

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA FLÁVIA MAYRINK GONÇALVES E OLIVEIRA

**CORRELAÇÕES ENTRE A ESTABILIDADE OSMÓTICA DA MEMBRANA
DE ERITRÓCITOS E ÍNDICES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS
DURANTE TRATAMENTO COM ESTATINA**

Uberlândia
2014

ANA FLÁVIA MAYRINK GONÇALVES E OLIVEIRA

**CORRELAÇÕES ENTRE A ESTABILIDADE OSMÓTICA DA MEMBRANA
DE ERITRÓCITOS E ÍNDICES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS
DURANTE TRATAMENTO COM ESTATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique
Alves de Rezende

Co-Orientador: Prof. Dr. Nilson Penha-
Silva

Uberlândia
2014

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

O48c
2014

Oliveira, Ana Flávia Mayrink Gonçalves e, 1979-
Correlações entre a estabilidade osmótica da membrana de
eritrócitos e índices hematológicos e bioquímicos durante tratamento
com estatina / Ana Flávia Mayrink Gonçalves e Oliveira. - 2014.
46 p. : il.

Orientador: Carlos Henrique Alves de Rezende.

Coorientador: Nilson Penha-Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Colesterol - Teses. 3. Eritrócitos -
Teses. 4. Estatinas - Teses. I. Rezende, Carlos Henrique Alves de. II.
Penha-Silva, Nilson. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

ANA FLÁVIA MAYRINK GONÇALVES E OLIVEIRA

**CORRELAÇÕES ENTRE A ESTABILIDADE OSMÓTICA DA MEMBRANA
DE ERITRÓCITOS E ÍNDICES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS
DURANTE TRATAMENTO COM ESTATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Uberlândia, 09 de maio de 2014.

Prof. Dr. Carlos Henrique Alves de Rezende
Universidade Federal de Uberlândia
Orientador

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Miguel Antônio Facury Neto
Hospital e Maternidade Madrecor

Dedicatória

André Luiz de Oliveira,
Flávio Antônio Gonçalves,
Manuela Mayrink Gonçalves e Oliveira,
Minha trindade,
Meu universo de amor e felicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença constante em minha vida, guiando, abençoando e iluminando todos os meus passos, provando que tudo tem seu tempo e sua hora e que basta confiar. Agradeço por tantas bênçãos e todos os planos, sempre tão perfeitos!

Ao Prof. Dr. Nilson Penha-Silva, muito obrigada pela sua dedicação, humildade, generosidade, compreensão e confiança.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Alves de Rezende, muito obrigada pela orientação, pelo apoio, incentivo e por toda confiança depositada neste estudo.

Ao Dr. Valmir Costa pela valiosa colaboração na realização deste estudo.

À Lara Ferreira Paraíso, Letícia Ramos de Arvelos, Rita de Cássia Mascarenhas Netto, Mariana Vaini de Freitas, Omar Pereira de Almeida Neto, Valmir de Freitas Costa, Éven Aline Pereira, Lucas Moreira Cunha, Guilherme Santos Duarte Lemos e Liandra Freitas Marquez Bernardes, muito obrigada pela amizade, pela parceria, pelo apoio e pelo companheirismo.

Aos amigos e amigas do PPGCS da FAMED-UFU, por dividirem comigo tantos ótimos e inesquecíveis momentos!

A todos os professores do PPGCS da FAMED-UFU, pelo convívio e por todo conhecimento compartilhado.

Às secretárias do PPGCS da FAMED-UFU, Gisele e Viviane, por toda atenção, por toda ajuda e boa vontade de sempre.

Ao Madson Caetano de Carvalho, Lindaura Arantes Carvalho de Castro e a todos do INGEB, muito obrigada pelo apoio, amizade e colaboração.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, pelas análises e disponibilidade em ajudar.

Aos voluntários que participaram deste estudo, pela grande generosidade e doação.

À Universidade Federal de Uberlândia e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela oportunidade e pelo financiamento deste estudo.

APOIO

Laboratório de Biofísicoquímica



Universidade Federal de Uberlândia



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



RESUMO

Correlações entre a Estabilidade Osmótica da Membrana de Eritrócitos e Índices Hematológicos e Bioquímicos durante Tratamento com Estatina

Este estudo teve como objetivo analisar as correlações entre a estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos (OSEM) e os índices lipídicos e hematológicos em uma população de 19 voluntários, em cinco diferentes momentos, durante oito semanas de tratamento com estatinas. A OSEM foi derivada de uma curva típica de fragilidade osmótica, propriamente expressa pelos valores inversos do ponto intermediário ($1/H_{50}$) e a variação na concentração de NaCl necessária para produzir hemólise total, uma vez que estes dois parâmetros estão diretamente relacionados com a OSEM. A OSEM foi positivamente associada com o aumento dos níveis sanguíneos de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e colesterol total plasmático (t-C), sendo que os níveis sanguíneos de LDL-C se mostraram a variável mais fortemente correlacionada com os parâmetros de estabilidade. A OSEM também foi associada a um aumento dos valores de distribuição de volume das células vermelhas no sangue (RDW), em consequência da elevação dos valores de volume corpuscular médio (VCM) causada pelos níveis sanguíneos mais altos de LDL-C. A OSEM apresentou correlações inversas com a contagem de eritrócitos (RBC), valores de hematócrito e com os níveis sanguíneos de hemoglobina, em consequência do aumento dos níveis sanguíneos de colesterol a um ponto no qual a alta rigidez de membrana tornou as células mais vulneráveis à ruptura mecânica causada pela tensão de cisalhamento ou pela sua passagem através de capilares de diâmetro muito pequeno. A OSEM foi negativamente associada com os níveis sanguíneos de AST e ALT, provavelmente porque a estabilidade *in vitro* reflete melhor o comportamento geral das membranas de outras células do organismo do que o comportamento *in vivo* dos próprios eritrócitos. A existência de uma associação entre a OSEM e a habilidade prognóstica do RDW em processos inflamatórios pode ser suportada pela correlação positiva observada entre os valores de $1/H_{50}$ e a razão N/L. Em resumo, os níveis sanguíneos de LDL-C têm ampla influência nos índices hematológicos em consequência de sua relação com a estabilidade de membrana dos eritrócitos.

Palavras-chave: Colesterol, Eritrócito, Membrana, Razão Neutrófilos/Linfócitos, RDW, Estatinas

ABSTRACT

Correlations between the Osmotic Stability of the Erythrocyte Membrane and Hematological and Lipid Indices during Statin Therapy

This study aimed to analyze the correlations between the osmotic stability of the erythrocyte membrane (OSEM) and hematological and lipid indices in a population of 19 volunteers, at five different moments during eight weeks of statin therapy. The OSEM was derived from a typical osmotic fragility curve and properly expressed by the inverse of its midpoint ($1/H_{50}$) and the variation in the NaCl concentration necessary to produce full hemolysis, since both these parameters are directly related with the OSEM. The OSEM was positively associated with increase in the blood levels of LDL-C and t-C, with the blood levels of LDL-C being the variable more strongly correlated with the stability parameters. The OSEM was also associated with increased values of RDW, in consequence to the elevation in MCV values caused by high blood levels of LDL-C. The OSEM showed inverse correlations with the RBC count, hematocrit values and blood levels of Hb, in consequence to increase in the blood levels of cholesterol to a point in which the high membrane rigidity make those cells more vulnerable to the mechanical disruption caused by shear stress or by their passage through small diameter capillaries. The OSEM was negatively associated with the blood levels of ALT and AST, probably because this *in vitro* stability reflects better the behavior of the general membrane cells of the organism than the proper *in vivo* behavior of the proper erythrocytes. The existence of an association between the OSEM and the prognostic ability of RDW in inflammatory processes can be supported by the positive correlation observed between $1/H_{50}$ and the N/L ratio. In summary, the blood levels of LDL-C have large influence on the hematological indices in consequence to changes in the stability of the erythrocyte membrane.

Keywords: Cholesterol, Erythrocyte, Membrane, Neutrophil/Lymphocyte Ratio, RDW, Statin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorvância
A ₁	Absorvância no platô de hemólise máxima
A ₂	Absorvância no platô de hemólise mínima ou basal
A _{540 nm}	Absorvância em comprimento de onda de 540nm
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
dX	Variação da concentração de NaCl que promove 100% de hemólise
H ₅₀	Concentração de NaCl que promove 50% de hemólise
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
Ht	Hematócrito
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
n	Tamanho da amostra
nHDL-C	Colesterol total (t-C) – HDL-colesterol
RBC	Eritrócito
RDW	Distribuição de volume das células vermelhas no sangue
t-C	Colesterol total plasmático
VCM	Volume corpuscular médio
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Comparação de parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estabilidade dos voluntários nos cinco diferentes momentos do estudo	13
Tabela 2. Matriz de coeficientes de correlação de Spearman (ρ) entre os pares de variáveis estudadas (n=90)	14
Tabela 3. Cargas e pares canônicos determinados entre os parâmetros de estabilidade ($1/H_{50}$ and dX) e as variáveis do grupo 1	15
Tabela 4. Cargas e pares canônicos determinados entre os parâmetros de estabilidade ($1/H_{50}$ and dX) e as variáveis do grupo 2	16

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig 1. Curva típica de fragilidade osmótica, com ilustração do significado dos parâmetros dX e H_{50} , que apresentam relações direta e inversa, respectivamente, com a estabilidade de membrana do eritrócito	17
Fig 2. Relação entre estabilidade osmótica e funcionalidade com a fluidez de membrana de um eritrócito	18

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	01
2. Objetivo	07
3. Material e Métodos	08
População	08
Coletas de sangue	08
Determinação das variáveis hematológicas e bioquímicas	08
Avaliação da estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos	09
Análises estatísticas	10
4. Resultados	11
5. Discussão	19
Estabilidade de membrana do eritrócito e níveis sanguíneos de colesterol	19
Estabilidade de membrana do eritrócito e RDW	21
Estabilidade de membrana do eritrócito, MCV e vitaminas do complexo B	22
Estabilidade de membrana de eritrócitos, contagem de RBC e hematócrito	22
Estabilidade de membrana dos eritrócitos e relação N/L	23
Estabilidade de membrana do eritrócito e níveis sanguíneos de AST e ALT	24
6. Conclusões	25
7. Referências	26
Anexos	32
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	32
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	33

1. INTRODUÇÃO

As membranas biológicas são estruturas vitais para a existência das células, pois são elas que delimitam os espaços intra- e extracelular, garantindo a individualidade e regulando a entrada e saída de moléculas e substâncias através de sua permeabilidade seletiva (Alberts, Brady *et al.*, 2002; Alberts, Bray *et al.*, 2007; Berg, Tymoczko *et al.*, 2008; Voet e Voet, 2013).

As membranas são compostas por lipídeos, proteínas e carboidratos, que juntos constituem uma estrutura fluida, classicamente descrita na literatura como mosaico fluido, o que permite a livre difusão lateral tanto de lipídeos quanto de proteínas da bicamada (Alberts, Bray *et al.*, 2007; Nelson e Cox, 2008; Voet e Voet, 2013). O grau de fluidez, propriedade extremamente importante para as funções das membranas, depende intimamente de sua composição lipídica. Nas células animais, a fluidez da membrana é regulada pela quantidade presente de moléculas de colesterol (Alberts, Bray *et al.*, 2007).

As membranas biológicas têm muitas propriedades, dentre as quais se destaca a estabilidade. A estabilidade de membrana pode ser definida como a capacidade da membrana em manter sua estrutura diante de agentes ou condições caotrópicas. A estabilidade é fundamental para a preservação das funções das membranas (Gouvêa-E-Silva, 2006; Arvelos, 2007) e está intimamente relacionada com a sua fluidez.

A estabilidade de membrana pode ser afetada por vários fatores, que compreendem a concentração de solutos como sais, etanol e ureia, mas também de fatores como temperatura, oxidação, idade, composição e concentração sanguínea de metabólitos como, por exemplo, o colesterol (Mascarenhas Netto, 2009).

Baixas concentrações salinas promovem a entrada de água nas células para equilibrar a diferença de concentração entre os meios intra- e extracelular. Se entrar muita água e o ganho de volume pela célula for muito grande, a membrana não suporta e se rompe (Gouvêa-E-Silva, 2006; Arvelos, 2007).

Os eritrócitos, também chamados de hemácias ou glóbulos vermelhos, são as unidades morfológicas da série vermelha do sangue. Sua forma discóide e circular com cerca de 8 µm de diâmetro e sua estrutura bicôncava são responsáveis por aumentar sua área, com a finalidade de facilitar tanto o transporte quanto as trocas gasosas, assim como sua flexibilidade, o que favorece a deformabilidade necessária para passar por vasos de pequeno calibre (Smith, Marks *et al.*, 2007). Esta flexibilidade ou

deformabilidade do eritrócito está diretamente relacionada com a fluidez de sua membrana e consequentemente com a sua resistência (Coopper, 1997).

A membrana do eritrócito tornou-se a membrana mais estudada por causa de sua relativa simplicidade, disponibilidade e facilidade de isolamento (Voet e Voet, 2013). Essa célula constitui um bom modelo para estudo da estabilidade de membrana, pois sua *lise* libera hemoglobina, que é facilmente detectada por espectrofotometria (Arvelos, 2007; Penha-Silva, Firmino *et al.*, 2007; De Freitas, Netto Rde *et al.*, 2008; Penha-Silva, Arvelos *et al.*, 2008; De Freitas, De Oliveira *et al.*, 2010; De Freitas, Marquez-Bernardes *et al.*, 2013).

O tempo médio de vida de um eritrócito normal é de 120 dias, e embora os eritrócitos presentes no sangue sejam constantemente renovados, o envelhecimento do indivíduo parece estar associado a mudanças que certamente interferem no comportamento de suas células sanguíneas. Mulheres acima de 60 anos de idade, em comparação com mulheres de 20 a 49 anos de idade, apresentaram um aumento na estabilidade osmótica da membrana de seus eritrócitos em função do aumento da colesterolemia (Penha-Silva, Firmino *et al.*, 2007).

A estabilidade da membrana dos eritrócitos também pode ser afetada pelo estado nutricional e de saúde do indivíduo. Entender os mecanismos pelos quais esse amplo conjunto de variáveis podem afetar a estabilidade de membrana é uma tarefa de mais alta relevância, tanto para a caracterização do estado de saúde quanto de todas as condições que podem afetar essas variáveis.

Essas variáveis incluem os índices hematológicos, especialmente do eritrograma, e também as variáveis bioquímicas utilizadas na avaliação do estado de saúde do indivíduo (De Freitas, De Oliveira *et al.*, 2010; Fonseca, Arvelos *et al.*, 2010; Lemos, Marquez-Bernardes *et al.*, 2011; Bernardino Neto, De Avelar Jr. *et al.*, 2013; De Arvelos, Rocha *et al.*, 2013).

A estabilidade osmótica de eritrócitos é influenciada por fatores tais como o volume, tamanho e forma da célula, tipo e quantidade de hemoglobina, viscoelasticidade, composição química e estrutural da membrana (Perk, Frei *et al.*, 1964). O índice hematológico que tem uma relação mais ampla com todos estes fatores é o RDW. Esta é certamente a razão pela qual a estabilidade da membrana dos eritrócitos foi associada a este índice hematológico (Bernardino Neto, De Avelar Jr. *et al.*, 2013; De Arvelos, Rocha *et al.*, 2013; De Freitas, Marquez-Bernardes *et al.*, 2013; Mascarenhas Netto, Fabbri *et al.*, 2014), o que é muito significativo, uma vez que o

RDW tem uma capacidade preditiva do risco de morte por doença cardiovascular (Patel, Semba *et al.*, 2010; Nishizaki, Yamagami *et al.*, 2012; Tziakas, Chalikias *et al.*, 2012; Batool, Wang *et al.*, 2013) e diabetes (Cauthen, Tong *et al.*, 2012; Malandrino, Wu *et al.*, 2012).

As variáveis bioquímicas incluem os níveis de colesterol no sangue. O colesterol é um componente estrutural das membranas celulares, que são extremamente sensíveis às mudanças no perfil lipídico (Cooper, 1977; Dwight, Mendes Ribeiro *et al.*, 1996; Caliskan, Caliskan *et al.*, 2000; Uyuklu, Meiselman *et al.*, 2007; Tziakas, Chalikias *et al.*, 2009). O colesterol plasmático pode ser dirigido para a membrana de eritrócitos (Martinez, Vaya *et al.*, 1996), o que diminui a sua fluidez (Cooper, 1977; Muller, Ziegler *et al.*, 1990; Dwight, Mendes Ribeiro *et al.*, 1996) e altera as propriedades funcionais da célula e as características reológicas do sangue (Chabanel, Flamm *et al.*, 1983; Koter, Broncel *et al.*, 2002).

O colesterol é um constituinte essencial das membranas biológicas (Murray e Granner, 2012; Voet e Voet, 2013). Ele é sintetizado em muitos tecidos do corpo a partir de acetil-CoA, e seu excesso é eliminado na bile, sob a forma de colesterol ou sais biliares. Cerca da metade do colesterol do organismo é obtido com a alimentação e a outra metade é obtida através de síntese endógena (colesterologênese) (Botham e Mayes, 2012). Apesar de essencial, sua deposição excessiva na parede das artérias está associada às doenças cérebro-cárdio-vasculares (Botham e Mayes, 2012; Voet e Voet, 2013).

Por ser insolúvel em água, o colesterol só consegue ser transportado na corrente sanguínea se estiver conjugado a lipoproteínas plasmáticas, cujos quatro tipos principais são quilomícrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (Botham e Mayes, 2012; Nelson e Cox, 2012; Voet e Voet, 2013).

O excesso de colesterol no sangue, que é um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (Bernstein, 1985; Gotto e Ahrens, 1985), também tem sido associado com alterações na estabilidade de membrana do eritrócito (De Freitas, De Oliveira *et al.*, 2010; Bernardino Neto, De Avelar Jr. *et al.*, 2013; De Arvelos, Rocha *et al.*, 2013; De Freitas, Marquez-Bernardes *et al.*, 2013). Certamente esta alteração está associada com o teor de colesterol na membrana dessa célula, uma vez que a RDW foi associada ao teor de colesterol na membrana do eritrócito (Tziakas, Chalikias *et al.*, 2012).

A hipercolesterolemia é um dos fatores de risco para a ocorrência de um acidente vascular cerebral (AVC) que está entre as condições mais letais do mundo, atingindo anualmente 16 milhões de pessoas, das quais seis milhões vão a óbito, representando 38% dos óbitos de toda população e constituindo o primeiro lugar no ranking geral de óbitos. Só no Brasil o número anual de vítimas fatais por AVC chega a quase 100 mil pessoas; foram 84.713 no ano 2000 e 99.726 em 2010. Atualmente, esta doença é a principal causa de mortes registradas no país (Portal-Da-Saúde, 2012).

A hipercolesterolemia pode ser causada por duas irregularidades metabólicas: doença genética, como a hipercolesterolemia familiar, e dieta rica em colesterol (Botham e Mayes, 2012; Voet e Voet, 2013).

Existem várias medidas que podem ser usadas para controlar a colesterolemia de uma pessoa. A intervenção terapêutica consiste na alteração da dieta do paciente, mas se esta ação for insuficiente, podem ser utilizados medicamentos, conjuntamente com o controle dietético e a correção de outros fatores de risco (Rang, Dale *et al.*, 2003; Flórez, Armijo *et al.*, 2004).

Quanto aos medicamentos, as estatinas estão entre as principais classes de medicamentos utilizadas clinicamente (Rang, Dale *et al.*, 2003). Estudos mostram que as estatinas reduzem significativamente os níveis plasmáticos do colesterol total e do LDL-colesterol (Flórez, Armijo *et al.*, 2004; Jorge, Almeida *et al.*, 2005). Os primeiros efeitos são detectados logo na primeira semana, entretanto, o efeito máximo é atingido entre 4 e 6 semanas após o início do tratamento (Flórez, Armijo *et al.*, 2004).

Diversos estudos clínicos, controlados por placebo, demonstraram a eficácia das estatinas e demonstram que todas as estatinas reduzem o LDL-colesterol não menos que 20-35% e essa redução pode chegar a até 60% dependendo da dose (Rang, Dale *et al.*, 2003; Flórez, Armijo *et al.*, 2004). Estudos mostram ainda que não há grandes diferenças entre o poder das diferentes estatinas (Jorge, Almeida *et al.*, 2005).

Pesquisar os vínculos existentes entre os níveis sanguíneos de colesterol com o comportamento de membranas, sob a ação de estatinas, que sabidamente declinam os níveis de colesterol sanguíneo, poderá dar uma contribuição significativa sobre as inter-relações entre fatores de risco para a aterosclerose.

As correlações entre a estabilidade da membrana do eritrócito e os índices hematológicos e bioquímicos têm sido estudadas na população em geral e em populações específicas sujeitas a grandes variações nos índices hematológicos e/ou variáveis bioquímicas (Bernardino Neto, De Avelar Jr. *et al.*, 2013; De Arvelos, Rocha

et al., 2013; De Freitas, Marquez-Bernardes *et al.*, 2013; Mascarenhas Netto, Fabbri *et al.*, 2014).

Este tipo de estudo requer uma grande quantidade de observações, que, obtidas a partir de uma população composta de menor número de indivíduos em um estudo pareado, permitem minimizar os efeitos das variáveis moduladoras externas. A redução do impacto de variáveis potencialmente moduladoras permite uma maior segurança para fazer inferências sobre a população em estudo.

A abordagem deste tema na população em geral mostrou que os índices hematológicos têm uma influência maior do que as variáveis bioquímicas sobre a estabilidade da membrana do eritrócito, porque eles podem manifestar, de forma direta, as suas influências sobre o comportamento dos eritrócitos (Bernardino Neto, De Avelar Jr. *et al.*, 2013).

O estudo das inter-relações entre a estabilidade de eritrócitos e índices hematológicos e bioquímicos em uma população de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, utilizando os resultados obtidos ao longo de oito semanas após a intervenção, também mostrou a maior influência das variáveis hematológicas na estabilidade da membrana do eritrócito (De Arvelos, Rocha *et al.*, 2013). Como a cirurgia bariátrica tem um profundo efeito não apenas sobre variáveis bioquímicas do sangue, mas também nos índices hematológicos (Custodio Afonso Rocha, Ramos De Arvelos *et al.*, 2012), seria interessante analisar a influência de um procedimento que tem uma maior influência sobre variáveis bioquímicas.

O desenho do presente estudo apresenta uma situação em que os indivíduos estão sujeitos a uma grande variação dos seus índices bioquímicos, particularmente dos níveis de colesterol no sangue, como resultado da terapia com estatina. Assim, a variância nos lipídeos sanguíneos gerada em uma pequena população, mas analisada em vários momentos diferentes, permite a expansão da população com uma menor variabilidade inter-individual. É dentro deste contexto que os resultados deste estudo devem ser considerados.

Uma vez que a composição e o comportamento de eritrócitos estão sob a influência de fatores que também afetam outras células do sangue, é possível que as alterações nestas células também possam ser refletidas no comportamento dos eritrócitos. Foi neste sentido que ao presente estudo também foi adicionada uma variável que pode ser derivada a partir do leucograma, a proporção de neutrófilos/linfócitos (N/L), que tem uma relação conhecida com a inflamação (Horne, Anderson *et*

al., 2005; Patel, Ferrucci *et al.*, 2009; Perlstein, Weuve *et al.*, 2009; Muhmmmed Suliman, Bahnacy Juma *et al.*, 2010; Van Kimmenade, Mohammed *et al.*, 2010; Zalawadiya, Zmily *et al.*, 2011; Alkhouri, Morris-Stiff *et al.*, 2012), fator envolvido tanto na etiologia quanto no prognóstico de doenças cardiovasculares. A inclusão dessa variável faz sentido, pois as estatinas, que são amplamente utilizadas devido às suas propriedades hipolipidemiantes (Blum, 1994; Martinez, Vaya *et al.*, 1996; Sacks, Pfeffer *et al.*, 1996; Corsini, Bellosta *et al.*, 1999; Kolovou, Katerina *et al.*, 2008; Nassief e Marsh, 2008; Wang, Liu *et al.*, 2008), também têm uma reconhecida ação anti-inflamatória (Farnier e Davignon, 1998; Corsini, Bellosta *et al.*, 1999; Blanco-Colio, Tunon *et al.*, 2003; Laws, Spark *et al.*, 2004; Kinlay, 2005; Endres, 2006; Kolovou, Katerina *et al.*, 2008; Wang, Liu *et al.*, 2008).

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi pesquisar as correlações existentes entre estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos e índices lipídicos e hematológicos de pacientes hipercolesterolêmicos submetidos a tratamento com estatinas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

População

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo 192/07). A população estudada consistiu em um total de 19 participantes, sendo 13 mulheres e 6 homens, com média de idade de 43.4 ± 10.7 anos. Os pacientes foram tratados com doses que variaram de 10 a 40 mg/dia de estatinas. Todas as análises consideradas neste estudo foram feitas antes do início do tratamento e após 15, 30, 45 e 60 dias de tratamento. Os critérios de exclusão foram o uso de medicamentos que afetariam o metabolismo lipídico e o abandono do tratamento com estatinas.

Coletas de sangue

Após jejum noturno (8-12h), amostras de sangue (4 mL) foram coletadas por punção venosa em tubo evacuado (Vacutainer®, Becton Dickinson, Juiz de Fora, Brasil) contendo 1,8 mg/mL K₃EDTA (para determinação de hemograma e avaliação da estabilidade da membrana dos eritrócitos) e em dois tubos sem anticoagulante (para determinação de vitaminas do complexo B e as variáveis bioquímicas).

Determinação das variáveis hematológicas e bioquímicas

Os hemogramas foram obtidos utilizando um sistema automatizado de análises (Cell-Dyn 3700, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL) e os perfis lipídicos obtidos com um analisador bioquímico automático (Architect C 8000, Abbott Diagnósticos).

Os valores de referência foram: eritrócitos (RBC) (mulheres, $4.1-5.1 \times 10^6/\text{mm}^3$; homens $4.5-5.3 \times 10^6/\text{mm}^3$), hemoglobina (Hb) (mulheres, 12-16 g%; homens, 13-16 g%), hematócrito (Ht) (mulheres, 36-46%; homens, 37-49%), volume corpuscular médio (MCV) (mulheres, 78-102 fL; homens, 78-98 fL), hemoglobina corpuscular média (MCH) (25-45 pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) (31-36%), variação de volume das células vermelhas (RDW) (11.5-15.5%), colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (baixo ≤ 35 mg/dL; bom ≥ 35 mg/dL), colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) (ótimo < 100 mg/dL; alto > 160 mg/dL), colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C) (< 40 mg/dL), colesterol total (t-C) (ótimo < 200 mg/d; alto ≥ 239 mg/dL), triglicérides (TG) (ótimo < 150 ; alto > 200 mg/dL), linfócitos (Lym) (20-45%), neutrófilos (NEU) (40-80%),

alanina aminotransferase (ALT) (0-32 U/L), aspartato aminotransferase (AST) (0-32 U/L), ácido fólico (B₉) (4.2-19.9 ng/mL), cobalamina (B₁₂) (197-866 ng/mL).

Avaliação da estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos

A estabilidade osmótica dos eritrócitos foi feita utilizando o teste de fragilidade osmótica. Tubos em duplicata (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), contendo 1.5 mL de 0.1-0.9 g.dL⁻¹ NaCl, foram pré-incubados por 10 min a 37 °C em banho termostatizado de água (Marconi®, modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil) e depois da adição de 10 µL de sangue total, eles foram homogeneizados e novamente incubados durante 30 min a 37 °C. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 1600 x *g* por 10 min em centrífuga Hitachi Koki® (modelo CF15RXII, Hitachinaka, Japão) e seus sobrenadantes foram submetidos a leitura de absorvância a 540 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu®, modelo UV1650TC, Japão).

A dependência entre a absorvância a 540 nm (A_{540}) e a concentração de NaCl (X) foi ajustada para uma linha de regressão sigmoidal de acordo com a equação de Boltzmann (Figura 1):

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

onde $A_{\min}$ e $A_{\max}$ representam respectivamente os valores médios de A_{540} nos platôs mínimo e o máximo da sigmóide; H_{50} é a concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise e dX é a variação na concentração de NaCl responsável pela lise completa dos eritrócitos.

A estabilidade osmótica dos eritrócitos foi apropriadamente expressa pelos valores de $1/H_{50}$ e dX , uma que vez que ambos apresentam relações diretas com a estabilidade osmótica da membrana de eritrócitos.

Análises estatísticas

A existência de distribuição normal dos dados foi avaliada pelo uso do teste de D'Agostino-Pearson. As comparações dos dados experimentais entre os cinco momentos do estudo foram feitas utilizando ANOVA, com pós-teste de Tukey, para os dados que apresentaram distribuição normal, e Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para dados que não apresentaram distribuição normal. As correlações bivariadas lineares entre os parâmetros de estabilidade e as variáveis hematológicas e bioquímicas foram consideradas significantes quando p foi menor que 0,05. Todas as análises foram realizadas com a ajuda do software OriginPro 9 (MicroCal®, Northampton, MA, EUA).

Os resultados também foram avaliados por análise de correlação canônica (CC), com o uso do software Genes (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil). A CC é um método multivariado de análise de dados que busca verificar a existência e a intensidade das correlações entre os grupos de variáveis. As correlações canônicas foram avaliadas utilizando cargas e pesos canônicos. Quanto maior a magnitude dos pesos canônicos dos parâmetros que constituem o grupo de variáveis independentes (aqui consideradas como as variáveis hematológicas e bioquímicas), mais fortes são as correlações entre estas variáveis e as variáveis que constituem o grupo de variáveis dependentes (aqui consideradas os parâmetros de estabilidade $1/H_{50}$ e dX). Variáveis cujos pesos apresentam o mesmo sinal têm correlações diretas, mas aquelas cujos pesos apresentam sinais opostos tem correlações inversas. As cargas canônicas podem ser interpretadas como cargas fatoriais, de tal modo que quanto maior a magnitude da carga canônica de uma variável, maior é a comunalidade (variância compartilhada) entre esta variável e a variável estatística canônica. Por meio das cargas canônicas, é possível avaliar a contribuição relativa de cada uma das variáveis individuais em cada função canônica.

4. RESULTADOS

As coletas de sangue foram realizadas em um total de 39 pacientes, dos quais 8 tiveram apenas uma coleta, 2 tiveram duas coletas, 5 tiveram 4 coletas e 24 tiveram 5 coletas cada, totalizando 152 coletas de sangue, das quais apenas 90 coletas foram consideradas para este estudo. As demais coletas foram excluídas, pois em algum momento do estudo o paciente deixou de tomar a estatina.

A Tabela 1 mostra os parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estabilidade em cinco diferentes momentos do tratamento com estatinas (antes e depois de 15, 30, 45 e 60 dias de tratamento). Os níveis de LDL-C apresentaram reduções significantes no segundo e quarto momentos de estudo, enquanto que t-C e a relação N/L diminuíram significantemente em todos os quatro momentos após o início do tratamento. O índice hematológico RDW apresentou uma diminuição limítrofe na última fase do período de oito semanas consideradas neste estudo.

A Tabela 2 mostra os parâmetros hematológicos e bioquímicos que se correlacionaram com pelo menos um dos parâmetros de estabilidade. Com exceção do RDW e da relação N/L, os parâmetros hematológicos mostraram correlações negativas com $1/H_{50}$ e/ou dX. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os níveis de HDL-C, LDL-C e t-C apresentaram correlações positivas com $1/H_{50}$ e/ou dX.

A Tabela 3 mostra os resultados da análise de correlações canônicas entre o grupo de parâmetros de estabilidade e do grupo formado pelos índices hematológicos (grupo 1) que apresentaram correlação significativa bivariada com pelo menos um dos parâmetros de estabilidade (Tabela 2). A maior carga canônica obtida para dX indica que este é o parâmetro de estabilidade que mais contribui para o grupo de variáveis dependentes, ou seja, dX é a variável mais importante na derivação de variável canônica que representa o grupo de variáveis dependentes. Por outro lado, o alto valor da carga canônica obtida para a hemoglobina (Hb) indica que a Hb é o índice hematológico que mais contribui para o grupo de variáveis independentes, ou seja, é a variável mais importante na derivação da variável canônica que representa o grupo de variáveis independentes deste grupo. Com exceção do RDW, todos os índices hematológicos mostraram correlação inversa com os parâmetros de estabilidade.

A Tabela 4 mostra os resultados da análise de correlação canônica entre as variáveis de estabilidade e os parâmetros bioquímicos (grupo 2) que apresentaram uma correlação bivariada significativa com pelo menos um dos parâmetros de estabilidade

(Tabela 2). A maior carga canônica obtida para $1/H_{50}$ indica que esta variável é o parâmetro de estabilidade que mais contribui para o grupo de variáveis dependentes neste modelo. Por outro lado, o alto valor da carga canônica obtida para o LDL-C indica que esta variável é o parâmetro bioquímico mais importante no cálculo da variável canônica que representa o conjunto de variáveis independentes deste grupo. As variáveis lipídicas deste grupo apresentaram correlações diretas com as variáveis de estabilidade.

Tabela 1. Comparação de parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estabilidade dos voluntários nos 5 diferentes momentos do estudo

Variáveis	Mediana (Desvio Interquartilico)				
	1 ^o n = 19	2 ^o n = 19	3 ^o n = 19	4 ^o n = 19	5 ^o n = 14
1/H ₅₀ *	2,200 (0,104)	2,136 (0,140)	2,195 (0,087)	2,159 (0,056)	2,182 (0,122)
dX	0,015 (0,007)	0,014 (0,003)	0,013 (0,004)	0,015 (0,002)	0,015 (0,002)
dX/H ₅₀	0,033 (0,018)	0,031 (0,009)	0,029 (0,010)	0,034 (0,005)	0,033 (0,057)
A ₁ (ΔOD)	0,927 (0,133)	0,832 (0,110)	0,842 (0,114)	0,869 (0,107)	0,883 (0,107)
A ₂ (ΔOD)	0,006 (0,013)	0,004 (0,008)	0,004 (0,007)	0,002 (0,007)	0,001 (0,004)
Hb (g/dL)*	14,7 (1,5)	14,4 (1,9)	14,4 (1,7)	14,7 (1,6)	14,0 (2)
Ht (%)*	45,2 (4,3)	44,4 (5,6)	43,9 (3)	44,1 (3,5)	42,3 (4,9)
RBC (x10 ⁶ /μL)*	4,91 (0,58)	4,86 (0,6)	4,94 (0,6)	4,93 (0,27)	4,88 (0,64)
MCV (fL)*	92,4 (7,5)	92,5 (5,8)	90,5 (7,7)	89,7 (6,3)	89,2 (4,7)
RDW (%)	14,2 (4,5)	12 (3,9)	12 (3)	12 (2)	11,5 (1) [‡]
MCH (pg)*	30 (1,8)	30,1 (1,5)	29,8 (2,8)	30,2 (2,1)	30,05 (3,5)
MCHC (g/dL)	32,5 (1,6)	32,2 (1,5)	32,7 (1,8)	32,9 (1,7)	33,15 (2,3)
Plt (x10 ³ /μL)*	266 (51)	241 (49)	244 (28)	237 (63)	236 (59)
Glu (mg/dL)	82 (23,4)	86 (16)	86 (11)	84,5 (20)	82 (11)
HSA (g/dL)	4,45 (0,3)	4,4 (0,29)	4,4 (0,37)	4,43 (0,44)	4,4 (0,37)
TG (mg/dL)	225 (158)	185 (198)	190 (151)	162 (172)	182 (137)
VLDL-C (mg/dL)	45 (31,6)	37 (39,6)	38 (30,2)	32,4 (34,4)	35,8 (18)
LDL-C (mg/dL)	128,9 (44,9)	82,4 (19,8) [§]	81,8 (50,9) [‡]	90,5 (44,5) [§]	87,1 (38)
HDL-C (mg/dL)	54 (19,4)	57,8 (19,4)	55,6 (24,3)	56,8 (26,7)	55,5 (15)
t-C (mg/dL)	237 (31)	185 (45) [§]	183 (59) [§]	175 (47) [§]	185 (35) [§]
WBC (x10 ³ /μL)	6,2 (2,3)	6,8 (2,1)	6,1 (2,6)	6,8 (1,8)	6,75 (2,5)
LYM (%)	37 (12,1)	37 (9,8)	37 (7)	36 (10)	33,5 (8)
NEU (%)	50 (9)	54,8 (10,4)	51 (8)	51 (14)	53 (13)
N/L	1,33 (0,61)	0,69 (0,31) [§]	0,74 (0,24) [§]	0,68 (0,28) [§]	0,63 (0,28) [§]
AST (U/L)	20,5 (9)	20 (8)	20 (6)	21,5 (8)	21 (6)
ALT (U/L)	22 (14)	22 (18)	19 (19)	22,5 (11)	20 (12)
LDH (U/L)	197,5 (50)	197 (33)	206 (53)	199,5 (45)	211 (44)
CPK (U/L)	103 (71)	138 (181)	123,5 (85)	130 (143)	151 (101)
CK-MB (U/L)	15,35 (8,2)	17,2 (8,8)	16,2 (6,6)	17,2 (8)	18,1 (7,7)
B9 (ng/mL)	10,2 (5,3)	9,6 (3,7)	10,2 (3,4)	11,3 (4,2)	10,05 (3,4)
B12 (ng/mL)	416,7 (335,3)	461,5 (289,3)	421 (214,4)	383,3 (232,1)	443,5 (176)

*Parâmetros com distribuição normal (teste de D'Agostino-Pearson)

§Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) e [‡]diferença limítrofe em comparação com o 1^o momento do estudo (ANOVA com pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal; Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para dados sem distribuição normal)

Tabela 2. Matriz de coeficientes de correlação de Spearman (ρ) entre os pares de variáveis estudadas (n=90)

	1/H ₅₀	dX	Hb	Ht	RBC	MCV	RDW	MCH	MCHC	N/L	AST	ALT	HDL-C	LDL-C	t-C	B ₉	B ₁₂
1/H ₅₀	1.000																
dX	0.238*	1.000															
Hb	-0.282*	-0.381*	1.000														
Ht	-0.378*	-0.255*	0.860*	1.000													
RBC	-0.378*	-0.158	0.628*	0.753*	1.000												
MCV	0.140	0.040	0.065	0.061	-0.540*	1.000											
RDW	-0.082	0.283*	-0.109	0.133	0.017	0.281*	1.000										
MCH	0.145	-0.165	0.344*	0.056	-0.423*	0.765*	-0.102	1.000									
MCHC	0.052	-0.394*	0.510*	0.056	0.010	0.000	-0.560*	0.582*	1.000								
N/L	0.238*	0.163	0.080	0.155	0.053	0.232*	0.217*	0.043	-0.090	1.000							
AST	-0.130	-0.212*	0.269*	0.248*	0.292*	-0.158	-0.062	-0.042	0.115	-0.244*	1.000						
ALT	-0.093	-0.317*	0.391*	0.354*	0.333*	-0.149	-0.175	0.023	0.225*	-0.212*	0.761*	1.000					
HDL-C	0.187§	0.282*	-0.393*	-0.316*	-0.264*	0.113	0.151	-0.096	-0.323*	0.294*	-0.412*	-0.514*	1.000				
LDL-C	0.517*	0.263*	-0.143	-0.156	-0.307*	0.266*	0.061	0.171	-0.095	0.180	-0.206§	-0.259*	0.220*	1.000			
t-C	0.375*	0.177§	0.089	0.034	-0.112	0.191§	0.001	0.220*	0.058	0.351*	-0.197§	-0.210*	0.275*	0.691*	1.000		
B ₉	-0.219*	-0.111	0.343*	0.286*	0.183§	0.156	-0.067	0.181§	0.167	0.098	0.086	0.115	-0.313*	-0.025	-0.184§	1.000	
B ₁₂	0.088	0.208*	-0.031	-0.004	0.030	0.076	0.088	-0.031	-0.147	0.130	0.148	0.083	0.017	-0.048	-0.015	0.210*	1.000

*Correlações estatisticamente significantes ($p < 0.05$)§ Correlações limítrofes ($0.05 < p < 0.10$)

Tabela 3. Cargas e pares canônicos determinados entre os parâmetros de estabilidade (1/H₅₀ and dX) e as variáveis do grupo 1

	Pares canônicos	
	Primeiro	Segundo
r	0,5051	0,3926
Significância	<0,0001*	0,0066*
Variáveis dependentes		
1/H ₅₀	0,4787	0,8780
dX	0,9666	-0,2562
Variáveis independentes		
Hb	-0,8280	-0,2360
Ht	-0,6540	-0,6392
RBC	-0,4803	-0,7587
RDW	0,1454	0,3055
MCHC	-0,6777	0,6257

Hb, hemoglobina; Ht, hematócrito; RBC, células vermelhas do sangue; RDW, distribuição de volumes das células vermelhas do sangue; MCHC, concentração de hemoglobina corpuscular média

*p < 0,05 indicando correlações estatisticamente significantes

Table 4. Cargas e pares canônicos determinados entre os parâmetros de estabilidade (1/H₅₀ and dX) e as variáveis do grupo 2

	Pares Canônicos	
	Primeiro	Segundo
r	0,6307	0,3372
Significância	<0,0001*	0,1189
Variáveis dependentes		
1/H ₅₀	0,9167	-0,3996
dX	0,6061	0,7954
Variáveis independentes		
AST	-0,3076	-0,3536
ALT	-0,3282	-0,7154
HDL-C	0,4265	0,4428
LDL-C	0,8427	-0,2210
t-C	0,6022	-0,1968
B ₉	-0,3567	0,0962
B ₁₂	0,2499	0,4195

HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; t-C, colesterol total; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; B₉, vitamina B₉; B₁₂, vitamina B₁₂

*p < 0,05 indica a existência de correlações estatisticamente significantes

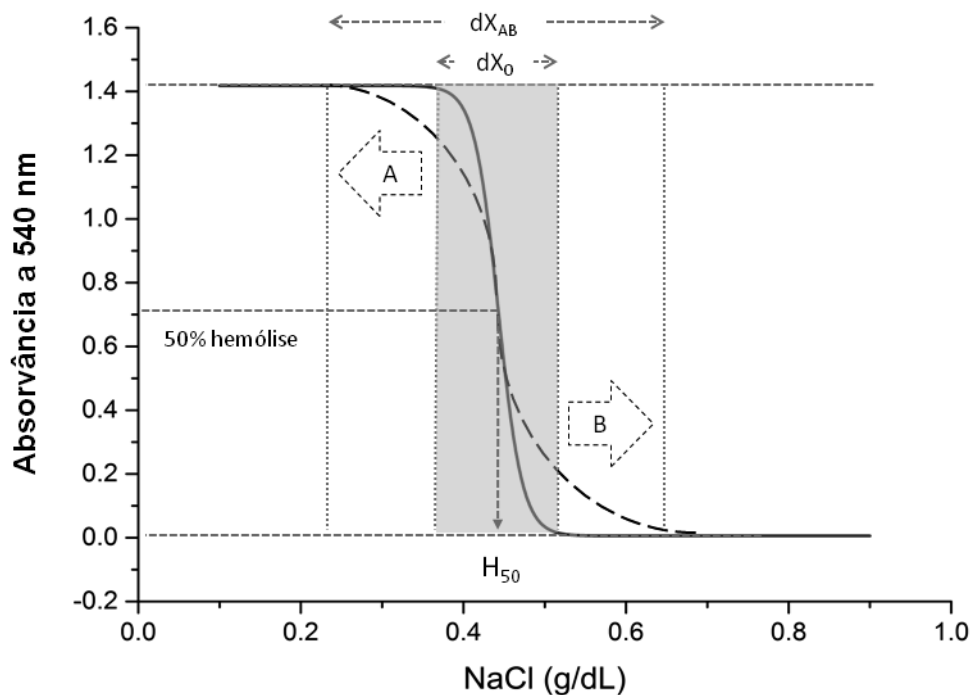


Fig 1. Curva típica de fragilidade osmótica, com ilustração do significado dos parâmetros dX e H_{50} , que apresentam relações direta e inversa, respectivamente, com a estabilidade de membrana do eritrócito. Relações diretas com a estabilidade de eritrócitos podem ser convenientemente estabelecidas com o uso do dX e $1/H_{50}$. Um aumento em dX pode ocorrer com a migração da curva para a esquerda (A), direita (B) ou para ambas direções.

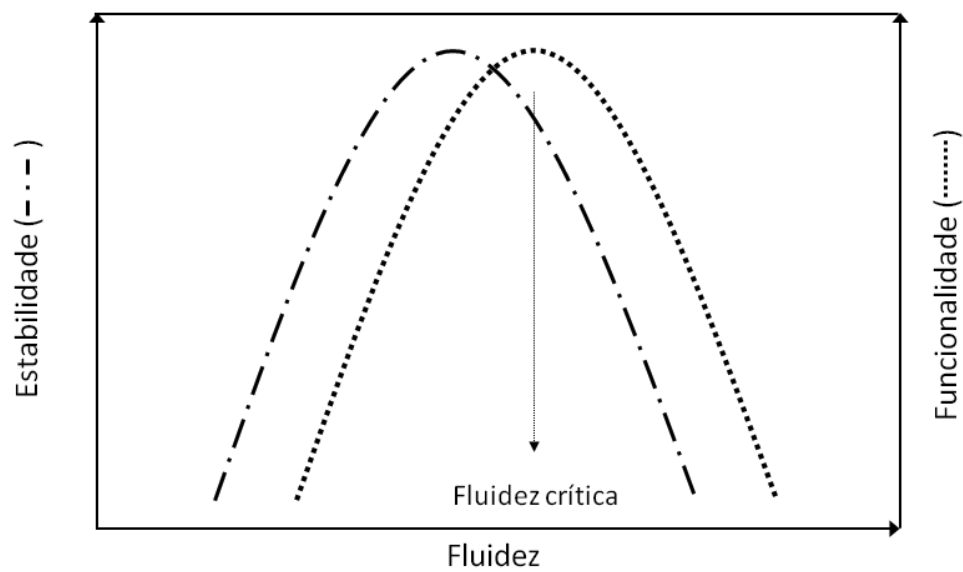


Fig 2. Relação entre estabilidade osmótica e funcionalidade com a fluidez de membrana de um eritrócito. Estabilidade osmótica e funcionalidade não são propriedades coincidentes. A funcionalidade do eritrócito no do meio sanguíneo depende de sua habilidade de se deformar para passar através de capilares de diâmetro muito pequenos. Os eritrócitos podem ser osmoticamente mais estáveis (*in vitro*) com uma menor fluidez, embora possa significar uma maior vulnerabilidade a lise mecânica dentro dos vasos sanguíneos (*in vivo*).

5. DISCUSSÃO

Estabilidade de membrana do eritrócito e níveis sanguíneos de colesterol

Para discutir adequadamente os resultados do presente estudo é necessário ter em mente todos os antagonismos que associam estabilidade e funcionalidade de uma membrana biológica, por um lado, e sua composição lipídica e fluidez, por outro. As relações entre estabilidade e funcionalidade com composição lipídica e fluidez estão longe de serem lineares e coincidentes.

O teor de colesterol na membrana do eritrócito varia de acordo com o nível de LDL-C, devido à difusão de colesterol livre desta lipoproteína para a membrana celular, num processo que constitui um mecanismo importante para controlar sua fluidez (Cooper, Arner *et al.*, 1975; Cooper, 1977; Cooper, Durocher *et al.*, 1977; Cooper, Leslie *et al.*, 1978; Meurs, Hoekstra *et al.*, 2005). Na medida em que esta inclusão de colesterol na membrana contribui para alcançar a sua fluidez crítica, este processo leva à estabilização dessas células e, certamente, a um aumento de seu tempo de permanência no sangue, com o consequente aumento nas populações de células sanguíneas. A inclusão adicional de colesterol na membrana para um ponto além da fluidez crítica leva a uma estabilização adicional dos eritrócitos, apesar da fluidez crítica estar na região de fluidez onde a membrana atinge o seu pico de funcionalidade. Assim, a membrana pode perder fluidez e torna-se mais rígida com uma maior estabilidade, mas com perda discreta de funcionalidade. Isso acontece porque a estabilidade e a funcionalidade são propriedades que não são necessariamente coincidentes (Fig. 2), como, aliás, ocorre com outros complexos biológicos (Fields, 2001). Assim, um aumento da estabilidade não significa necessariamente uma vantagem, uma vez que não está sempre associada com a fluidez crítica da membrana. A estabilidade dos eritrócitos não tem uma dependência linear contínua com o teor de colesterol na sua membrana celular e, em consequência, com os níveis sanguíneos de LDL-C e colesterol total. Em populações cujos níveis de colesterol são consideravelmente mais elevados, outra implicação da difusão de colesterol na membrana celular se manifestará. Inserção de excesso de colesterol na membrana, muito além do pico de estabilidade, produz um efeito adverso sobre a estabilidade da membrana de eritrócitos. Certamente, este tipo de situação seria a base da ocorrência simultânea de hipercolesterolemia e de anemia “spurr-cell” (Cooper, Leslie *et al.*, 1980) ou anemia hemolítica (Akahane, Furuhashi *et al.*, 1986) em animais experimentais alimentados com uma dieta rica em colesterol. De fato, uma

menor estabilidade de membrana de eritrócitos foi associada a níveis muito elevados de colesterol plasmático em uma população de mulheres com esclerose múltipla, mas após tratamento com estatinas foi observado um aumento significativo na estabilidade de membrana dessas células em decorrência da diminuição do teor de colesterol plasmático (De Freitas, De Oliveira *et al.*, 2010). Isto significa que deve haver um limiar na dependência da estabilidade de membrana de eritrócitos com os níveis de nHDL-C, associado a uma inversão no perfil da dependência da estabilidade de membrana dos eritrócitos com os níveis sanguíneos de nHDL-C (Fig. 2).

Outro aspecto a ser considerado na análise dos resultados do presente estudo é o significado da estabilidade osmótica em relação à estabilidade mecânica dos eritrócitos. Sob as condições controladas de osmolaridade do sangue humano, a estabilidade *in vivo* é mais propriamente relacionada com a estabilidade mecânica. *In vivo*, eritrócitos com membranas menos rígidas apresentam maior deformabilidade e são mais resistentes a estresse mecânico. Com esta maior deformabilidade, o eritrócito é capaz de passar mais facilmente através dos capilares de pequeno diâmetro (Bransky, Korin *et al.*, 2007; Korin, Bransky *et al.*, 2007; Mohandas e Gallagher, 2008). No entanto, *in vitro*, as células com membranas menos rígidas são mais vulneráveis ao aumento da hipotonicidade do meio. Isso acontece porque esses eritrócitos são menos resistentes à expansão do volume que sofrem quando são expostos a um ambiente hipotônico (Cooper, Arner *et al.*, 1975; Lee, Kim *et al.*, 2004).

Quanto aos resultados do presente estudo, foi certamente a diminuição esperada em t-C e LDL-C durante o tratamento com estatinas (Levy, Leibowitz *et al.*, 1992; Broncel, Marczyk *et al.*, 2007) (Tabela 1) que gerou a variabilidade necessária para a detecção da correlação detectada entre essas variáveis e os parâmetros de estabilidade.

As correlações bivariadas positivas entre LDL-C e ambos os parâmetros de estabilidade (dX e 1/H50), bem como entre t-C e 1/H50, sugerem que os voluntários deste estudo tinham níveis de LDL-C e t-C cujo aumento foi ainda associado a um aumento na estabilidade osmótica de eritrócitos. Essa conclusão é fortalecida pelo fato das análises de correlação canônica terem mostrado que LDL-C e t-C, nessa ordem, terem sido as variáveis que tiveram as melhores correlações com as variáveis de estabilidade. Níveis mais altos de LDL-C aumentam o teor de colesterol da membrana e uma membrana de eritrócitos com maior teor de colesterol é mais rígida (Menchaca, Michalek *et al.*, 1998; Vaya, Camara *et al.*, 2010; Fornal, Korbut *et al.*, 2011) e

osmoticamente mais estável, embora uma elevação excessiva no teor de colesterol de membrana venha a favorecer mesmo a lise hipotônica de eritrócitos (Fig. 2).

Estabilidade de membrana do eritrócito e RDW

Entre os vários parâmetros hematológicos avaliados, o RDW foi o único que teve correlação positiva com a estabilidade, e, particularmente, com a variável dX. Como o RDW é um indicador da variabilidade do volume dos eritrócitos (Batool, Wang *et al.*, 2013), isto significa que o aumento da heterogeneidade da população de eritrócitos está associada com a predominância de células osmoticamente mais resistentes.

O parâmetro estabilidade dX, de forma semelhante ao RDW, reflete a variabilidade entre os eritrócitos. No entanto, no caso de dX, a fonte de variabilidade é a estabilidade da membrana de eritrócitos. Eritrócitos menos estáveis são lisados mesmo sob uma menor diminuição da tonicidade do meio, o que desloca a curva de fragilidade osmótica para a direita. Por outro lado, os eritrócitos mais estáveis requerem uma maior hipotonicidade para sofrer lise, o que desloca a curva de estabilidade para a esquerda. O deslocamento da curva de fragilidade concomitantemente para a esquerda, devido ao menor número de células estáveis, e para a direita, na presença de eritrócitos mais estáveis, resultam em um aumento do valor de dX (Fig. 1). Assim, quanto maior for a heterogeneidade na estabilidade osmótica de eritrócitos, maior será o valor de dX.

A relação direta entre o RDW e a estabilidade da membrana, por um lado, e a associação direta de estabilidade da membrana com os níveis sanguíneos de LDL-C, por outro lado, sugerem que o aumento do RDW é devido ao aumento dos níveis de colesterol nesta lipoproteína. Isto faz todo o sentido, à luz do fato de que o aumento do RDW foi associado ao aumento do teor de colesterol na membrana do eritrócito (Tziakas, Chalikias *et al.*, 2008; Tziakas, Chalikias *et al.*, 2012; Lippi, Sanchis-Gomar *et al.*, 2013). É importante destacar que estas correlações são consistentes com a redução com significância limítrofe do RDW no último momento da terapia com estatina (Tabela 1).

Estes resultados indicam que o aumento na estabilidade osmótica de eritrócitos deve ser pelo menos um dos mecanismos das quebras homeostáticas que associam elevados valores de RDW a um mau prognóstico para o paciente em processos inflamatórios (Ozturk, Unal *et al.*, 2013), estresse oxidativo (Semba, Patel *et al.*, 2010), doenças cardiovasculares (Cavusoglu, Chopra *et al.*, 2010; Patel, Semba *et al.*, 2010;

Cauthen, Tong *et al.*, 2012; Tziakas, Chalikias *et al.*, 2012) e diabetes (Malandrino, Wu *et al.*, 2012; Veeranna, Zalawadiya *et al.*, 2012).

Estabilidade de membrana do eritrócito, MCV e vitaminas do complexo B

Embora os valores de MCV não tenham mudado significativamente após o tratamento em comparação com o momento inicial, os valores de MCV mostraram uma correlação positiva com os níveis sanguíneos de LDL-C.

Como os níveis elevados de LDL-C significam maior teor de colesterol na membrana do eritrócito, as alterações no MCV seriam resultado de diferenças no conteúdo de colesterol nesta membrana celular. Isso faz muito sentido, uma vez que elevações de RDW foram associadas com um elevado teor de colesterol na membrana do eritrócito e o RDW representa a variação percentual relativa dos valores de VCM. De fato, a forma que o eritrócito apresenta depende de sua composição de membrana. A troca de anfifílico cônico para um anfifílico cilíndrico na membrana do eritrócito foi associada com alteração na forma bicôncava desta célula para uma estrutura convexa (Christiansson, Kuypers *et al.*, 1985).

As deficiências de vitaminas B₉ e B₁₂ são causas de macrocitose, caracterizadas por aumento do índice hematológico conhecido como MCV. No entanto, não houve correlação significativa entre os valores deste índice hematológico e os níveis sanguíneos daquelas vitaminas. Mas os níveis de vitamina B₁₂ mostraram uma correlação positiva significativa com a variável de estabilidade dX, enquanto a vitamina B₉ apresentou correlação negativa significativa com 1/H₅₀ (Tabela 2). Além disso, é importante notar que os níveis de vitamina B₉ mostraram uma correlação negativa significativa com os níveis de t-C. A existência de correlação negativa entre ácido fólico e LDL-C foi relatado por outros autores (Semmler, Moskau *et al.*, 2010) e atribuída à retenção de ácido fólico na célula, com uma diminuição em seus níveis plasmáticos. Este mecanismo pode explicar a correlação negativa entre B₉ e 1/H₅₀, mas não a correlação positiva entre B₁₂ e dX. A explicação para esta correlação pode estar no fato de que a vitamina B₁₂ contribui para a liberação de eritrócitos maduros e estáveis em detrimento de seus precursores imaturos e menos estáveis.

Estabilidade de membrana de eritrócitos, contagem de RBC e hematócrito

As variáveis de estabilidade osmótica 1/H₅₀ e/ou dX mostraram correlações bivariadas inversas com a contagem de eritrócitos, valores de hematócrito e níveis

sanguíneos de Hb. Estes resultados foram confirmados pela análise de correlação canônica, com dX sendo a variável de estabilidade mais influenciável e Hb, Ht e RBC as variáveis hematológicas que foram mais (negativamente) associadas, nesta ordem, com a estabilidade de membrana do eritrócito. A origem desta associação é o aumento nos níveis de colesterol no sangue, fator que foi associado ao aumento na estabilidade de membrana dos eritrócitos e diminuição na contagem de células vermelhas, hematócrito e níveis sanguíneos de Hb (Tabela 2).

À primeira vista isso pode parecer paradoxal, mas a explicação deste paradoxo está na diferença entre os significados de fragilidade osmótica e fragilidade mecânica. Também é importante lembrar que os níveis iniciais de colesterol no sangue dos participantes deste estudo foram considerados como potencialmente patológicos ou mesmo patológicos, devido ao estabelecimento da terapia com estatina. Isto significa que os níveis sanguíneos de colesterol foram relacionados com teores tão elevados de colesterol na membrana do eritrócito que isto já não significava um impacto positivo sobre a sua funcionalidade, de tal maneira que os eritrócitos, que estavam mais rígidos, eram mais vulneráveis à ruptura mecânica causada pela tensão de cisalhamento ou pela passagem através dos capilares de pequeno diâmetro. Por isso as contagens mais baixas de RBC e os valores mais baixos de hematócrito e dos níveis sanguíneos de Hb, foram associados com o aumento da estabilidade osmótica da membrana do eritrócito. A correlação bivariada negativa observada entre as contagens de glóbulos vermelhos e os níveis de LDL-C reforçam essa constatação.

Estabilidade de membrana dos eritrócitos e relação N/L

A existência de uma associação entre a estabilidade de eritrócitos e a capacidade de prognóstico do RDW em processos inflamatórios, sugeridas pela correlação positiva observada entre dX e RDW, pode ser sustentada pela correlação positiva que foi observada entre $1/H_{50}$ e relação N/L (Tabela 2). Um aumento na relação N/L tem sido usado como um marcador de inflamação para prever a gravidade da doença em pacientes com esteatose, câncer (Halazun, Hardy *et al.*, 2009; Guthrie, Charles *et al.*, 2013; Lee, Oh *et al.*, 2013) e doenças cardíacas (Halazun, Hardy *et al.*, 2009; Guthrie, Charles *et al.*, 2013; Lee, Oh *et al.*, 2013).

A significância observada nesta correlação indica que o comportamento das células vermelhas e brancas do sangue está sob a influência de fatores homeostáticos

comuns e que o comportamento das células vermelhas do sangue expressam de alguma forma as alterações associadas com as células brancas.

Estabilidade de membrana do eritrócito e níveis sanguíneos de AST e ALT

Como a estabilidade osmótica de eritrócitos está associada a níveis sanguíneos de LDL-C, que por sua vez irá influenciar a composição da membrana das células do organismo em geral, certamente, a estabilidade da membrana do eritrócito também irá refletir o comportamento dessas outras células. A estabilidade osmótica pode ser mais estreitamente relacionada com a estabilidade destas células, uma vez que não estaria sujeita a lise por atrito ou passagem através dos vasos sanguíneos, tal como os eritrócitos. E é certamente por isso que a maior estabilidade das células vermelhas do sangue foi negativamente associada com os níveis sanguíneos de AST e ALT.

6. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas neste trabalho são derivadas da variabilidade nas concentrações dos lipídeos séricos promovida pelo tratamento com estatina e pela própria variabilidade da população estudada.

O aumento dos níveis sanguíneos de LDL-C e t-C foram associados positivamente com o aumento da estabilidade osmótica dos eritrócitos, com os níveis sanguíneos de LDL-C sendo a variável que mais influenciou as variáveis de estabilidade.

O RDW foi a única variável hematológica que foi positivamente correlacionada com a estabilidade de eritrócitos, e particularmente com a variável dX. O aumento no RDW é devido à elevação nos valores de MCV causados por níveis sanguíneos elevados de LDL-C.

A estabilidade osmótica de eritrócitos mostrou correlação inversa com a contagem de eritrócitos, com os valores de hematócrito e com os níveis sanguíneos de hemoglobina, em consequência de aumento nos níveis sanguíneos de colesterol até um ponto em que a alta rigidez de membrana tornou as células mais vulneráveis à ruptura mecânica causada pela tensão de cisalhamento ou por sua passagem através dos capilares de pequeno diâmetro.

A maior estabilidade osmótica das células vermelhas do sangue foi negativamente associada com os níveis sanguíneos de ALT e AST, provavelmente porque a estabilidade *in vitro* reflete melhor o comportamento de membrana das células do organismo de uma maneira em geral do que o comportamento *in vivo* dos próprios eritrócitos.

A existência de uma associação entre a estabilidade de eritrócitos e a capacidade de prognóstico da RDW em processos inflamatórios pode ser sustentada pela correlação positiva observada entre $1/H_{50}$ e a relação N/L.

7. REFERÊNCIAS

- Akahane, K., K. Furuhashi, *et al.* Simultaneous occurrence of hypercholesterolemia and hemolytic anemia in rats fed cholesterol diet. Life Sci, v.39, n.6, Aug 11, p.499-505. 1986.
- Alberts, B., D. Brady, *et al.* Fundamentos da Biologia Celular. 2002
- Alberts, B., D. Bray, *et al.* Fundamentos da Biologia Celular. Porto Alegre: Artmed. 2007. 864 p.
- Alkhouiri, N., G. Morris-Stiff, *et al.* Neutrophil to lymphocyte ratio: a new marker for predicting steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Liver Int, v.32, n.2, Feb, p.297-302. 2012.
- Arvelos, L. R. Efeitos do glicerol sobre a dependência térmica da estabilidade de eritrócitos humanos. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil, 2007. 39 p.
- Batool, S., Q. Wang, *et al.* The red cell diameter width distribution, the forgotten haematological parameter for anaemia in the older person. European Geriatric Medicine, v.4, n.1, p.1-4. 2013.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, *et al.* Bioquímica. Rio de Janeiro. 2008
- Bernardino Neto, M., E. B. De Avelar Jr., *et al.* Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. Biorheology, p.(In Press). 2013.
- Bernstein, M. J. Lowering Blood Cholesterol to Prevent Heart-Disease. Jama-Journal of the American Medical Association, v.253, n.14, p.2080-2086. 1985.
- Blanco-Colio, L. M., J. Tunon, *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. Kidney Int, v.63, n.1, Jan, p.12-23. 2003.
- Blum, C. B. Comparison of properties of four inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Am J Cardiol, v.73, n.14, May 26, p.3D-11D. 1994.
- Botham, K. M. e P. A. Mayes. Cholesterol Synthesis, Transport, & Excretion. In: R. K. Murray, D. A. Bender, *et al.* (Ed.). Harper's Illustrated Biochemistry. New York: McGraw Hill, 2012. Cholesterol Synthesis, Transport, & Excretion, p.250-260
- Bransky, A., N. Korin, *et al.* Correlation between erythrocytes deformability and size: a study using a microchannel based cell analyzer. Microvasc Res, v.73, n.1, Jan, p.7-13. 2007.
- Broncel, M., I. Marczyk, *et al.* [Estimation of the correlation between hemostatic parameters and serum lipids in patients with hyperlipidemia type II after simvastatin therapy]. Pol Merkuriusz Lekarski, v.22, n.127, Jan, p.21-4. 2007.
- Caliskan, S., M. Caliskan, *et al.* Effect of simvastatin therapy on blood and tissue ATP levels and erythrocyte membrane lipid composition. Res Exp Med (Berl), v.199, n.4, Feb, p.189-94. 2000.

Cauthen, C. A., W. Tong, *et al.* Progressive rise in red cell distribution width is associated with disease progression in ambulatory patients with chronic heart failure. J Card Fail, v.18, n.2, Feb, p.146-52. 2012.

Cavusoglu, E., V. Chopra, *et al.* Relation between red blood cell distribution width (RDW) and all-cause mortality at two years in an unselected population referred for coronary angiography. Int J Cardiol, v.141, n.2, May 28, p.141-6. 2010.

Chabanel, A., M. Flamm, *et al.* Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. Biophys J, v.44, n.2, Nov, p.171-6. 1983.

Christiansson, A., F. A. Kuypers, *et al.* Lipid molecular shape affects erythrocyte morphology: a study involving replacement of native phosphatidylcholine with different species followed by treatment of cells with sphingomyelinase C or phospholipase A2. J Cell Biol, v.101, n.4, Oct, p.1455-62. 1985.

Cooper, R. A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. N Engl J Med, v.297, n.7, Aug 18, p.371-7. 1977.

Cooper, R. A., E. C. Arner, *et al.* Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. J Clin Invest, v.55, n.1, Jan, p.115-26. 1975.

Cooper, R. A., J. R. Durocher, *et al.* Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. J Clin Invest, v.60, n.1, Jul, p.115-21. 1977.

Cooper, R. A., M. H. Leslie, *et al.* Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid. Biochemistry, v.17, n.2, Jan 24, p.327-31. 1978.

_____. Red cell cholesterol enrichment and spur cell anemia in dogs fed a cholesterol-enriched atherogenic diet. J Lipid Res, v.21, n.8, Nov, p.1082-9. 1980.

Cooper, G. M. The cell surface. In: (Ed.). The cell: A molecular approach. Washington: ASM Press, 1997. The cell surface, p.467-517

Corsini, A., S. Bellosta, *et al.* New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. Pharmacol Ther, v.84, n.3, Dec, p.413-28. 1999.

Custodio Afonso Rocha, V., L. Ramos De Arvelos, *et al.* Evolution of nutritional, hematologic and biochemical changes in obese women during 8 weeks after Roux-en-Y gastric bypass. Nutr Hosp, v.27, n.4, Jul-Aug, p.1134-40. 2012.

De Arvelos, L. R., V. C. Rocha, *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, v.246, n.3, Mar, p.231-42. 2013.

De Freitas, M. V., M. R. De Oliveira, *et al.* Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. J Membr Biol, v.233, n.1-3, Feb, p.127-34. 2010.

De Freitas, M. V., L. F. Marquez-Bernardes, *et al.* Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. Hematology, p.In press. 2013.

De Freitas, M. V., C. Netto Rde, *et al.* Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. Toxicol In Vitro, v.22, n.1, Feb, p.219-24. 2008.

Dwight, J. F., A. C. Mendes Ribeiro, *et al.* Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. Clin Chim Acta, v.256, n.1, Dec 9, p.53-63. 1996.

Endres, M. Statins: potential new indications in inflammatory conditions. Atheroscler Suppl, v.7, n.1, Apr, p.31-5. 2006.

Farnier, M. e J. Davignon. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. Am J Cardiol, v.82, n.4B, Aug 27, p.3J-10J. 1998.

Fields, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.129, n.2-3, Jun, p.417-31. 2001.

Flórez, J., J. A. Armijo, *et al.* Farmacologia Humana. Barcelona. 2004

Fonseca, L. C., L. R. Arvelos, *et al.* Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. J Bioenerg Biomembr, v.42, n.5, Oct, p.413-8. 2010.

Fornal, M., R. A. Korbut, *et al.* Relevance of erythrocyte deformability to the concentration of soluble cell adhesion molecules and glomerular filtration rate in patients with untreated essential hypertension. Clin Hemorheol Microcirc, v.49, n.1-4, p.323-9. 2011.

Gotto, A. e E. H. Ahrens. Lowering Blood Cholesterol to Prevent Heart-Disease. Nutrition Reviews, v.43, n.9, p.283-291. 1985.

Gouvêa-E-Silva, L. F. Caracterização da estabilização de eritrócitos humanos por etanol. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2006. 53 p.

Guthrie, G. J., K. A. Charles, *et al.* The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. Crit Rev Oncol Hematol, v.88, n.1, Oct, p.218-30. 2013.

Halazun, K. J., M. A. Hardy, *et al.* Negative impact of neutrophil-lymphocyte ratio on outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. Ann Surg, v.250, n.1, Jul, p.141-51. 2009.

Horne, B. D., J. L. Anderson, *et al.* Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? J Am Coll Cardiol, v.45, n.10, May 17, p.1638-43. 2005.

Jorge, P. A., E. A. Almeida, *et al.* [Effects of atorvastatin, fluvastatin, pravastatin, and simvastatin on endothelial function, lipid peroxidation, and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits]. Arq Bras Cardiol, v.84, n.4, Apr, p.314-9. 2005.

- Kinlay, S. Potential vascular benefits of statins. Am J Med, v.118 Suppl 12A, Dec, p.62-7. 2005.
- Kolovou, G. D., A. Katerina, *et al.* Simvastatin: two decades in a circle. Cardiovasc Ther, v.26, n.2, Summer, p.166-78. 2008.
- Korin, N., A. Bransky, *et al.* Theoretical model and experimental study of red blood cell (RBC) deformation in microchannels. J Biomech, v.40, n.9, p.2088-95. 2007.
- Koter, M., M. Broncel, *et al.* The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. Eur J Clin Pharmacol, v.58, n.8, Nov, p.501-6. 2002.
- Laws, P. E., J. I. Spark, *et al.* The role of statins in vascular disease. Eur J Vasc Endovasc Surg, v.27, n.1, Jan, p.6-16. 2004.
- Lee, C. Y., K. C. Kim, *et al.* Rheological properties of erythrocytes from male hypercholesterolemia. Microvasc Res, v.67, n.2, Mar, p.133-8. 2004.
- Lee, S., S. Y. Oh, *et al.* Prognostic significance of neutrophil lymphocyte ratio and platelet lymphocyte ratio in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX chemotherapy. BMC Cancer, v.13, p.350. 2013.
- Lemos, G. S., L. F. Marquez-Bernardes, *et al.* Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. Cell Biochem Biophys, v.61, n.3, Dec, p.531-7. 2011.
- Levy, Y., R. Leibowitz, *et al.* Reduction of plasma cholesterol by lovastatin normalizes erythrocyte membrane fluidity in patients with severe hypercholesterolaemia. Br J Clin Pharmacol, v.34, n.5, Nov, p.427-30. 1992.
- Lippi, G., F. Sanchis-Gomar, *et al.* Association of red blood cell distribution width with plasma lipids in a general population of unselected outpatients. Kardiol Pol, v.71, n.9, p.931-6. 2013.
- Malandrino, N., W. C. Wu, *et al.* Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. Diabetologia, v.55, n.1, Jan, p.226-35. 2012.
- Martinez, M., A. Vaya, *et al.* Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. Thromb Res, v.83, n.5, Sep 1, p.375-88. 1996.
- Mascarenhas Netto, R. C. Estabilidade de membrana de eritrócitos em portadores de depressão. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009. 103 p.
- Mascarenhas Netto, R. C., C. Fabbri, *et al.* Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. Parasitology Research, p.In press. 2014.
- Menchaca, H. J., V. N. Michalek, *et al.* Decreased blood oxygen diffusion in hypercholesterolemia. Surgery, v.124, n.4, Oct, p.692-8. 1998.

Meurs, I., M. Hoekstra, *et al.* HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. Exp Hematol, v.33, n.11, Nov, p.1309-19. 2005.

Mohandas, N. e P. G. Gallagher. Red cell membrane: past, present, and future. Blood, v.112, n.10, Nov 15, p.3939-48. 2008.

Muhmmmed Suliman, M. A., A. A. Bahnacy Juma, *et al.* Predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio in outcomes of patients with acute coronary syndrome. Arch Med Res, v.41, n.8, Nov, p.618-22. 2010.

Muller, S., O. Ziegler, *et al.* Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. Atherosclerosis, v.83, n.2-3, Aug, p.231-7. 1990.

Murray, R. K. e D. K. Granner. Membranes: Structure & Function. In: R. K. Murray, D. A. Bender, *et al* (Ed.). Harper's Illustrated Biochemistry. New York: McGraw Hill, 2012. Membranes: Structure & Function, p.459-477

Nassief, A. e J. D. Marsh. Statin therapy for stroke prevention. Stroke, v.39, n.3, Mar, p.1042-1048. 2008.

Nelson, D. L. e M. M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry. New York. 2008

_____. Lehninger Principles of Biochemistry. New York: W. H. Freeman. 2012. 1100 p.

Nishizaki, Y., S. Yamagami, *et al.* Red blood cell distribution width as an effective tool for detecting fatal heart failure in super-elderly patients. Intern Med, v.51, n.17, p.2271-6. 2012.

Ozturk, Z. A., A. Unal, *et al.* Is increased red cell distribution width (RDW) indicating the inflammation in Alzheimer's disease (AD)? Arch Gerontol Geriatr, v.56, n.1, Jan-Feb, p.50-4. 2013.

Patel, K. V., L. Ferrucci, *et al.* Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. Arch Intern Med, v.169, n.5, Mar 9, p.515-23. 2009.

Patel, K. V., R. D. Semba, *et al.* Red cell distribution width and mortality in older adults: a meta-analysis. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v.65, n.3, Mar, p.258-65. 2010.

Penha-Silva, N., L. R. Arvelos, *et al.* Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. Bioelectrochemistry, v.73, n.1, Jun, p.23-9. 2008.

Penha-Silva, N., C. B. Firmino, *et al.* Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. Mech Ageing Dev, v.128, n.7-8, Jul-Aug, p.444-9. 2007.

Perk, K., Y. F. Frei, *et al.* Osmotic Fragility of Red Blood Cells of Young and Mature Domestic and Laboratory Animals. Am J Vet Res, v.25, Jul, p.1241-8. 1964.

Perlstein, T. S., J. Weuve, *et al.* Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort. Arch Intern Med, v.169, n.6, Mar 23, p.588-94. 2009.

Portal-Da-Saúde. Governo alerta para principal causa de morte. Brasil: Ministério da Saúde. 2012 2012.

Rang, H. P., M. M. Dale, *et al.* Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier. 2003. 904 p.

Sacks, F. M., M. A. Pfeffer, *et al.* The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. New England Journal of Medicine, v.335, n.14, Oct 3, p.1001-1009. 1996.

Semba, R. D., K. V. Patel, *et al.* Serum antioxidants and inflammation predict red cell distribution width in older women: the Women's Health and Aging Study I. Clin Nutr, v.29, n.5, Oct, p.600-4. 2010.

Semmler, A., S. Moskau, *et al.* Plasma folate levels are associated with the lipoprotein profile: a retrospective database analysis. Nutr J, v.9, p.31. 2010.

Smith, C., A. D. Marks, *et al.* Bioquímica Medica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica. Porto Alegre: Artmed. 2007

Tziakas, D. N., G. Chalikias, *et al.* Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. Clin Hemorheol Microcirc, v.51, n.4, p.243-54. 2012.

Tziakas, D. N., G. K. Chalikias, *et al.* Cholesterol composition of erythrocyte membranes and its association with clinical presentation of coronary artery disease. Coronary Artery Disease, v.19, n.8, Dec, p.583-590. 2008.

_____. Statin use is associated with a significant reduction in cholesterol content of erythrocyte membranes. A novel pleiotropic effect? Cardiovasc Drugs Ther, v.23, n.6, Dec, p.471-80. 2009.

Uyuklu, M., H. J. Meiselman, *et al.* Effect of decreased plasma cholesterol by atorvastatin treatment on erythrocyte mechanical properties. Clin Hemorheol Microcirc, v.36, n.1, p.25-33. 2007.

Van Kimmenade, R. R., A. A. Mohammed, *et al.* Red blood cell distribution width and 1-year mortality in acute heart failure. Eur J Heart Fail, v.12, n.2, Feb, p.129-36. 2010.

Vaya, A., R. Camara, *et al.* Erythrocyte deformability in morbid obesity before bariatric surgery. Influence of abdominal obesity. Clin Hemorheol Microcirc, v.46, n.4, p.313-20. 2010.

Veeranna, V., S. K. Zalawadiya, *et al.* The association of red cell distribution width with glycated hemoglobin among healthy adults without diabetes mellitus. Cardiology, v.122, n.2, p.129-32. 2012.

Voet, D. e J. G. Voet. Bioquímica. Porto Alegre: Artmed. 2013

Wang, C. Y., P. Y. Liu, *et al.* Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. Trends Mol Med, v.14, n.1, Jan, p.37-44. 2008.

Zalawadiya, S. K., H. Zmily, *et al.* Red Cell Distribution Width and Mortality in Predominantly African-American Population With Decompensated Heart Failure. Journal of Cardiac Failure, v.17, n.4, Apr, p.292-298. 2011.



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2121 - Bloco A - sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3230-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 758/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O ADENDO AO PROTOCOLO REGISTRO
 CEP/UFU 192/07

Projeto Pesquisa: "Influência do uso de estatinas sobre a estabilidade de membranas de eritrócitos em pacientes com hipercolesterolemia".

Pesquisador Responsável: Nilson Penha Silva

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do adendo ao protocolo de pesquisa proposto.

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

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

SITUAÇÃO: ADENDO AO PROTOCOLO APROVADO

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

Uberlândia, 11 de novembro de 2011.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
 Coordenadora do CEP/UFU

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada *“Influência do uso de estatinas sobre a estabilidade de membranas de eritrócitos em pacientes com hipercolesterolemia”*, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. Elmiro Santos Resende, Dr. Nilson Penha Silva, Dr. Carlos Henrique Alves de Rezende, Ana Flávia Mayrink Gonçalves e Oliveira, Valmir de Freitas Costa e Letícia de Ramos Arvelos.

Nesta pesquisa nós estamos buscando estudar os efeitos dos níveis sanguíneos de colesterol e homocisteína sobre a estabilidade de membranas de eritrócitos humanos.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Ana Flávia Mayrink Gonçalves e Oliveira e pelo pesquisador Valmir de Freitas Costa.

Na sua participação você deverá doar amostras de sangue em cinco momentos: no início de seu tratamento e após 15, 30, 45 e 60 dias após início de seu tratamento com estatina. Sendo que em cada dia serão coletados 3 tubos do seu sangue que será analisado no Laboratório Central de Análises Clínicas da UFU e no Laboratório de Biofísicoquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU. Esta coleta será realizada em sua residência ou em outro local indicado por você e também poderá ser feita no Laboratório de Análises Clínicas da UFU mediante sua disponibilidade de ir até lá no dia de coleta. Você deverá estar em jejum nos dias de realização das coletas. O material utilizado na coleta é estéril e descartável, não colocando em risco a sua saúde.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar da pesquisa.

Os riscos consistem em eventualmente ocorrer tontura ou desmaio, associado a algum receio ou susto em face do procedimento, mas caso isso ocorra, você será atendido prontamente. Os benefícios dos resultados da pesquisa poderão trazer informações úteis para a prevenção de doenças degenerativas.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Laboratório de Biofísicoquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720 Bloco 2E, Sala 231, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, CEP 38408-100; telefone 34-3218-2203, ramal 23; ou com os pesquisadores Ana Flávia (9141-7944) ou Valmir (9811-7922). Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres-Humanos, Universidade Federal de Uberlândia, Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica, Uberlândia, MG, CEP 38408-100, telefone 34-32394131.

Uberlândia, ____ de _____ de 201__.

Assinatura do pesquisador

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa