentração média de hemoglobina corpuscular (*MCHC*); 2) menor colesterol total (*t-C*) e menor colesterol da lipoproteína de baixa densidade (*LDL-C*) foram associados a valores mais altos de hemoglobina (Hb) e de hematócrito (Ht); 3) níveis mais baixos de triglicérides (TGC) e colesterol da lipoproteínas de muito baixa densidade (*VLDL-C*) e níveis mais elevados de colesterol da lipoproteínas de alta densidade (*HDL-C*) foram associados a valores mais baixos da distribuição de volume das células vermelhas do sangue (*RDW*). A *SVM* mostrou que as variáveis de estabilidade de eritrócitos possuem relações não-lineares com *RDW*, sob a influência antagônica dos níveis de *LDL-C* em relação às concentrações de *HDL-C*. **Conclusão:** A estabilidade da membrana de eritrócitos está associada à distribuição de volume das células vermelhas do sangue, sob as influências antagônicas dos níveis de LDL e HDL-colesterol.

**Palavras-chave:** Análise de componentes principais, máquina de vetor de suporte, cirurgia bariátrica, estabilidade da membrana de eritrócitos



## Abstract

### **Erythrocyte membrane stability is associated with the red cells distribution width, under the antagonistic influences of the levels of LDL- and HDL-cholesterol**

**Background:** Obesity causes biochemical changes that can affect the composition and behavior of many cells in the body, such as erythrocytes. **Methods:** The aim of this study was to better understand how the erythrocyte membrane stability is affected by the type of bariatric surgery known as Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) using principal component analysis (PCA) and support vector machine (VSM). A population of 24 obese females ( $36.46 \pm 9.8$  years) was assessed before and at 14, 28, 42 and 56 days after surgery. **Results:** The relations between erythrocyte membrane stability and anthropometric, hematimetric and biochemical indices were analyzed by PCA and SVM. PCA showed that 1) the weight loss of study volunteers was associated with a decrease in red blood cell counts and increase in the hematologic indices mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); 2) lower total (t-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were associated with higher hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) values; 3) lower levels of triglycerides (TGC) and very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) and higher levels of high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were associated with lower values of red cell distribution width (RDW). SVM showed that the erythrocyte stability variables have nonlinear relations with RDW, under the antagonistic influence of the levels of LDL-C in relation to the HDL-C concentrations. **Conclusion:** Erythrocyte membrane stability is associated with the red cells distribution width, under the antagonistic influences of the levels of LDL- and HDL-cholesterol.

**Key words:** Principal component analysis, support vector machine, bariatric surgery, erythrocyte membrane stability

## Introduction

Obesity is a disorder caused by excess energy intake, which results in accumulation of fat [1] and tendency to elevation in the blood levels of triglycerides (TGC), total (t-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), which in turn predisposes to the development of various other diseases, such as atherosclerosis, hypertension, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus [2].

Elevated cholesterol levels may alter the composition and various properties of the erythrocyte membrane, such as permeability, deformability and osmotic stability [3-5]. Both LDL as the high density lipoprotein (HDL) may affect erythrocyte membrane composition, by the addition and removal of cholesterol, respectively [6,7].

The osmotic stability of the erythrocyte membrane can be evaluated by subjecting these cells to hypotonicity gradient, and quantitating hemoglobin released during hemolysis by spectrophotometry [8,9]. The curve of absorbance as a function of NaCl concentration can be adjusted by sigmoidal regression, with basis in the Boltzmann equation, which comprises two constants,  $H_{50}$  and  $dX$ , the first with an inverse relation and the second with a direct relation with the stability of red cell membrane. In many studies, it has been used the inverse of the constant  $H_{50}$  ( $1/H_{50}$  or  $invH_{50}$ ) in order to both constants ( $dX$  and  $invH_{50}$ ) have direct relations with the erythrocyte membrane stability. These constants are highly dependent on blood internal milieu, especially with lipid profile variables, and have enough interindividual variability to make them relevant variables in the study of dyslipidemias [10-12].

Furthermore, the variables  $dX$  and  $H_{50}$  present significant associations with the hematologic variable red blood cell distribution width (RDW) [10-12], which has been associated with cardiovascular disorders [13,14]. Several studies show that the RDW can be used as a predictor of mortality in these [14,15] and many other diseases.

Erythrocyte membrane stability has complex, simultaneous and non-simultaneous associations with a wide range of blood biochemical variables and the set of the erythrogram variables. Understanding the nature of these reactions is a complicated task that requires the use of various statistical tools, such as multiple linear regression, canonical correlation and path analysis in populations subject to greater variation in the set of those variables [10-12,16], as is the case of patients undergoing bariatric surgery [12,17].

The aim of this study was to better understand how the erythrocyte membrane stability is affected by the type of bariatric surgery known as Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) using principal component analysis (PCA) and support vector machine (VSM), tools that have been

successfully applied in health sciences, particularly in studies on AIDS [18-20], cancer [21-23] and obesity [24-27].

## **Material and Methods**

### **Population and procedures**

The study population consisted of 8 women classified as having class II obesity (BMI between 35.00 and 39.99 kg/m<sup>2</sup>) and comorbidities and 16 women with class III obesity (BMI  $\geq$  40.00/m<sup>2</sup>) [28], with average age of  $36.46 \pm 9.8$  years, recruited among the candidates for bariatric surgery from the Obesity Center of Uberlândia (CENTROBESO, Uberlândia, MG, Brazil). Patients who participated in the study were not insulin-dependent diabetics and also did not fit the general exclusion criteria adopted by the institution, which included: anesthetic risk classified by the American Society of Anesthesiologists (ASA) as ASA IV; esophagogastric varices with portal hypertension; significant intellectual limitations in patients without adequate family support; uncontrolled current psychiatric disorder, including alcohol and illicit drugs abuse.

This study was approved by the Ethics Committee in Research of the Federal University of Uberlândia (number 023/08) and all 24 volunteers who participated in the survey signed consent forms.

The study population was analyzed before and 14, 28, 42 and 56 days after surgery. Additional details about blood sample collection, determination of hematologic, biochemical and erythrocyte stability variables are described in detail in previous publications [12,17].

### **Principal Component Analysis (PCA)**

The PCA is a method used when there are a very large number of variables. It facilitates the visualization of data and identification of association patterns. PCA is a type of multivariate statistics which enables condensation of the original variables information into new variables called principal components (PCs). These new variables explain the maximum variability of the data and are generated by specific linear combinations of the original variables. This requires that each PC be orthogonal to the others and that all PCs do not show covariance between them.

PCs relate to the original variables without the variability of one PC to be associated with variability of the other PC, because there is no correlation between PCs, which eliminates

the multicollinearity. This allows describing the original data, evaluating relations between the different variables by the covariance matrix of the loads (F) and identifying relationships between different observations by the grouping of data in the main components [29].

If X is the matrix of original variables and Z is the matrix of the main components, then  $Z = XuD^{-1/2}$  and  $F = uD^{1/2}$ , where u and D are respectively the autovectors and the matrix of the autovalues ( $\lambda$ ) that are generated by solving the equation  $Ru = \lambda u$ , where R is the matrix of correlations of X [29-31].

PCA was applied as an unsupervised classification method, using Stats, Psych, Hmisc and FactoMiner routines in R language, with prcomp function, for analysis of the experimental points of the variables: 1) inverse of the NaCl concentration causing 50% hemolysis (invH50) and 2) variation in the NaCl concentration required to promote 100% hemolysis (dX), which are erythrocyte stability variables; 3) time; 4) body weight; 5) body mass index (BMI); 6) red blood cells (RBC); 7) red cell distribution width (RDW); 8) hemoglobin (Hb); 9) hematocrit (Ht); 10) mean corpuscular volume (MCV); 11) mean corpuscular hemoglobin (MCH); 12) mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC); 13) triglycerides (TGC); 14) total- (t-C), 15) high density lipoprotein (HDL-C), 16) low density lipoprotein (LDL-C) and 17) very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C); and 18) glucose (Glu).

### **Support Vector Machine (SVM)**

In essence, SVM is a tool to maximize a particular mathematical function of a set of data and must learn to tell the difference between two groups [32]. This is done based on the theory of statistical learning and the principle of minimization of structural risk [33].

SVM is a learning technique that uses the statistical theory of the error, also known as theory of Vapnik-Chervonenkis, in the solution of classification problems, prediction of values and analysis of failures. It is an algorithm that learns by example to assign labels to objects. In the method of the SVM, the data group or input vectors, also called support vectors, are selected and used to obtain hyperplanes (or borders) capable of separating the remaining data. This is done in such a way that for each group of separated data, the use of adjusted linear or non-linear functions is able to map and to correctly predict the class and values of new data from the same learning domain with the lowest possible error [20,34,35].

In the SVM, the original data are mapped in a space of large dimension H, which is defined from a kernel function k that can be linear, polynomial, a Gaussian radial basis function (RBF) or sigmoid. The choice must be made in order to favor the acquisition of minor errors.

In this case  $k(x, x') = [\Phi(x), \Phi(x')]$ , with  $x'$  being the representation of data in the high-dimension space. The mapping can be described as  $\Phi: X \rightarrow H$ , where  $\Phi$  represents the mapping,  $H$  is the high-dimension space and  $X$  is the original space. The case of the RFB, used in this study to be more robust than the others,  $k(x, x') = \exp(\gamma|x-x'|^2)$ , where  $\gamma$  represents the parameter of deviation from the core  $k(x, x')$  and that must be adjusted together with the parameter of regularization  $C$ , which represents a weighting between the training error and the error of generalization.

In obtaining the values of the parameter  $\gamma$ , the parameter of regularization  $C$  and the weights associated with the method, one can use the grid search method with  $k$ -fold validation. This method consists of exploring the adjustments of the values of the parameter  $\gamma$  and the parameter of regularization  $C$  throughout the sample space, which consists in different combinations of values of the selected parameters. The best result is obtained by the  $k$ -fold validation technique. In this technique, for each grid point, the experimental points used in the adjustment are further subdivided in mutually exclusive  $k$  subsets and, successively, each of the  $k$  subsets is used to evaluate the fit quality and obtaining the best model at the end of  $k$  data subdivision steps and successive improvement of adjustments [34]. In this study, the SVM models were obtained using 10-fold cross-validation with simple grid search to find the best fit model [36].

The SVM was used in R language with `e1071` and `MASS` routines [34] and RBF kernel function to evaluate the membrane stability variables ( $invH_{50}$  and  $dX$ ) of human erythrocytes. The 120 experimental points of the membrane stability variables and the variables time, body weight, BMI, RBC, RDW, Hb, Ht, MCH, MCV, MCHC, TGC, t-C, HDL-C, VLDL-C, LDL-C and Glu, have been used to obtain the descriptive models of membrane stability, to evaluate models and to generalize the behavior descriptions of the variables  $invH_{50}$  and  $dX$ .

## Results and Discussion

In the PCA, 96.3% of the variability in the data ( $y$  axis) is explained by the ten first PCs ( $x$ -axis), as shown in Figure 2.1. As more than 95% of variability in the data of the 18 original variables is explained by the first ten components, this means that the original set of variables contains some variables that are conceptually associated with each other. This can be observed in the correlations circle of the first two PCs shown in Figure 2.2, where each axis shows the variation in the values of  $r$  (between -1 and +1) for each original variable. The existence of

such associations can be seen by the overlapping or close proximity between variables, such as occurs between the hematologic variables MCV and MCH, between the pairs of biochemical variables TGC and VLDL-C (overlapping) and t-C and LDL-C (proximity), and between the anthropometric variables weight and BMI (proximity). These associations are caused by the existence of conceptual relations between those pairs of variables, since  $MCH = Hb/RBC$  and  $MCV = Ht/RBC$  [37];  $t-C = HDL-C + LDL-C + VLDL-C$ ;  $VLDL-C = TGC/5$  [38]; and  $BMI = weight/height^2$  [39].

The correlation coefficients ( $r$ ) of each of the original variables with the first ten principal components are shown in Table 2.1. Larger  $r$  values mean stronger and more relevant correlations with the respective main component, but not with the other, because one component does not influence the other, since they are orthogonal to each other. Smaller values of  $r$  mean weaker and less significant correlations with the main component, even when they are statistically significant ( $p < 0.05$ , two-way ANOVA). This study considered relevant the correlations associated with a value of  $r > 0.5$  or  $< -0.5$ .

In the first principal component (PC1), which explains 25.7% of the data variability, the most significant positive correlations were obtained with the variables MCH, MCV and MCHC, while the most significant negative correlations were obtained with the variables BMI, body weight and RBC. As the first principal component is one that has the highest percentage of explained variability (Figure 2.1), it certainly presents the most significant changes related to the set of variables. Indeed, what is most significant in the data for this study is the dramatic decrease in weight and, consequently, in the BMI, which is the goal of the surgical intervention. However, associated with this desirable change there is a significant tendency of decrease in the RBC count, certainly due to the mechanism that links this trend to the increase observed in the MCV variable. Indeed, individuals who underwent bariatric surgery tend to have deficiencies of the vitamin cobalamin, which is a known cause of elevation in MCV and generation of the called macrocytic anemia [40]. Deficiency of this vitamin causes a decrease in the rate of division of the precursors of mature red blood cells, releasing into the bloodstream cells (reticulocytes) with greater volume and with greater concentration of hemoglobin, which is certainly the origin of the trend of increase in the values of MCV and MCHC associated with decreased body weight.

In the second principal component (PC2), which explains 17.5% of the data variability, significant positive correlations were obtained with Hb and Ht, while significant negative correlations were obtained with t-C and LDL-C. As one PC does not interfere with other, these correlations have meanings that are independent of the associations with body weight changes

revealed by the analysis of the first PC. Analysis of this second PC reveals that in the studied population the lower levels of tC and LDL-C were associated with higher values of Hb and Ht. This makes sense, since LDL is involved in the transfer of cholesterol to the erythrocyte membrane. High levels of LDL-C are associated with transference of such a so large amount of cholesterol to the membrane of this cell that it will suffer the morphological changes that characterize the so-called spur-cell anemia [41-43].

In the case of the third principal component (PC3), which explains 14.1% of the data variability, the variables that stood out were TGC, VLDL-C and RDW, with negative correlations, and HDL-C, with a positive correlation. These correlations shall mean that in the studied population lower levels of TGC and VLDL-C and increased HDL-C levels are associated with lower values of RDW. Since high values of RDW were associated with higher cholesterol contents in the erythrocyte membrane [44] and HDL is a lipoprotein that removes excess of cholesterol from the membrane of that cell, it makes sense that an increase in HDL-C is associated with a decrease in RDW.

The fourth principal component (PC4), which explains 10% of the data variability, showed a significant positive correlation with MCHC and negative correlations with Ht and RBC, which has an obvious meaning, because higher MCHC and lower RBC counts are recognizably associated with lower values of Ht.

The PCs of numbers 5 to 9 do not present significant correlations with more than a single variable and the PC10 did not show even a single significant correlation (Table 2.1).

The existence of weak correlations, but statistically significant (Table 2.1) may be a result of less importance, greater heterogeneity of the data, or even inability of the model to detect relationships that escape most expressively from linearity.

Indeed, analysis using SVM reveal the existence of non-linearity between some variables evaluated in this study. Figure 2.3 shows three-dimensional graphics of some combinations of invH50, dX, LDL-C, HDL-C and RDW, considering all other variables with fixed values described by their respective averages. The x-axis for all graphs is variable RDW, the y axis represents erythrocyte stability variables (invH50 or dX) and the z axis is the lipid variable (LDL-C or HDL-C).

This figure illustrates that the membrane stability variables invH50 (Figs 2.3A and 2.3B) and dX (Figs 2.3C and 2.3D) exhibit non-linear relations with RDW, influenced in an antagonistic manner by the cholesterol concentrations of LDL (Figs 2.3A and 2.3C) and HDL (Figs 2.3B and 2.3D). This analysis based on the use of SVM shows that the correlations between those stability variables and RDW are not linear, but predominantly inverse. This is

perfectly consistent with the non-relevant but significant inverse correlations observed between those stability variables and RDW in the third principal component analysis (Table 2.1). This inverse correlation between erythrocytes stability and RDW is also consistent with other studies reported in the literature [10,11]. Furthermore, this certainly makes sense in light of the fact that LDL is capable of transferring cholesterol to the erythrocyte membrane [6,7] and that high RDW values are associated with high contents of membrane cholesterol in these cells [44], probably due to impaired deformability of red blood cells [45]. On the other hand, the antagonistic influences of LDL-C and HDL-C on the correlations of invH50 and dX with RDW also make a lot of sense, because these lipoproteins have antagonistic actions on the erythrocyte membrane, with LDL providing and HDL removing cholesterol.

The content of cholesterol in erythrocyte membrane is essential for the maintenance of fluidity and various rheological properties, such as aggregability, deformability and adhesiveness [46,47]. An increase in membrane cholesterol content occurs in hypercholesterolemic conditions [43,48], in which part of the cholesterol excess of LDL is directed to the erythrocyte membrane [49], reducing its fluidity [50-52], increasing blood viscosity and hindering the delivery of oxygen to tissues [53,54]. That is why the influence of plasma lipids in the blood rheology has been the subject of many studies [49,55-60].

In conclusion, the principal component analysis revealed that 1) the weight loss of the study volunteers was associated with a decrease in red blood cell counts and increase in the hematologic indices MCV, MCH and MCHC; 2) lower levels of t-C and LDL-C were associated with higher values of Hb and Ht; 3) lower levels of TGC and VLDL-C and increased HDL-C levels were associated with lower values of RDW. Analyses based on support vector machine showed that the erythrocyte membrane stability variables (invH50 and dX) present nonlinear relations with RDW, under the antagonistic influence of the LDL-C levels in relation to HDL-C concentrations. This finding suggests these stability variables may also have the ability to predict the health status worsening that was originally attributed to higher values of RDW.

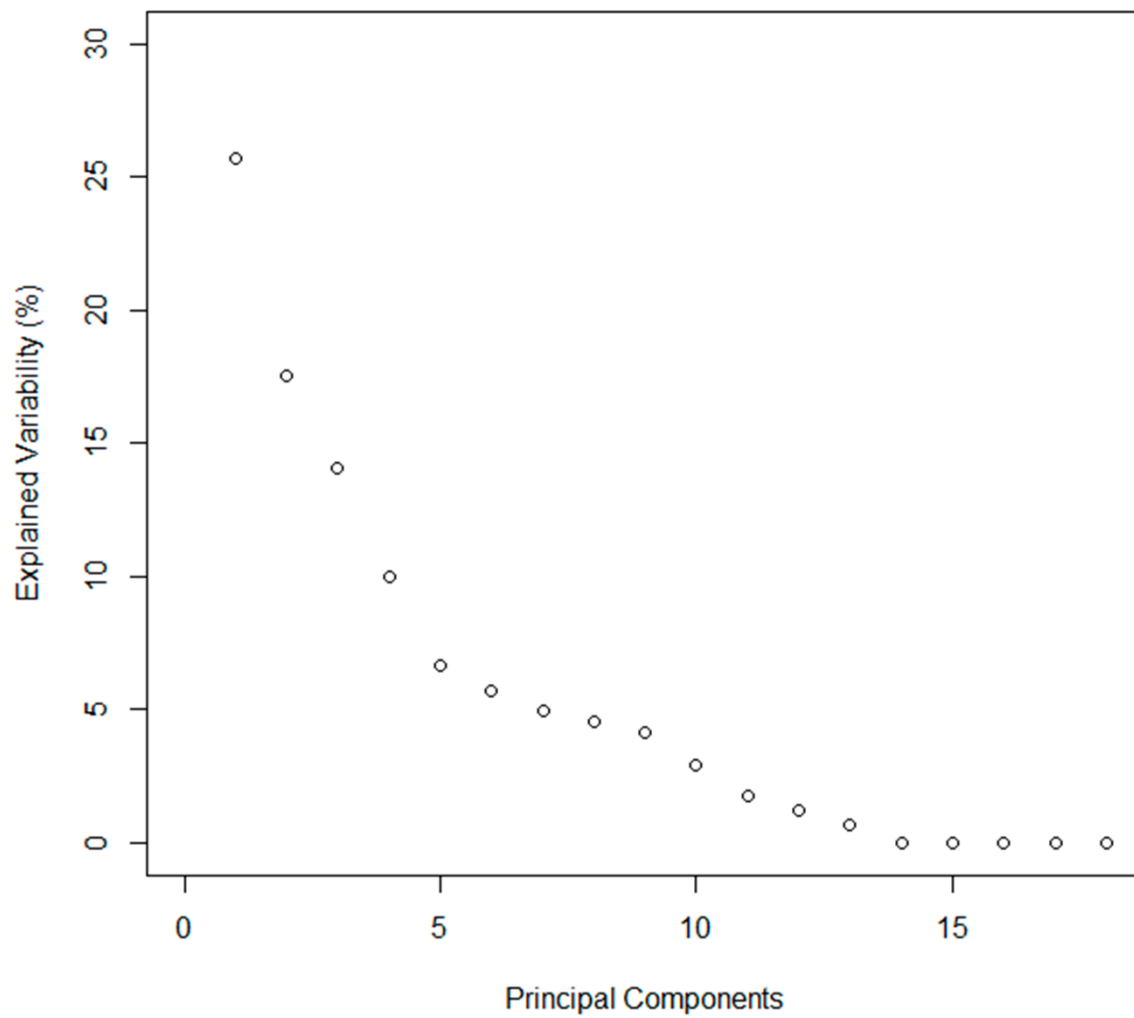
### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

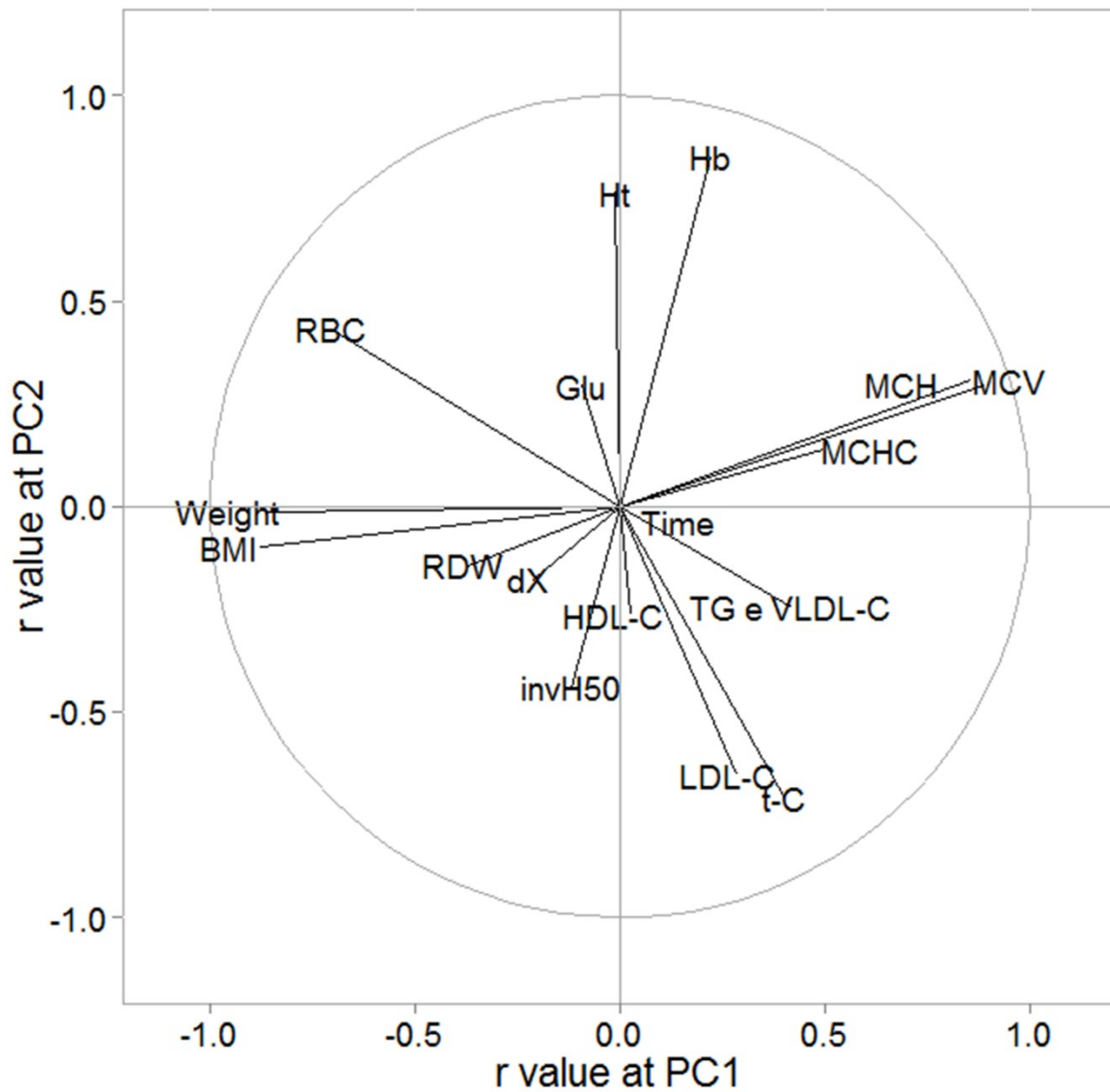
### **Aknowledgments**

We would like to thank CAPES (PE-PNPD AUX 2718/2011) and CNPq (307705/2012-9) for the financial supports that have enable the development of this study.

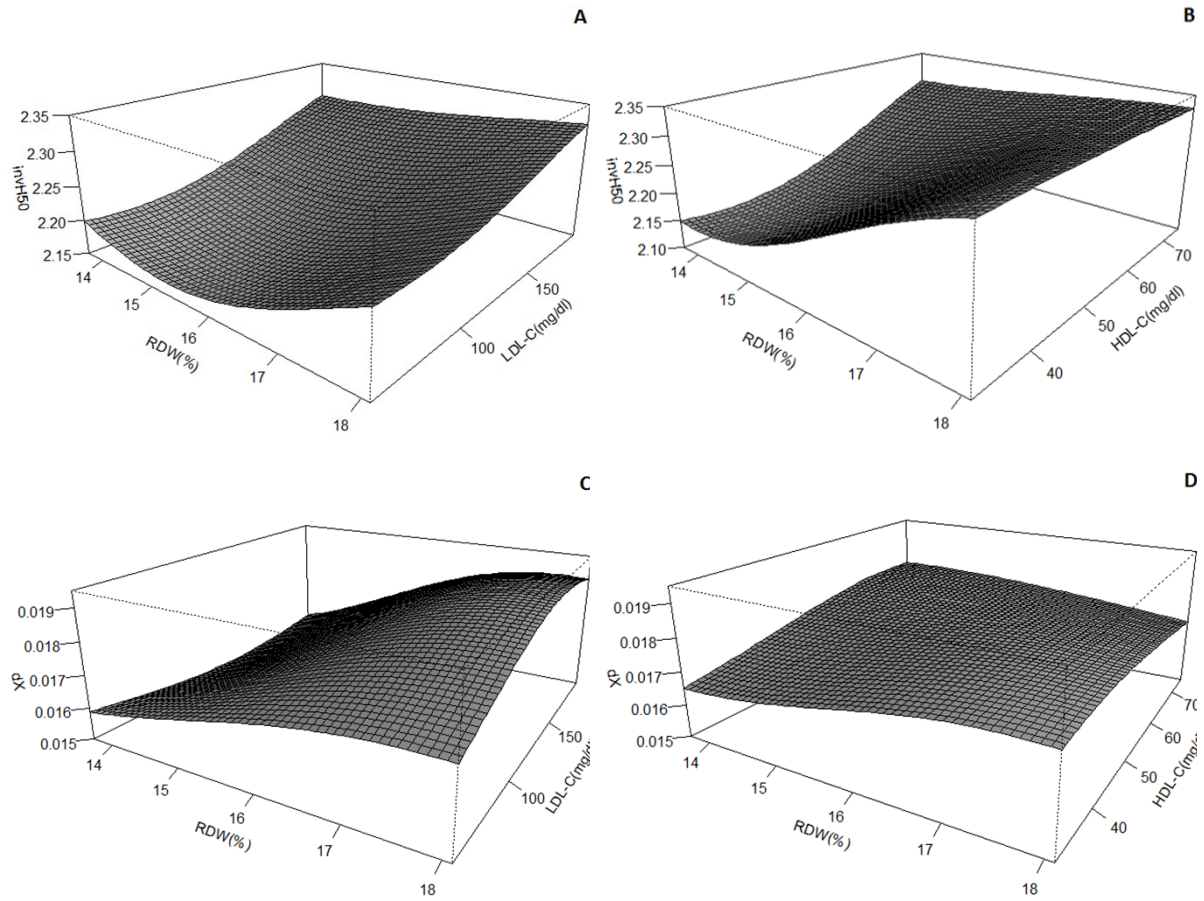




**Figure 2.1.** Percentage variation explained by each of the eighteen principal components.



**Figure 2.2.** Correlations circle of the first two principal components (PC). BMI, body mass index; invH<sub>50</sub>, inverse of the NaCl concentration that causes 50% hemolysis; dX, variation in NaCl concentration necessary to promote 100% hemolysis; RBC, red blood cell; RDW, red cell distribution width; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; TGC, triglyceride; t-C, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C, very-low-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; Glu, glucose.



**Figure 2.3.** Influence of the levels of LDL- and HDL-cholesterol on the relations between the variables of erythrocyte membrane stability (invH50 and dX) and the hematologic variable red cell distribution width (RDW), according to analyses done with use of Support Vector Machine (SVM). ( $r^2 > 0.72$ ).

**Table 2.1.** Values of r for the correlations of the first ten principal components with the original data.

Variables	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
AEV (%)	25.7	43.2	57.3	67.3	74.0	79.7	84.7	89.2	93.4	96.3
Time	0.00	-0.04	0.10	0.01	-0.43	-0.77*	0.15	0.40*	0.15	-0.05
Weight	-0.86*	-0.01	-0.17	0.19*	0.02	0.00	0.22*	-0.06	-0.02	-0.03
BMI	-0.88*	-0.10	-0.15	-0.05	-0.14	0.07	0.14	-0.05	-0.12	0.11
invH <sub>50</sub>	-0.12	-0.44*	0.36*	-0.02	-0.42*	-0.20*	-0.08	-0.56*	0.11	0.24*
dX	-0.21	-0.18	0.34*	0.12	-0.55*	0.17	-0.18	0.13	-0.62*	-0.16
RBC	-0.70*	0.43*	0.07	-0.49*	-0.04	0.01	0.05	-0.07	0.09	-0.22*
RDW	-0.37*	-0.14	-0.64*	-0.14	-0.30*	0.01	-0.37*	-0.19*	0.16	0.07
Hb	0.22*	0.85*	0.10	-0.32*	-0.24*	0.06	0.07	-0.16	0.05	-0.15
Ht	-0.01	0.76*	0.22*	-0.58*	-0.15	0.06	0.04	-0.02	0.00	0.05
MCH	0.89*	0.30*	0.02	0.21	-0.17	0.04	0.02	-0.09	-0.03	0.06
MCV	0.86*	0.31*	0.15	-0.03	-0.11	0.05	-0.01	0.04	-0.10	0.30*
MCHC	0.50*	0.14	-0.27*	0.57*	-0.18	-0.02	0.07	-0.31*	0.11	-0.43*
TGC	0.42*	-0.25*	-0.71*	-0.41*	0.03	-0.14	0.11	-0.07	-0.23*	-0.03
tC	0.40*	-0.71*	0.24*	-0.47*	0.00	0.08	-0.02	0.01	0.08	-0.17
HDL-C	0.03	-0.26*	0.62*	-0.12	0.29*	-0.22*	0.42*	-0.33*	-0.21*	-0.05
VLDL-C	0.42*	-0.25*	-0.71*	-0.41*	0.03	-0.14	0.11	-0.07	-0.23*	-0.03
LDL-C	0.29*	-0.65*	0.40*	-0.34*	-0.09	0.21*	-0.18	0.13	0.24*	-0.17
Glu	-0.09	0.29*	0.22*	-0.04	0.42*	-0.45*	-0.62*	-0.13	-0.19*	-0.10

PC (1-10), Principal Component; AEV, accumulated explained variability; BMI, body mass index; invH<sub>50</sub>, inverse of the NaCl concentration that causes 50% hemolysis; dX, variation in NaCl concentration necessary to promote 100% hemolysis; RBC, red blood cell; RDW, red cell distribution width; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; TGC, triglyceride; t-C, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C, very-low-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; Glu, glucose.

\*p < 0.05 (two-way ANOVA) indicates statistically significant correlations.

## References

1. Misra A, Khurana L (2008) Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab* 93: S9-30. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1595>.
2. Kogai MA, Lutov UV, Selyatitskaya VG (2008) Hormonal and biochemical parameters of metabolic syndrome in male patients with body weight excess and obesity. *Bull Exp Biol Med* 146: 806-808. doi: <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0415-4>.
3. Roduit C, van der Goot FG, De Los Rios P, Yersin A, Steiner P, et al. (2008) Elastic membrane heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains. *Biophys J* 94: 1521-1532. doi: <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112862>.
4. Qian S, Rai D, Heller WT (2014) Alamethicin disrupts the cholesterol distribution in dimyristoyl phosphatidylcholine-cholesterol lipid bilayers. *J Phys Chem B* 118: 11200-11208. doi: <https://doi.org/10.1021/jp504886u>.
5. Cooper RA (1977) Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med* 297: 371-377. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM197708182970707>.
6. Ejima J, Ijichi T, Ohnishi Y, Maruyama T, Kaji Y, et al. (2000) Relationship of high-density lipoprotein cholesterol and red blood cell filterability: cross-sectional study of healthy subjects. *Clin Hemorheol Microcirc* 22: 1-7.
7. Meurs I, Hoekstra M, van Wanrooij EJ, Hildebrand RB, Kuiper J, et al. (2005) HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Exp Hematol* 33: 1309-1319. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.07.004>.
8. Penha-Silva N, Arvelos LR, Cunha CC, Aversi-Ferreira TA, Gouvea-e-Silva LF, et al. (2008) Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry* 73: 23-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.04.002>.
9. Penha-Silva N, Firmino CB, de Freitas Reis FG, da Costa Huss JC, de Souza TM, et al. (2007) Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev* 128: 444-449. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.06.007>,
10. Neto MB, de Avelar EB, Arantes TS, Jordao IA, Huss JCD, et al. (2013) Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology* 50: 305-320. doi: <https://doi.org/10.3233/BIR-130641>.
11. de Freitas MV, Marquez-Bernardes LF, de Arvelos LR, Paraiso LF, Oliveira AFMGE, et al. (2014) Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology* 19: 424-430. doi: <https://doi.org/10.1179/1607845413Y.0000000145>.
12. de Arvelos LR, Rocha VC, Felix GP, da Cunha CC, Bernardino Neto M, et al. (2013) Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. *J Membr Biol* 246: 231-242. doi: <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9524-0>.
13. Montagnana M, Cervellin G, Meschi T, Lippi G (2012) The role of red blood cell distribution width in cardiovascular and thrombotic disorders. *Clin Chem Lab Med* 50: 635-641. doi: <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.831>.
14. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Danese E, Montagnana M (2013) Association of red blood cell distribution width with plasma lipids in a general population of unselected outpatients. *Kardiol Pol* 71: 931-936. doi: <https://doi.org/10.5603/KP.2013.0228>.

15. Hunziker S, Stevens J, Howell MD (2012) Red cell distribution width and mortality in newly hospitalized patients. *Am J Med* 125: 283-291. doi: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.08.021>.
16. Netto RDM, Fabbri C, de Freitas MV, Neto MB, Garrote MS, et al. (2014) Influence of *Plasmodium vivax* malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitology Research* 113: 863-874. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3717-4>.
17. Custodio Afonso Rocha V, Ramos de Arvelos L, Pereira Felix G, Nogueira Prado de Souza D, Bernardino Neto M, et al. (2012) Evolution of nutritional, hematologic and biochemical changes in obese women during 8 weeks after Roux-en-Y gastric bypass. *Nutr Hosp* 27: 1134-1140. Available from: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/5812.pdf>.
18. Bhakat S, Martin AJ, Soliman ME (2014) An integrated molecular dynamics, principal component analysis and residue interaction network approach reveals the impact of M184V mutation on HIV reverse transcriptase resistance to lamivudine. *Mol Biosyst* 10: 2215-2228. doi: <https://doi.org/10.1039/C4MB00253A>.
19. Gerns Storey HL, Richardson BA, Singa B, Naulikha J, Prindle VC, et al. (2014) Use of principal components analysis and protein microarray to explore the association of HIV-1-specific IgG responses with disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30: 37-44. doi: <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0088>.
20. Wei Y, Li J, Chen Z, Wang F, Huang W, et al. (2015) Multistage virtual screening and identification of novel HIV-1 protease inhibitors by integrating SVM, shape, pharmacophore and docking methods. *Eur J Med Chem* 101: 409-418. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.054>.
21. Gostek J, Awsiuk K, Pabijan J, Rysz J, Budkowski A, et al. (2015) Differentiation between single bladder cancer cells using principal component analysis of time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Chem* 87: 3195-3201. doi: <https://doi.org/10.1021/ac504684n>.
22. Guyon I, Weston J, Barnhill S, Vapnik V (2002) Gene selection for cancer classification using support vector machines. *Machine Learning* 46: 389-422. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1012487302797>.
23. Park JS, Choi SB, Chung JW, Kim SW, Kim DW (2014) Classification of Serous Ovarian Tumors Based on Microarray Data Using Multicategory Support Vector Machines. 2014 36th Annual International Conference of the Ieee Engineering in Medicine and Biology Society (Embc): 3430-3433. doi: 10.1109/EMBC.2014.6944360.
24. He LN, Liu YJ, Xiao P, Zhang L, Guo Y, et al. (2008) Genomewide linkage scan for combined obesity phenotypes using principal component analysis. *Ann Hum Genet* 72: 319-326. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.2007.00423.x>.
25. Caballero J, Fernandez L, Garriga M, Abreu JI, Collina S, et al. (2007) Proteomic study of ghrelin receptor function variations upon mutations using amino acid sequence autocorrelation vectors and genetic algorithm-based least square support vector machines. *J Mol Graph Model* 26: 166-178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.11.002>.
26. Panazzolo DG, Sicuro FL, Clapauch R, Maranhao PA, Bouskela E, et al. (2012) Obesity, metabolic syndrome, impaired fasting glucose, and microvascular dysfunction: a principal component analysis approach. *BMC Cardiovasc Disord* 12: 102. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2261-12-102>.
27. Lopez-Meyer P, Schuckers S, Makeyev O, Sazonov E (2010) Detection of Periods of Food Intake using Support Vector Machines. 2010 Annual International Conference of the

- Ieee Engineering in Medicine and Biology Society (Embc): 1004-1007. doi: <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2010.5627796>.
28. WHO (2005) BMI Classification.
  29. Lattin J, Carroll JD, Green PE (2011) Análise de componentes principais. Análise de dados multivariados. São Paulo: Cengage Learning. pp. 67-101.
  30. Saavedra J, Córdova A, Gálvez L, Quezada C, Navarro R (2013) Principal Component Analysis as an exploration tool for kinetic modeling of food quality: A case study of a dried apple cluster snack. *Journal of Food Engineering* 119: 229-235. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.036>.
  31. De la Hoz E, De La Hoz E, Ortiz A, Ortega J, Prieto B (2015) PCA filtering and probabilistic SOM for network intrusion detection. *Neurocomputing* 164: 71-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2014.09.083>.
  32. Noble WS (2006) What is a support vector machine? *Nature Biotechnology* 24: 1565-1567. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt1206-1565>.
  33. Zhang XL, Chen W, Wang BJ, Chen XF (2015) Intelligent fault diagnosis of rotating machinery using support vector machine with ant colony algorithm for synchronous feature selection and parameter optimization. *Neurocomputing* 167: 260-279. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2015.04.069>.
  34. Karatzoglou A, Meyer D, Hornik K (2006) Support Vector Machines in R. *Journal of Statistical Software* 15. doi: <https://doi.org/10.18637/jss.v015.i09>.
  35. Lin TH, Tsai TL (2014) Constructing a linear QSAR for some metabolizable drugs by human or pig flavin-containing monooxygenases using some molecular features selected by a genetic algorithm trained SVM. *J Theor Biol* 356: 85-97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.04.021>.
  36. Delen D, Walker G, Kadam A (2005) Predicting breast cancer survivability: a comparison of three data mining methods. *Artificial Intelligence in Medicine* 34: 113-127. doi: <https://doi.org/10.1016/j.artmed.2004.07.002>.
  37. George-Gay B, Parker K (2003) Understanding the complete blood count with differential. *J Perianesth Nurs* 18: 96-114; quiz 115-117. doi: <https://doi.org/10.1053/jpan.2003.50013>.
  38. Frieddewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoproteins cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 18: 499-502. doi: <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>.
  39. Garrow JS, Webster J (1985) Quetelet's index (W/H<sup>2</sup>): as a measure of fatness. *Int J Obesity* 9: 147-153.
  40. Alves de Rezende CH, Coelho LM, Oliveira LM, Penha Silva N (2009) Dependence of the geriatric depression scores on age, nutritional status, and haematologic variables in elderly institutionalized patients. *J Nutr Health Aging* 13: 617-621. doi: <https://doi.org/10.1007/s12603-009-0172-0>.
  41. Cooper RA (1969) Anemia with spur cells: a red cell defect acquired in serum and modified in the circulation. *J Clin Invest* 48: 1820-1831. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI106148>.
  42. Cooper RA, Leslie MH, Knight D, Detweiler DK (1980) Red cell cholesterol enrichment and spur cell anemia in dogs fed a cholesterol-enriched atherogenic diet. *J Lipid Res* 21: 1082-1089. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34769-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34769-6).
  43. Cooper RA, Arner EC, Wiley JS, Shattil SJ (1975) Modification of Red-Cell Membrane Structure by Cholesterol-Rich Lipid Dispersions - Model for Primary Spur Cell Defect. *Journal of Clinical Investigation* 55: 115-126. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI107901>.
  44. Tziakas D, Chalikias G, Grapsa A, Gioka T, Tentis I, et al. (2012) Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated

- with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc* 51: 243-254. doi: <https://doi.org/10.3233/CH-2012-1530>.
45. Vaya A, Rivera L, de la Espriella R, Sanchez F, Suescun M, et al. (2015) Red blood cell distribution width and erythrocyte deformability in patients with acute myocardial infarction. *Clin Hemorheol Microcirc* 59: 107-114. doi: <https://doi.org/10.3233/CH-131751>.
  46. Arbustini E (2007) Total erythrocyte membrane cholesterol: an innocent new marker or an active player in acute coronary syndromes? *J Am Coll Cardiol* 49: 2090-2092. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.03.014>.
  47. Kolodgie FD, Burke AP, Nakazawa G, Cheng Q, Xu X, et al. (2007) Free cholesterol in atherosclerotic plaques: where does it come from? *Curr Opin Lipidol* 18: 500-507. doi: <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282efa35b>.
  48. Schick BP, Schick PK (1985) Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochim Biophys Acta* 833: 281-290. doi: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90200-0](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90200-0).
  49. Martinez M, Vaya A, Marti R, Gil L, Lluch I, et al. (1996) Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. *Thromb Res* 83: 375-388. doi: [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(96\)00147-8](https://doi.org/10.1016/0049-3848(96)00147-8).
  50. Cooper RA (1977) Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital* 297: 371-377. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM197708182970707>.
  51. Dwight JF, Mendes Ribeiro AC, Hendry BM (1996) Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. *Clin Chim Acta* 256: 53-63. doi: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(96\)06412-1](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(96)06412-1).
  52. Muller S, Ziegler O, Donner M, Drouin P, Stoltz JF (1990) Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 83: 231-237. doi: [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(90\)90168-I](https://doi.org/10.1016/0021-9150(90)90168-I).
  53. Chabanel A, Flamm M, Sung KL, Lee MM, Schachter D, et al. (1983) Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys J* 44: 171-176. doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84288-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84288-X).
  54. Koter M, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J, Klikczynska K, Franiak I (2002) The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Eur J Clin Pharmacol* 58: 501-506. doi: <https://doi.org/10.1007/s00228-002-0507-9>.
  55. Hernandez G, Bollini A, Mengarelli G, Rasia M, Casco C, et al. (2015) Protective effect of quercetin against in vitro erythrocyte rheology alterations produced by arsenic. *Clin Hemorheol Microcirc* 59: 355-364. doi: <https://doi.org/10.3233/CH-141849>.
  56. Irace C, Carallo C, Scavelli F, Esposito T, De Franceschi MS, et al. (2014) Influence of blood lipids on plasma and blood viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc* 57: 267-274. doi: <https://doi.org/10.3233/CH-131705>.
  57. Vaya A, Martinez Triguero M, Ricart A, Plume G, Solves P, et al. (2009) Erythrocyte aggregability and AB0 blood groups. *Clin Hemorheol Microcirc* 41: 67-72. doi: <https://doi.org/10.3233/CH-2009-1163>.
  58. Aloulou I, Varlet-Marie E, Mercier J, Brun JF (2006) Hemorheological disturbances correlate with the lipid profile but not with the NCEP-ATPIII score of the metabolic syndrome. *Clin Hemorheol Microcirc* 35: 207-212.
  59. Velcheva I, Antonova N, Dimitrova V, Dimitrov N, Ivanov I (2006) Plasma lipids and blood viscosity in patients with cerebrovascular disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 35: 155-157.



60. Seki K, Sumino H, Nara M, Ishiyama N, Nishino M, et al. (2006) Relationships between blood rheology and age, body mass index, blood cell count, fibrinogen, and lipids in healthy subjects. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 34: 401-410.

## Capítulo 3

# **Influence of hematologic, biochemical and nutritional variables on the kinetics of osmotic lysis of erythrocytes in women breast cancer survivors**

Wener Barbosa-Resende<sup>1</sup>; Marco Aurélio Ferreira de Jesus Leite<sup>1</sup>; Lucas Moreira Cunha<sup>1</sup>; Rodney Coelho da Paixão<sup>1</sup>; Marcelo Costa Junior<sup>1</sup>; Mario da Silva Garrote Filho<sup>1</sup>; Guilherme Morais Puga<sup>2</sup>; Nilson Penha-Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Educação Física e Fisioterapia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

## Resumo

### **Influência de variáveis hematológicas, bioquímicas e nutricionais sobre a cinética da lise osmótica de eritrócitos em mulheres sobreviventes de câncer de mama**

**[Fundamentação]** O câncer é um problema cada vez mais grave de saúde pública em todo mundo. Entre as mulheres o tipo mais frequente dessa doença é o câncer de mama. O sucesso crescente de suas abordagens terapêuticas, que pode, entretanto, causar alterações sanguíneas, exige também um acompanhamento continuado das sobreviventes de câncer de mama.

**[Objetivo]** Este estudo teve por objetivo verificar as possíveis correlações entre a cinética da lise osmótica de eritrócitos com um amplo conjunto de variáveis hematológicas, bioquímicas, nutricionais e antropométricas em 24 mulheres sobreviventes de câncer de mama. **[Métodos]** Após 12 horas de jejum e restrição de atividade física, amostras de sangue foram coletadas para contagem de células sanguíneas, determinação do lipidograma e da cinética de lise hiposmótica de eritrócitos. A composição corporal foi avaliada por análise de bioimpedância elétrica. A ingestão nutricional foi estimada a partir da análise de recordatório nutricional. A existência de correlação entre cada par de variáveis investigadas foi pesquisada com a utilização dos testes de Pearson ou de Spearman, quando ambas as variáveis apresentavam distribuição normal e quando uma ou ambas as variáveis não apresentavam distribuição normal, respectivamente.

**[Resultados]** A população estudada apresentou média de idade de  $49.8 \pm 9.4$  anos, média de massa corporal de  $64.3 \pm 11.1$  kg e percentual médio de gordura de  $38.4 \pm 7.2\%$ . Níveis sanguíneos não desejáveis de triglicérides, LDL-colesterol, colesterol total e glicose foram encontrados em 45.8%, 50.0%, 83.3% e 50.0% das voluntárias, respectivamente. A contagem de reticulócitos apresentou correlação significativa positiva ( $r=0.5$ ) com a ingestão estimada de folato. O tempo de meia lise osmótica de eritrócitos ( $t_{1/2}$ ) apresentou correlação significativa negativa com a contagem de reticulócitos ( $r=-0.5$ ) e com a ingestão estimada de ácido fólico ( $r=-0.6$ ). **[Conclusão]** Nos sobreviventes de câncer de mama, a frequência de dislipidemia é bastante alta, mas, como a contagem de eritrócitos mostrou uma correlação positiva significativa com LDL-C e uma correlação negativa significativa com os níveis de HDL-C, isso sugere que a dislipidemia observada esteja atendendo a um aumento na demanda hematológica de colesterol, a fim de garantir a estabilização da membrana dos eritrócitos, preservando assim a contagem dessas células sanguíneas.

**Palavras-chave:** Neoplasias da Mama; Eritrócitos; Membrana; Fragilidade Osmótica.

## Abstract

### **Influence of hematologic, biochemical and nutritional variables on the kinetics of osmotic lysis of erythrocytes in women breast cancer survivors**

**[Background]** Cancer is an increasingly serious public health problem worldwide. Among women, the most frequent type of this disease is breast cancer. Despite the increasing success of its therapeutic approaches, there is a need for continued follow-up of breast cancer survivors. **[Objective]** This study aimed to verify the possible correlations between the kinetics of osmotic lysis of erythrocytes with a broad set of hematologic, biochemical, nutritional and anthropometric variables in 24 breast cancer survivors (BCS). **[Material and methods]** After 12 hours of fasting and restraint of physical activity, blood samples were collected for blood cell counts, determination of lipidogram and kinetics of hyposmotic lysis of erythrocytes. Body composition was evaluated by electrical bioimpedance analysis. Nutritional intake was estimated from nutritional recall analysis. The existence of correlation between each pair of studied variables was investigated using the Pearson or Spearman tests, when both variables had normal distribution and when one or both variables had no normal distribution, respectively. **[Results]** The studied population presented mean age of  $49.8 \pm 9.4$  years, mean body mass of  $64.3 \pm 11.1$  kg and average fat percentage of  $38.4 \pm 7.2\%$ . Undesirable levels of triglycerides, LDL-cholesterol, total cholesterol and glucose were found in 45.8%, 50.0%, 83.3% and 50.0% of the volunteers, respectively. The reticulocyte count had a significant positive correlation ( $r = 0.5$ ) with the estimated folate intake. The time required to promote half of the osmotic hemolysis ( $t_{1/2}$ ) showed a significant negative correlation with the reticulocyte count ( $r = -0.5$ ) and with the estimated folate intake ( $r = -0.6$ ). **[Conclusion]** In breast cancer survivors, the frequency of dyslipidemia is quite high, but since erythrocyte counts showed a significant positive correlation with LDL-C and a significant negative correlation with the HDL-C levels, this suggests that the observed dyslipidemia is attending to an increase in the hematologic demand of cholesterol, in order to guarantee stabilization of the membrane of erythrocytes, thus preserving the count of these blood cells.

**Key-words:** Breast neoplasms; Erythrocytes; Membrane; Osmotic Fragility.

## Introduction

According to the World Health Organization, factors such as access to information, basic sanitation and the nutritional standard have caused deaths from infectious diseases to decline. In contrast, the current lifestyle adopted by a large part of the population is associated with an increase in the number of deaths from chronic diseases. These diseases are responsible for about 60% of all deaths in the world, thus representing the main cause of mortality [1].

One of the most prominent chronic diseases is cancer, which has been considered a serious public health problem worldwide [2]. In this context, breast cancer has been identified as the most frequent type of this disease among women, regardless of socioeconomic factors, such as residing in developed countries or in developing countries [3, 4]. Estimates related to breast cancer for 2016 showed more than 240,000 new cases of the disease in the United States [5] and about 58,000 new cases in Brazil [4].

Concomitant to this high number of cases, advances in the treatment of the disease have also been achieved, with consequent increase in the number of breast cancer survivors (BCS) [6]. In Brazil, survival increased between the periods 1995 to 1999 and 2005 to 2009, from 78% to 87% [4].

In the clinical history of BCS, interventions with chemotherapy and radiotherapy, which are important approaches in the fight against cancer, are common but are not free of side effects. The general impact caused by the intervention to combat this disease affects the hematologic parameters [7], and considering that the blood cells are immersed in a microenvironment directly influenced by the treatment, this condition can also alter the stability of the erythrocyte membrane.

The relationship between the action of radiotherapy and chemotherapy with the osmotic stability of the erythrocyte membrane is still not well established in the literature. Selim *et al.* (2009)[8] reported an increase in the rate of hemolysis of red blood cells by an increase in the osmotic fragility of the membrane as the radiation dose increases. In contrast, Khoshbani *et al.* (2015)[9] did not observe alterations in the osmotic membrane fragility of erythrocytes, at any stage of treatment, of women with breast cancer undergoing chemotherapy and radiotherapy.

Often, the analysis of the osmotic stability parameters of the red blood cell membrane verifies the influence of agents that modulate its formation and destruction equilibrium, but does not investigate the influences of those blood variables that interfere with the kinetics of cell membrane lysis [10]. In addition, no research was conducted after the main breast cancer

treatments to determine the existence of adverse effects in the recovery and/or the adjuvant treatment period in BCS.

In this sense, it is evident the need to expand the scientific knowledge about the type of treatment and the stability of the erythrocyte membrane in this population. Thus, the present study aimed to verify the possible correlations between the kinetics of the osmotic fragility of the erythrocyte membrane with hematologic, biochemical, nutritional and anthropometric parameters in women who survived breast cancer after the initial treatments with radiotherapy and/or chemotherapy.

## **Material and Methods**

### **Study Population**

This study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Federal University of Uberlândia, under number 57837416.5.0000.5152. All participants signed a free and informed consent form before blood collection and anthropometric assessments.

Inclusion criteria were: previous submission to lymphadenectomy, completion of chemotherapy and/or radiotherapy at least 6 months prior to study initiation, with no history of smoking and chronic alcohol abuse. Twenty-four breast cancer survivors who volunteered in this study met these criteria.

### **Blood Collection**

Blood samples were taken by intravenous puncture on the contralateral side of lymph node removal surgery after 12 hours of fasting and restriction of physical effort. Blood samples were collected in 2 sterile 4-mL tubes (Vacutainer<sup>TM</sup>, Becton-Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brazil), one containing 1.8 mg/mL K<sub>3</sub>EDTA as an anticoagulant, for hematologic and kinetics analyzes, and another without anticoagulant, for the biochemical analyzes.

### **Anthropometric assessments**

The body composition was evaluated by electric bioimpedance analysis (BIA), after 10 hours of fasting, using a four-pole device (InBody230<sup>TM</sup>, Biospace, Seoul, Korea), with estimates of absolute body mass (BM), fat free mass (FFM), lean mass (LM), fat mass (FM) and percentage of body fat (%BF). The height was evaluated using a 2 meter long stadiometer (Personal Caprice, Sanny<sup>TM</sup>, São Bernardo do Campo, SP, Brazil) with 0.1 cm precision. BM

and height measurements were used to calculate body mass index (BMI), using the formula: BMI = mass (kg) ÷ height (m) x height (m) [11].

### **Kinetics of osmotic lysis of erythrocytes**

The preparation of the saline solution was performed using NaCl (Labsynth™, Diadema, SP, Brazil) with a purity of 99.5%, which was duly corrected. Volume measurements were made on refractory glass burettes and / or with the aid of automatic pipettes (Labsystems™, Finnpiquette Digital model, Helsinki, Finland). For the mass measurements a precision digital scale (AND™, model 870, Japan) was used.

The kinetics of hyposmotic lysis of the erythrocyte membrane [10] was performed in a duplicate series of 14 microtubes (Eppendorf™, Hamburg, Germany) of 2 mL volume. Initially, microtubes with 1 mL of 0.40 g/dL NaCl solution were preincubated in a thermostated water bath (Marconi™, model MA 184, Piracicaba, SP, Brazil) for 10 min at 37 °C. Then, after addition of 20 µL of whole blood to each microtube, the whole set of microtubes was homogenized and incubated at 37 °C. The osmotic lysis in each microtube was interrupted by the addition of 1 mL of hypertonic solution of 5 g/dL NaCl, in the time range of 0 to 30 minutes. After interruption of the osmotic lysis by hypertonic shock, the solutions were further incubated for 30 min at 37 °C and then centrifuged for 10 min at 1,600 x g and 37 °C (Hitachi Koki™, model CF15RXII, Hitachinaka, Japan) for separation of the supernatant and subsequent reading of absorbance at 540 nm in a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu™, model UV1650TC, Japan) using the UV Probe 2.21 software.

The kinetic curve of osmotic lysis of erythrocytes was determined by statistical adjustment to a hyperbola given by equation

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

where A is the absorbance at 540 nm obtained at each time interval (t) considered in the test, A<sub>max</sub> is the maximum absorbance value reached in the plateau of the curve, which represents the total lysis of erythrocytes, and t<sub>1/2</sub> is the time elapsed for half of the total hemolysis (A<sub>max</sub>/2).

### **Hematologic and biochemical analyzes**

The hematologic variables and their indices were acquired using an automated system of analysis (Cell-Dyn 3700, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). The reference values for these variables were: hemoglobin (Hb), 12.0-16.0 g/dL; hematocrit (Ht), 35.0-46.0%; mean corpuscular volume (MCV), 80.0-100.0 fL/cell; mean corpuscular hemoglobin (MCH), 26.0-

34.0 pg/cell; mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), 31.0-36.0 g/dL; erythrocytes (RBC), 4.0-5.2 million cells/mm<sup>3</sup>; red-cell distribution width (RDW), 11.5-15%; and platelets (Plt), 150,000-450,000 cells/mm<sup>3</sup> [12, 13].

Biochemical variables were obtained using an automated analyzer (Architect C 8000, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). The reference values for the lipid profile were: total cholesterol (t-C), desirable <190 mg/dL; high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), desirable > 40 mg/dL; triglycerides (TGC), desirable < 150 mg/dL [14]; low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), optimal < 100 and high > 160 mg/dL [15]. The reference value for fasting blood glucose was < 100 mg/dL [16].

### **Evaluation of food consumption**

The recording of food intake was verified by means of an individual interview, performed by nutritionists, in two non-consecutive moments, one in the middle of the week and the other at the weekend [17]. Data on the consumption of macronutrients (carbohydrates, lipids and proteins) and daily energy consumption were analyzed using the DietPro 5.7i<sup>TM</sup> (Viçosa, MG, Brazil) application.

### **Statistical analysis**

Data normality was verified by the Shapiro-Wilk test. Data with normal distribution were expressed as mean and standard deviation of the average variation. However, the data that did not show normal distribution were described as median and interquartile range. The kinetics analysis of erythrocyte lysis was performed using an integrated kinetic model described by the non-integrated equation of the Michaelis-Menten model. Correlation analyzes were performed using the Pearson or Spearman tests, when the data presented normal and non-normal distribution, respectively. Statistical tests were performed using the SPSS 21.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) or Origin 9.0 (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, USA) software packages.

### **Results**

The age range of the 24 volunteers who participated in the study varied between 33 and 70 years of age. According to a classification based on BMI [18], 54.2% of the studied population was overweight or obese. In addition, 79.2% had a fat percentage greater than 33%. In relation to drug use as adjuvant therapy, two of the volunteers were not taking any drugs,



three were using aromatase inhibitors and 19 were under tamoxifen. The number of lymph nodes removed surgically ranged from 1 to 26. The time interval after surgery until participation in the study ranged from 4 to 78 months. The time of adjuvant treatment of the 22 women who were under anti-hormonal therapy ranged from 3 to 70 months. The study population was statistically described, according to the data distribution pattern, as shown in Table 3.1.

The body composition, in kg, of the water mass, mineral mass, body fat mass, fat free mass and lean mass of the studied population was  $28.7 \pm 3.1$ ,  $2.8 \pm 0.1$ ,  $25.3 \pm 8.6$ ,  $39.1 \pm 4.3$ , and  $41.8 \pm 4.6$ , respectively. The respective percentages of mineral mass, fat-free mass and lean mass were  $4.3 \pm 0.5$ ,  $61.6 \pm 7.2$  and  $66.0 \pm 7.7$ .

The percentages of reticulocytes, neutrophils, lymphocytes, eosinophils and basophils of the studied population, with their respective interquartile ranges, were 0.8 (0.7-0.8), 54.3 (50.1-63.1), 33.9 (27.7-37.1), 2.2 (1.4-4.3) and 0.4 (0.3-0.9), respectively. The percentage of monocytes presented a mean of 7.8 with a standard deviation of 1.73. Twenty-five percent of the population had erythrocyte counts lower than the reference range. The complete hematologic profile of volunteers is presented in Table 3.2.

According to the reference values adopted in the present study, 83.3%, 45.8%, 8.3%, 50.0% and 50.0% of the population had no desirable values of total cholesterol, triglycerides, HDL-C, LDL-C and fasting glycemia, respectively. The averages or medians of the biochemical variables of the volunteers are presented in Table 3.3.

The food intake variables, calculated from the food recall, are presented in Table 3.4. In the present sample, the estimated dietary intake of folic acid was lower than the daily recommendation, which is 400  $\mu\text{g}$ .

Figure 3.1 shows a typical kinetic curve of osmotic lysis of erythrocytes from one of the volunteers of the present study. The study population presented a median of 1.0, with an interquartile range of 0.8-1.1 for  $A_{\text{max}}$ , and a median of 0.6, with an interquartile range of 0.4-1.3 for  $t_{1/2}$ .

Table 3.5 presents the correlation coefficients between each pair of variables considered in this study.

## Discussion

The mean BMI of the population of this study ( $25.9 \pm 4.7 \text{ kg/m}^2$ ) exceeded the cutoff point of  $24.9 \text{ kg/m}^2$  that characterizes overweight [18]. Indeed, the majority of the population

in this study (54.2%) was overweight or obese. This percentage is close to that found by Yeo et al. Yeo *et al.* (2017)[19], who reported a frequency of overweight or obesity in 52.1% of the 280 BCS who participated in their study, according to their BMI values. In addition, on average, the volunteers in the present study tended to be obese, as they had a percentage of fat higher than 33% [20]. These findings are worrisome because excess adipose tissue or increased body fat mass are associated with increased risk of recurrence of breast cancer and development of comorbidities that may lead to decreased survival of BCS [21, 22].

Regarding the hematologic variables, the values obtained in this study were within the reference range, which is consistent with the results reported by Shahid (2016)[23], except for the Ht values, for survivors of all types of cancer treated by radiotherapy and/or chemotherapy, but not for BCS, which presented values below the reference range for Hb, Ht and MCH [23]. An important determinant of this hematological difference in BCS appears to be menopause. In postmenopausal BCS, lower values of RBC and Hb and higher values of RDW were observed in relation to premenopausal BCS, although there was no difference between these two groups in relation to leukocyte, lymphocyte, monocyte and neutrophil counts [24].

Occurrence of dyslipidemia is a common finding in breast cancer survivors [19], as also shown in the present study. Regarding LDL-C, blood levels were elevated in 56.1% of volunteers in that study, a frequency very close to that found in this study (50.0%). The same can be said of the frequency of low HDL-C values, which was 6.6% in that study compared to 8.3% in this study. However, for frequencies of t-C and TGC, frequencies higher than desirable were much higher in this study (83.3% and 45.8%, respectively) than in that study (34.5% and 22.9%, respectively), which could be due to the use of tamoxifen [19].

Regarding the correlation analyzes, some of the results found were expected, since there are conceptual relations between the variables. This is the case of BMI and BM ( $r = 0.93$ ) [11], RBC e Hb ( $r = 0.75$ ), RBC and Ht ( $r = 0.82$ ), RBC and MCH ( $r = -0.65$ ), RBC and MCV ( $r = -0.53$ ), Hb and Ht ( $r = 0.93$ ), MCH and MCV ( $r = 0.89$ ), and MCH and MCHC ( $r = 0.47$ ) [25], but also of t-C and TGC ( $r = 0,41$ ), t-C e VLDL-C ( $r = 0,41$ ) e TGC e VLDL-C ( $r = 1.0$ ) [26].

In relation to  $A_{max}$ , a parameter obtained in the osmotic lysis kinetics of erythrocytes and representing the maximum absorbance found in the osmotic lysis curve of these patients, their values showed significant positive correlations with erythrocytes ( $r = 0.53$ ), Hb ( $r = 0.53$ ) and Ht ( $r = 0.52$ ). These correlations are obvious, since the absorbance measured at 540 nm represents the measure of a hemoglobin property [10].

In relation to  $t_{1/2}$ , a parameter also obtained in the osmotic lysis kinetics of erythrocytes, which represents the time required to promote lysis of half of the erythrocyte population used

in the test, their values showed a significant negative correlation with the percentage of reticulocytes ( $r = -0.5$ ). This means that volunteers with a higher percentage of reticulocytes have kinetically weaker erythrocytes. Usually, the percentage of reticulocytes increases when there is an increase in erythropoiesis rate. An increase in erythropoiesis demands elevation in the action of folic acid coenzyme on nucleotide biosynthesis to meet the increased demand for cell division [27]. Therefore, a deficiency of folic acid in the diet is associated with elevation in the release of reticulocytes, which are precursors of mature erythrocytes, into the bloodstream. Therefore, the reticulocyte (Rtc) index was expected to increase with a decrease in ingested folate. However, the positive correlation observed between Rtc and folate (Table 3.5) indicates the opposite, i.e., the reticulocyte index decreased with the decrease in the intake of folate. In addition, the inverse correlation observed between  $t_{1/2}$  and folic acid feed intake ( $r = -0.6$ ) should mean that erythrocytes were kinetically more fragile (lower  $t_{1/2}$ ) the higher the folic acid intake, when it would be expected that a higher intake of folic acid would generate more mature and more stable erythrocytes. It is possible that these changes in the trend are due to changes in cancer and/or its treatments, together with the low intake of folic acid in the study population in relation to the recommended daily intake of this vitamin [28].

An important aspect of the correlation analysis that deserves to be highlighted is the positive correlation observed between the RBC counts and the LDL-C levels, indicating that the elevation of lipidemia in this population may be attending to the need for elevation of erythropoiesis, in the sense that the increase in reticulocyte population could allow the generation of a larger number of stable mature erythrocytes as a result of cholesterol transfer to red blood cells. This makes sense, especially in view of the also positive correlation observed between Ht and LDL-C.

The main limitation of the present study was the small size of the population due to recruitment difficulties. The variable adherence of the volunteers to the blood tests represents another important limitation, certainly related to the psychological aspects of these women, even after they have already undergone the main treatment of the disease.

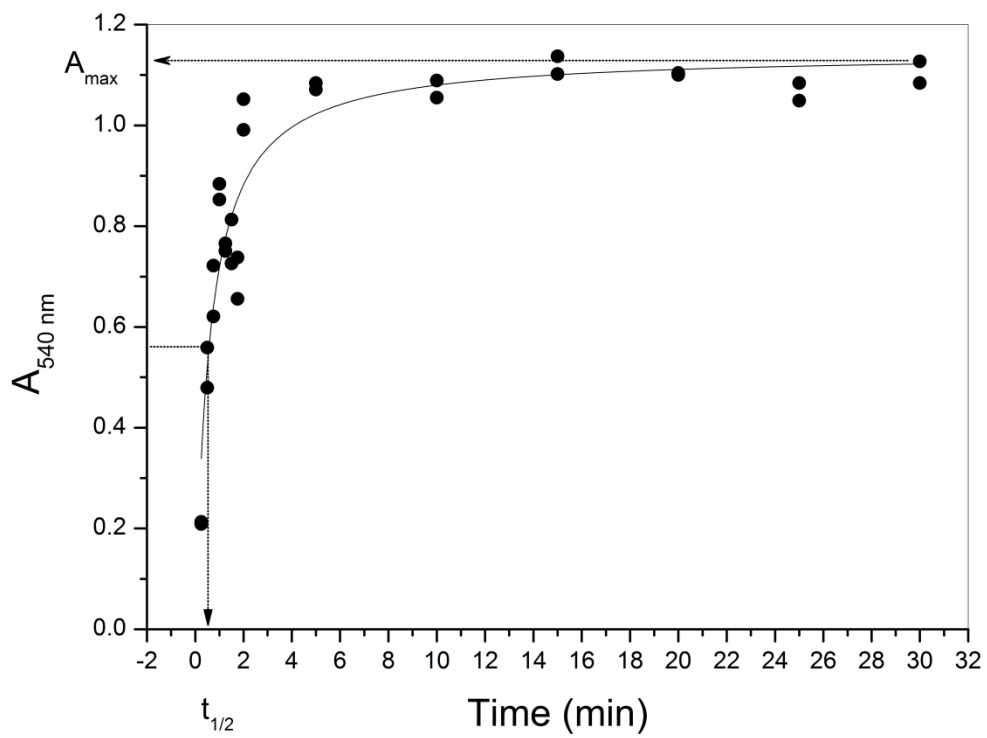
## **Conclusion**

A parameter obtained in the osmotic lysis kinetics of erythrocytes,  $A_{max}$ , which represents the maximum absorbance found in the osmotic lysis curve of erythrocytes from BCS, presented significant positive correlations with RBC counts, Hb concentrations and Ht

values; these correlations were expected, since Amax represents a spectral property of the hemoglobin released on lysis.

The other parameter also obtained in the osmotic lysis kinetics of erythrocytes,  $t_{1/2}$ , which represents the time required to promote lysis of half of the erythrocyte population used in the test, showed a significant negative correlation with the percentage of reticulocytes; this correlation means that volunteers with a higher percentage of reticulocytes have kinetically weaker erythrocytes. This suggests that breast cancer survivors still preserve some hematological changes normally associated with the therapeutic approaches used.

Undesirable levels of triglycerides, LDL-cholesterol and total cholesterol found in 45.8%, 50.0% and 83.3% of the volunteers, respectively. However, as erythrocyte counts showed a significant positive correlation with LDL-C and negative levels with HDL-C levels, this suggests that the observed dyslipidemia is attending to an increase in the hematological demand for cholesterol, to guarantee stabilization of the membrane of erythrocytes, thus preserving the count of these blood cells.



**Figure 3.1.** Typical curve of the osmotic lysis kinetics of erythrocytes from a study volunteer.

**Table 3.1.** Characterization of the study population (n=24).

Variables	Mean $\pm$ SD or Median (Q1-Q3)
Age (years)	49.8 $\pm$ 9.4
Time after surgery (months)	22 (16.0 – 29.5)
Number of lymph nodes removed	9 (1.5 - 12.0)
Time of medication use (months)	17 (9.5 - 27.3) <sup>a</sup>
Weight (kg)	64.3 $\pm$ 11.1
Height (m)	1.6 $\pm$ 0.1
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	25.9 $\pm$ 4.7
Fat mass (%)	38.4 $\pm$ 7.2

<sup>a</sup>n=22.

**Table 3.2.** Hematologic profile of study volunteers (n=24).

Variables	Mean $\pm$ SD or Median (Q1-Q3)
Leukocytes ( $10^3/\text{uL}$ )	4.9 (4.4 - 5.7) <sup>a</sup>
Red Blood Cells ( $10^6/\text{uL}$ )	4.7 $\pm$ 0.4
Hemoglobin (g/dL)	13.7 $\pm$ 0.8
Hematocrit (%)	40.8 $\pm$ 2.8
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg/celula)	29.1 $\pm$ 1.5
Mean Corpuscular Volume (fL)	86.5 $\pm$ 3.9
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (g/dL)	33.7 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
Red Cell Distribution Width (%)	13.3 (12.9 - 13.9)
Reticulocytes (/mm <sup>3</sup> )	37.5 $\pm$ 10.3
Platelets ( $10^3/\text{uL}$ )	216.0 $\pm$ 50.6
Neutrophils ( $10^3/\text{uL}$ )	2.6 (3.2 - 2.9) <sup>a</sup>
Lymphocytes ( $10^3/\text{uL}$ )	1.7 $\pm$ 0.4
Monocytes ( $10^3/\text{uL}$ )	0.4 $\pm$ 0.1
Eosinophils ( $10^3/\text{uL}$ )	0.09 (0.06 - 0.2)
Basophils ( $10^3/\text{uL}$ )	0.02 (0.02 - 0.04) <sup>b</sup>
Serum Iron ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )	109.3 $\pm$ 26.4

<sup>a</sup>n=22; <sup>b</sup>n=21.

**Table 3.3.** Biochemical profile of the study volunteers (n = 24).

Variables	Mean $\pm$ SD or Median (Q1-Q3)
Total Cholesterol (mg/dL)	200.8 $\pm$ 22.4
Triglycerides (mg/dL)	151.1 $\pm$ 65.1
High Density Lipoprotein Cholesterol (mg/dL)	60 (47.5-123.5)
Low Density Lipoprotein Cholesterol (mg/dL)	91.9 $\pm$ 35.5
Very Low Density Lipoprotein Cholesterol (mg/dL)	30.2 $\pm$ 13.0
Fasting Blood Glucose (mg/dL)	99.5 (95-107.5)



**Table 3.4.** Daily nutritional intake estimated from food recall (n = 19).

Variables	Mean $\pm$ SD or Median (Q1-Q3)
Energy (kcal)	1758.5 $\pm$ 344.7
Carbohydrates (g)	200.2 $\pm$ 47.2
Proteins (g)	78.5 $\pm$ 24.9
Lipids (g)	67.5 $\pm$ 18.3
Cholesterol (mg)	226.0 $\pm$ 118.7
Saturated fats (g)	21.5 $\pm$ 6.6
Monounsaturated fats (g)	27.8 $\pm$ 9.1
Fibers (g)	19.8 $\pm$ 7.3
Iron (mg)	11.1 $\pm$ 3.4
Folic acid ( $\mu$ g)	47.2 $\pm$ 25.6
Vitamin B6 ( $\mu$ g)	1.4 (1.3 - 1.7) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>n=20.

**Table 3.5.** Coefficients of correlation between pairs of studied variables.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	Age	1																					
2	Weight	0.0	1																				
3	BMI	0.0	0.9 <sup>§</sup>	1																			
4	A <sub>max</sub>	0.2	-0.1	-0.2	1																		
5	t <sub>1/2</sub>	0.2	-0.1	-0.2	-0.2	1																	
6	RBC	0.0	0.0	0.0	0.5 <sup>§</sup>	0.0	1																
7	Hb	0.2	-0.3	-0.2	0.5 <sup>§</sup>	0.0	0.8 <sup>§</sup>	1															
8	Ht	0.3	-0.2	-0.1	0.5 <sup>§</sup>	0.0	0.8 <sup>§</sup>	0.9 <sup>§</sup>	1														
9	MCH	0.2	-0.3	-0.2	-0.1	0.0	-0.7 <sup>§</sup>	0.0	-0.2	1													
10	MCV	0.3	-0.3	-0.1	-0.1	0.1	-0.5 <sup>§</sup>	0.1	0.1	0.9 <sup>§</sup>	1												
11	MCHC	-0.3	-0.1	-0.2	-0.1	0.1	-0.3	0.1	-0.4	0.5*	0.0	1											
12	RDW	-0.2	0.5*	0.5*	-0.0	-0.1	0.2	0.0	0.1	-0.4	-0.3	-0.2	1										
13	Plt	0.1	0.1	0.2	0.2	-0.4	0.1	0.1	0.2	-0.1	0.0	-0.2	-0.3	1									
14	Rtc	0.3	0.2	0.1	0.1	-0.5 <sup>§</sup>	0.2	0.2	0.2	-0.2	-0.1	-0.4	0.4	0.1	1								
15	Iron	0.2	-0.0	-0.1	-0.1	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0	-0.1	0.1	0.2	1							
16	t-C	0.1	0.6 <sup>§</sup>	0.5*	0.2	-0.1	0.3	0.2	0.2	-0.2	-0.2	-0.1	0.3	0.4*	0.2	-0.1	1						
17	TGC	0.4*	0.2	0.2	0.3	0.0	0.3	0.2	0.3	-0.2	-0.1	-0.1	-0.1	0.5*	0.2	-0.2	0.4*	1					
18	HDL-C	0.0	-0.1	-0.0	-0.3	0.1	-0.5*	-0.2	-0.3	0.3	0.5*	-0.1	-0.2	0.1	0.0	0.4	0.3	-0.3	1				
19	LDL-C	-0.1	0.3	0.2	0.4	-0.2	0.6 <sup>§</sup>	0.3	0.4*	-0.5*	-0.4*	-0.1	0.2	0.0	0.1	-0.4	0.3	0.4	-0.9 <sup>§</sup>	1			
20	VLDL-C	0.4*	0.2	0.2	0.3	0.0	0.3	0.2	0.3	-0.2	-0.1	-0.1	-0.1	0.5*	0.2	-0.2	0.4*	1.0*	-0.3	0.4	1		
21	Glucose	0.5*	0.3	0.3	0.4	-0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.3	0.3	0.1	0.4*	0.7 <sup>§</sup>	-0.3	0.3	0.7 <sup>§</sup>	1	
22	Vitamin B9	-0.1	-0.2	-0.2	0.6 <sup>§</sup>	-0.6 <sup>§</sup>	0.7 <sup>§</sup>	0.5*	0.5*	-0.4*	-0.4*	-0.1	0.1	0.1	0.5*	-0.1	0.2	0.0	-0.3	0.4	0.0	0.1	1

Abbreviations: BMI, Body Mass Index; A<sub>max</sub>, Maximum Absorbance; t<sub>1/2</sub>, time for half of the total lysis; RBC, Red Blood Cells; Hb, Hemoglobin; Ht, Hematocrit; MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin; MCV, Mean Corpuscular Volume; MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; RDW, Red cell distribution width; Plt, Platelet count; Rtc, Reticulocyte Count; t-C, total Cholesterol; TGC, Triglycerides; HDL-C, High-Density Lipoprotein Cholesterol; LDL-C, Low-Density Lipoprotein Cholesterol; VLDL-C, Very-Low-Density Lipoprotein Cholesterol; Vitamin B9, Folic Acid.

\*p<0.05; §p<0.01.

## References

1. WHO. Preventing chronic diseases: a vital investment. World Health Organization. 2005;1-202. doi: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43314/1/9241563001\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43314/1/9241563001_eng.pdf).
2. Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol.* 2009;33(5):315-8. Epub 2009/11/10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2009.10.003>. PubMed PMID: 19896917.
3. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2014;64(4):252-71. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21235>. PubMed PMID: 24890451.
4. Saúde Md, (INCA) INdCJAGdS. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015. 1-126 p. Available from: <https://ninho.inca.gov.br/jspui/bitstream/123456789/11691/1/Estimativa%202016%20Incid%20de%20C%20a%20ncer%20no%20Brasil.%202015.pdf>.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2016;66(1):7-30. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21332>. PubMed PMID: 26742998.
6. Di Lascio S, Pagani O. Is it time to address survivorship in advanced breast cancer? A review article. *Breast.* 2017;31:167-72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.10.022>. PubMed PMID: 27871024.
7. Dolan LB, Gelmon K, Courneya KS, Mackey JR, Segal RJ, Lane K, et al. Hemoglobin and aerobic fitness changes with supervised exercise training in breast cancer patients receiving chemotherapy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2010;19(11):2826-32. doi: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0521>. PubMed PMID: 20861399.
8. Selim NS, Desouky OS, Ali SM, Ibrahim IH, Ashry HA. Effect of gamma radiation on some biophysical properties of red blood cell membrane. *Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications.* 2009;42(2):243-53. Available from: <https://www.rjb.ro/articles/248/nasel.pdf>.
9. Khoshbin AR, Mohamadabadi F, Vafaeian F, Babania A, Akbarian S, Khandozi R, et al. The effect of radiotherapy and chemotherapy on osmotic fragility of red blood cells and plasma levels of malondialdehyde in patients with breast cancer. *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology.* 2015;20(4):305-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2014.11.002>. PubMed PMID: 26109919; PubMed Central PMCID: PMC4477123.
10. Cunha LM, Bernardino-Neto M, Garrote-Filho MS, Avelar CB, de Freitas MV, Netto RCM, et al. Kinetics of hypotonic lysis of human erythrocytes. *Analytical Methods.* 2014;6(5):1377-83. doi: <https://doi.org/10.1039/c3ay41404c>.
11. Garrow JS, WEBSTER J. Quetelet's index (W/H<sup>2</sup>): as a measure of fatness. *Int J Obesity.* 1985;9:147-53.
12. Bain BJ, Bates I, Laffan MA. *Dacie and Lewis Practical Haematology: Elsevier Health Sciences; 2016.*
13. Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastasi J. *Hematology: Basic Principles and Practice E-Book: Elsevier Health Sciences; 2017.* doi: 10.1016/C2013-0-23355-9.
14. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2017;109(2):1-76. doi: 10.5935/abc.20170121.

- Available from:  
[http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02\\_DIRETRIZ\\_DE\\_DISLIPIDEMIA\\_S.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2017/02_DIRETRIZ_DE_DISLIPIDEMIA_S.pdf).
15. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2013;101(4). doi: <https://doi.org/10.5935/abc.2013S010>.
  16. Milech A, Angelucci AP, Golbert A, Matheus A, Carrilho AJF, Ramalho AC, et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes - 2015-2016. São Paulo: A.C. Farmacêutica; 2016. Available from: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2494325/mod\\_resource/content/2/DIRETRIZE\\_S-SBD-2015-2016.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2494325/mod_resource/content/2/DIRETRIZE_S-SBD-2015-2016.pdf).
  17. Slater B, Philippi ST, Marchioni DML, Fisberg RM. Validação de Questionários de Frequência Alimentar - QFA: considerações metodológicas. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2003;6(3). doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2003000300003>.
  18. WHO. Global database on body mass index 2006 [cited 2017 2017/10/11]. Available from: <http://www.assessmentpsychology.com/icbmi.htm>.
  19. Yeo W, Mo FKF, Pang E, Suen JJS, Koh J, Loong HHF, et al. Profiles of lipids, blood pressure and weight changes among premenopausal Chinese breast cancer patients after adjuvant chemotherapy. BMC Womens Health. 2017;17(1):55. Epub 2017/07/29. doi: <https://doi.org/10.1186/s12905-017-0409-8>. PubMed PMID: 28750616; PubMed Central PMCID: PMC5532788.
  20. Pitanga FJG. Testes, medias e avaliação em educação física e esporte. 5 ed. São Paulo: Phorte; 2008.
  21. Caan BJ, Kwan ML, Hartzell G, Castillo A, Slattery ML, Sternfeld B, et al. Pre-diagnosis body mass index, post-diagnosis weight change, and prognosis among women with early stage breast cancer. Cancer Causes Control. 2008;19(10):1319-28. Epub 2008/08/30. doi: <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9203-0>. PubMed PMID: 18752034; PubMed Central PMCID: PMC5532788.
  22. Playdon MC, Bracken MB, Sanft TB, Ligibel JA, Harrigan M, Irwin ML. Weight Gain After Breast Cancer Diagnosis and All-Cause Mortality: Systematic Review and Meta-Analysis. J Natl Cancer Inst. 2015;107(12):djv275. Epub 2015/10/02. doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/djv275>. PubMed PMID: 26424778; PubMed Central PMCID: PMC5532788.
  23. Shahid S. Review of hematological indices of cancer patients receiving combined chemotherapy & radiotherapy or receiving radiotherapy alone. Crit Rev Oncol Hematol. 2016;105:145-55. Epub 2016/07/18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.06.001>. PubMed PMID: 27423975.
  24. Dezayee ZMI, Al-Nimer MSM. The Clinical Importance of Measurement of Hematological Indices in the Breast Cancer Survivals: A Comparison Between Premenopausal and Postmenopausal Women. World J Oncol. 2016;7(1):1-4. Epub 2016/02/01. doi: <https://doi.org/10.14740/wjon956e>. PubMed PMID: 28983356; PubMed Central PMCID: PMC5532788.
  25. George-Gay B, Parker K. Understanding the complete blood count with differential. J Perianesth Nurs. 2003;18(2):96-114; quiz 5-7. Epub 2003/04/24. doi: <https://doi.org/10.1053/jpan.2003.50013>. PubMed PMID: 12710004.
  26. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499-502. Epub 1972/06/01. PubMed PMID: 4337382. doi: <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>.

27. Green R, Datta Mitra A. Megaloblastic Anemias: Nutritional and Other Causes. *Med Clin North Am.* 2017;101(2):297-317. Epub 2017/02/13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.013>. PubMed PMID: 28189172.
28. Organization. FaA, Organization. WH. Human vitamin and mineral requirements. Bangkok, Thailand: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2001. Available from: <https://www.fao.org/3/y2809e/y2809e.pdf>.