



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS, NÍVEIS SÉRICOS DE LIPÍDEOS E VARIÁVEIS HEMATIMÉTRICAS

Estudante: Morun Bernardino Neto

UBERLÂNDIA, MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS, NÍVEIS SÉRICOS DE LIPÍDEOS E VARIÁVEIS HEMATIMÉTRICAS

Estudante: Morun Bernardino Neto

Orientador: Nilson Penha-Silva

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área de Bioquímica)

UBERLÂNDIA, MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B523o Bernardino Neto, Morun, 1974-
Análise de correlações entre estabilidade de membrana de eritrócitos, níveis séricos de lipídeos e variáveis hematimétricas / Morun Bernardino Neto. -- 2011.
100 f. : il.

Orientador: Nilson Penha-Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

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

CDU: 576.314



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS, NÍVEIS SÉRICOS DE LIPÍDEOS E VARIÁVEIS HEMATIMÉTRICAS

Estudante: **Morun Bernardino Neto**

COMISSÃO EXAMINADORA

Examinador (T): Professor Dr. Nilson Penha-Silva (Presidente)	[UFU]
Examinador (T): Professor Dr. Antonio Vicente Mundim	[UFU]
Examinador (T): Professora Dra. Celene Maria de Olivera Simões Alves	[UFU]
Examinador (T): Professora Dra. Júnia de Oliveira Costa	[IFTM]
Examinador (T): Professora Dra. Roseli Aparecida da Silva Gomes	[UFTM]

Data da defesa:

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 avós maternos,
Divino Limirio dos Anjos e Nair Rodrigues dos Anjos (*in memorian*);
Aos meus avós paternos,
Morun Bernardino e Jamila Jorge Bernardino (*in memorian*);
Aos meus pais, Roberto Bernardino e Maria Aparecida dos Anjos Bernardino;
Ao meu irmão, Roberto Bernardino Júnior;
À minha esposa, Sandra Martins Santos Bernardino;
Aos meus filhos, Camila Santos Bernardino e Breno Morun Santos Bernardino.
Porque família é tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ensinou que ‘ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine’ e que ‘ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria’ (1 Coríntios 13,1-2);

À Nossa Senhora Aparecida, minha senhora e também minha mãe, que me sustenta no cansaço e me afasta o desânimo;

Aos meus filhos, Breno Morun Santos Bernardino e Camila Santos Bernardino, pela energia que me transmitem no carinho dos seus abraços, por todos nossos momentos juntos que ocupam meus pensamentos e me servem como referência da mais pura expressão de Deus a me mostrar o caminho a ser seguido;

A minha esposa, Sandra Martins Santos Bernardino, pela amabilidade com que sempre cuidou de nossa família e pelas muitas vezes que deixou em segundo plano seus interesses para priorizar os meus;

Aos meus pais, Roberto Bernardino e Maria Aparecida dos Anjos Bernardino, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me corrigindo, sendo amigos, amáveis e rigorosos comigo. Eu não esqueci que me ensinaram a escrever meu próprio nome, que me levaram todos os dias para a escola e ficaram me olhando entrar, não me esqueci da atenção, do carinho e da paciência com que me ensinaram as primeiras tarefas. Vocês fazem parte desse caminho que hoje eu sigo em paz!

Ao meu irmão, Roberto Bernardino Júnior, pelo apoio, pelo estímulo e pelo exemplo como profissional da educação;

Ao meu orientador de doutoramento, Dr. Nilson Penha Silva, que com paciência e compreensão com as minhas dificuldades me orientou em meu mestrado e doutoramento. Agradeço por me ensinar no transcurso desse caminho que o verdadeiro educador prepara seus alunos para serem independentes. Obrigado por me formar pesquisador!

Ao Paulo César Alves de Souza e ao laboratório LABORMED, pela parceria sempre competente e responsável sem a qual não seria possível o desenvolvimento desse trabalho;

Aos amigos do laboratório, Letícia Ramos de Arvelos, Cleine Chagas da Cunha Arvelos, Mário da Silva Garrote Filho, Lúbia Cristina Fonseca, Victor Aguiar de Souza Penha, Thiago Silva Arantes, Isabela Alves Jordão, Elson Braga de Avelar Júnior, Juliana Carla da Costa Huss e Tatiana Maria Theodoro de Souza, pelo agradável ambiente de companheirismo e amizade que construímos juntos no Laboratório de Enzimologia;

Aos professores e amigos, José Maria, Geraldo Barbosa Filho, Marcelo Tavares, Flávio Antônio Brancalhão de Souza, Elson Braga de Avelar e Simone Cristina da Silva, que direta ou indiretamente colaboraram com o sucesso desse trabalho de pesquisa;

Ao amigo Gerson Fraissat Mamede Filho e aos docentes do Instituto de Genética e Bioquímica, agradeço pela minha formação.

SUMÁRIO

	Página
Abreviaturas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Apresentação.....	2
Capítulo 1 [FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA].....	4
Estabilidade de complexos biológicos.....	5
Composição e estrutura das membranas biológicas.....	7
Fluidez e funcionalidade de membranas.....	9
Influência do conteúdo de colesterol na fluidez de membrana.....	11
Conteúdo de colesterol nas membranas de eritrócitos como reflexo do conteúdo de colesterol no plasma.....	12
O equilíbrio dos níveis de colesterol plasmático e de membrana na anemia <i>spur-cell</i>	13
Efeito de alterações na fluidez de membrana na fisiologia celular.....	14
Deformabilidade e estabilidade da membrana eritrocitária.....	16
Os eritrócitos como modelo de estudo da estabilidade de membranas e complexos organizacionais membranosos.....	17
Considerações finais.....	18
Referências.....	23
Capítulo 2 [ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS, NÍVEIS SÉRICOS DE LIPÍDEOS E VARIÁVEIS HEMATIMÉTRICAS].....	35
Resumo.....	36
Abstract.....	37
Introdução.....	38
Material e métodos.....	41
Resultados.....	44
Discussão.....	50
Conclusões.....	60
Referências.....	93

ABREVIATURAS

A ₁	Absorvância com percentual mínimo de hemólise
A ₂	Absorvância com percentual máximo de hemólise
A _{540 nm}	Absorvância em comprimento de onda de 540 nm
ABS	Absorvância
CG	Complexo de Golgi
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Col-T	Colesterol total plasmático
dX	Variação na concentração de NaCl para promover 100% de hemólise
Estado D	Estado desnaturado
Estado N	Estado nativo
Estado R	Estado relaxado, expandido de eritrócitos
Estado T	Estado tenso, compacto de eritrócitos
H ₅₀	Hipotonicidade capaz de provocar 50% de hemólise
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
Ht	Hematócrito
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
RDW	Distribuição de volume das células vermelhas do sangue
RE	Retículo endoplasmático
Salina	Solução de NaCl a 0,9 g/dL ou 9 g/L
SFA	Ácido graxo saturado
UFA	Ácido graxo insaturado
VCM	Volume corpuscular médio
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. Hidratação preferencial de uma proteína nos estados nativo (A) e desnaturado (B)	20
Figura 1.2. Relação entre estabilidade, funcionalidade e fluidez de membrana	21
Figura 1.3. Ajuste sigmoidal da relação entre a absorvância a 540 nm de uma alíquota de sangue humano e a diminuição na concentração de NaCl	22
Figura 2.1 Comparação dos valores de A_1 , A_2 , dX e H_{50} obtidos a partir de eritrócitos conservados por 0, 24 e 48 horas	60
Figura 2.2 Relação entre valores de dX e de VCM dos voluntários	61
Figura 2.3 Relação entre valores de dX e de HCM dos voluntários	62
Figura 2.4 Relação entre valores de dX e de RDW dos voluntários	63
Figura 2.5 Relação entre valores de dX e de Col-T dos voluntários	64
Figura 2.6 Relação entre valores de dX e de LDL-C dos voluntários	65
Figura 2.7 Relação entre valores de H_{50} e de VCM dos voluntários	66
Figura 2.8 Relação entre valores de H_{50} e de HCM dos voluntários	67
Figura 2.9 Relação entre valores de H_{50} e de RDW dos voluntários	68
Figura 2.10 Relação entre valores de H_{50} e de LDL-C dos voluntários	69
Figura 2.11 Relação entre valores de H_{50} e de VLDL-C dos voluntários	70
Figura 2.12 Relação entre valores de H_{50} e de TG dos voluntários	71
Figura 2.13 Relação entre valores de dX/ H_{50} e de VCM dos voluntários	72
Figura 2.14 Relação entre valores de dX/ H_{50} e de HCM dos voluntários	73
Figura 2.15 Relação entre valores de dX/ H_{50} e de RDW dos voluntários	74
Figura 2.16 Relação entre valores de dX/ H_{50} e de Col-T dos voluntários	75
Figura 2.17 Relação entre valores de dX/ H_{50} e de LDL-C dos voluntários	76
Figura 2.18 Relação entre valores de HCM e de VCM dos voluntários	77

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1. Correlações simples entre dX e diversas variáveis hematológicas	78
Tabela 2.2. Correlações simples entre dX e diversas variáveis bioquímicas	79
Tabela 2.3. Correlações simples entre H ₅₀ e diversas variáveis hematológicas	80
Tabela 2.4. Correlações simples entre H ₅₀ e diversas variáveis bioquímicas	81
Tabela 2.5. Correlações simples entre dX/H ₅₀ e diversas variáveis hematológicas	82
Tabela 2.6. Correlações simples entre dX/H ₅₀ e diversas variáveis bioquímicas	83
Tabela 2.7. Sentido das correlações entre parâmetros de estabilidade eritrócitária e diversas variáveis hematológicas e bioquímicas	84
Tabela 2.8. Grupos organizados para análise estatística multivariada: correlações canônicas (grupos 1, 2 e 3) e análise de trilha (grupos 4 e 5)	85
Tabela 2.9. Coeficientes de correlações canônicas entre os pares canônicos estimados para os parâmetros de estabilidade dX e dX/H ₅₀ e as variáveis do grupo 1 (RBC e RDW)	86
Tabela 2.10. Coeficientes de correlações canônicas entre os pares canônicos estimados para os parâmetros de estabilidade dX e dX/H ₅₀ e as variáveis do grupo 2 (Col-T, HDL-C, LDL-C e Glu)	87
Tabela 2.11. Coeficientes de correlações canônicas entre os pares canônicos estimados para os parâmetros de estabilidade dX e dX/H ₅₀ e as variáveis do grupo 3 (Hb, Ht, VCM, HCM e CHCM)	88
Tabela 2.12. Coeficientes de trilha dos efeitos diretos, indiretos (das variáveis do grupo 4) e totais sobre o parâmetro de estabilidade dX/H ₅₀	89
Tabela 2.13. Coeficientes de trilha dos efeitos diretos, indiretos (das variáveis do grupo 5) e totais sobre o parâmetro de estabilidade dX/H ₅₀	90
Tabela 2.14. Coeficientes de trilha dos efeitos diretos, indiretos (via influência de todas as variáveis bioquímicas e hematológicas) e totais sobre os parâmetros de estabilidade dX e H ₅₀ isoladamente	91

APRESENTAÇÃO

As bases teóricas da estabilidade de membranas podem ser estabelecidas a partir dos conhecimentos acumulados sobre a estabilidade de proteínas, o que não significa absolutamente que as proteínas sejam os únicos componentes responsáveis pela determinação da estabilidade de membranas.

A estabilidade de uma membrana pode ser afetada pelos mesmos fatores gerais que afetam a estabilidade de proteínas, tais como pH, temperatura, drogas, solutos estabilizadores e desestabilizadores (caotrópicos), mas também por outros fatores, mais específicos, que compreendem a concentração relativa dos diferentes tipos de lipídeos (fosfoacilgliceróis, esfingolipídeos e colesterol) que compõem as membranas biológicas e a natureza e concentração relativa de todos os solutos dos ambientes extra- e intracelular.

Assim a estabilidade deve ser sensível aos inúmeros fatores hereditários e ambientais que podem afetar a composição e a estrutura da membrana, bem como a composição dos ambientes extra- e intracelular.

O eritrócito é excelente modelo para avaliar a estabilidade de membranas e pode ser obtido de forma pouco invasiva e sem nenhum dano ao paciente. Ele atende bem à preocupação básica do presente trabalho, que é a compreensão da natureza dos fatores ambientais que determinam a estabilidade de membrana.

O ambiente em que o eritrócito se encontra pode ser afetado pela alimentação, atividade física e diversas doenças. Assim, o comportamento do eritrócito deve refletir alterações sanguíneas resultantes da influência desse conjunto de fatores.

As dislipidemias são condições patológicas resultantes da combinação de excesso ou desequilíbrio na alimentação, sedentarismo e defeitos hereditários nos fatores determinantes da homeostase de lipoproteínas plasmáticas. Assim, as dislipidemias devem afetar a composição e o comportamento de membranas como a membrana do eritrócito.

As anemias são também condições patológicas resultantes da combinação de desequilíbrios na alimentação e diferentes tipos de defeitos hereditários que afetam a composição e homeostase do eritrócito.

A estabilidade de membrana do eritrócito deve ter, portanto, relações com a lipídemia e as variáveis hematimétricas.

Entender bem estas relações é uma tarefa de grande significado para a promoção da saúde, pois as hiperlipidemias e as anemias estão associadas a prejuízos na oxigenação

do organismo e consequentemente à morte por infarto, acidente vascular cerebral isquêmico e demência.

O **capítulo 1** desta tese traz uma revisão da literatura sobre o que se sabe até o presente momento sobre a estabilidade de membranas.

O **capítulo 2** traz inicialmente uma avaliação da interferência do tempo após a coleta na estabilidade de membrana de eritrócitos humanos, no intuito de garantir que os estudos de estabilidade de membrana, não estejam sob a influência desse fator externo e possam refletir mais estritamente a influência de variáveis bioquímicas e hematológicas, as quais são avaliadas por análises de correlação simples e posteriormente por análises de correlações multivariadas canônicas e de trilha.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Estabilidade de complexos biológicos

Nos organismos vivos as proteínas podem atuar como elementos de sustentação estrutural, como é o caso das proteínas do citoesqueleto e diversas proteínas de membranas, ou como enzimas, hormônios e anticorpos, dentre outras funções.

Para que possa exercer seu papel biológico a proteína precisa estar no chamado estado nativo (N), que é composto por diversos microestados que correspondem a diferentes conformações em que a proteína é capaz de desempenhar a função para a qual foi produzida. As conformações que correspondem a uma proteína não-funcional compõem o chamado estado desnaturado (D) [TANFORD, 1962; TANFORD, 1963].

Os estados N e D permanecem em um equilíbrio dinâmico. Em meio aquoso, o equilíbrio favorece o estado N, em decorrência da chamada força hidrofóbica, determinada pela aversão dos grupamentos hidrofóbicos à água [TANFORD, 1962]. A força hidrofóbica leva as cadeias laterais hidrofóbicas de aminoácidos a se esconderem no interior anidro da proteína, onde eles se associam por ligações de van der Waals. A proteína assume então uma conformação globular, que apresenta a menor superfície de contato possível com o solvente, o que exige a menor quantidade de energia livre possível para sua hidratação. É por isso que se diz o estado N de uma proteína é o estado de mínima energia livre [TANFORD, 1962; TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989; FONSECA *et al.*, 2006].

O equilíbrio entre os estados N e D pode ser influenciado por fatores extrínsecos como pH, temperatura e solutos caotrópicos (etanol, hidrocloreto de guanidina, uréia) [FONSECA *et al.*, 2006] e osmoestabilizadores (inositol, sorbitol e aminoácidos como taurina e betaína) [MOECKEL *et al.*, 2002], mas também por fatores intrínsecos como a composição em aminoácidos, interações iônicas eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações dissulfeto [NOSOH e SEKIGUCHI, 1990; BRANDEN e TOOZE, 1991].

O aumento da temperatura aumenta a energia vibracional dos átomos e grupamentos que se ligam ou interagem para manter a estrutura terciária da proteína no estado N. Isso resulta no afastamento de tais átomos e grupamentos e, conseqüentemente, no enfraquecimento ou mesmo rompimento da interação entre eles, o que leva a proteína à

desnaturação. Em termos termodinâmicos podemos dizer que o aumento de temperatura leva à redução da estabilidade conformacional da proteína pelo aumento da entropia [COOPER, 1999].

Variações de pH, seja por incremento de íons hidrônio ou hidroxila, deslocarão o equilíbrio iônico dos grupamentos da proteína que são capazes de agir como ácido ou base de Brönsted-Lowry. Esse deslocamento do equilíbrio de Le Chatelier influencia a carga elétrica líquida desses grupamentos e, conseqüentemente, suas interações, podendo enfraquecer forças atrativas estabilizadoras ou até mesmo gerar forças repulsivas desestabilizadoras [TANFORD, 1962; DILL e SHORTLE, 1991; YANG e HONIG, 1992; CHI *et al.*, 2003].

Solutos caotrópicos, como o etanol, exercem efeito desestabilizador, o que favorece transição do estado N para o estado D. O mecanismo pelo qual esses solutos desarranjam a estrutura nativa da proteína ainda é objeto de investigação [NOZAKI e TANFORD, 1963; SCHELLMAN, 1978; TIMASHEFF, 1998; BENNION e DAGGETT, 2003; CAMILLONI *et al.*, 2008; ROSSKY, 2008; ALMARZA *et al.*, 2009]. Ao se misturar com a água, o etanol produz uma mistura na qual as novas ligações de hidrogênio formadas entre água e etanol geram mais estabilidade que as ligações de hidrogênio entre cada uma dessas substâncias entre si, quando não estão misturadas. Isso resulta na inserção de etanol na camada de hidratação gerada em decorrência da força hidrofóbica, o que enfraquece a camada de hidratação e leva a estrutura à desnaturação [WANG, ROBERTSON e BOLEN, 1995].

Segunda a teoria da hidratação preferencial de Timasheff [2002] os osmólitos aumentam a estabilidade de uma proteína porque são excluídos da superfície dessa molécula. Isso acontece porque as forças de atração existentes entre as moléculas de proteína e as de água são mais intensas quando comparadas com as forças atrativas existentes entre as moléculas de proteína e as do osmólito. Assim, na presença do osmólito há hidratação preferencial da proteína e exclusão do osmólito da camada de hidratação da proteína (**Figura 1.1**). O efeito de exclusão do osmólito da camada de hidratação da proteína foi denominado de efeito solvofóbico ou osmofóbico. Como o osmólito compete com a proteína pelas moléculas de água, a presença de um osmólito na solução aquosa de proteína aumenta a energia livre de hidratação da proteína tanto no estado N quanto no estado D.

Como a superfície de contato do estado D é maior que a do estado N, a presença do osmólito eleva mais a energia de hidratação do estado D do que do estado N. Isso significa que a presença do osmólito no meio eleva a barreira de energia entre os estados N e D, de tal forma que a desnaturação da proteína se torna mais difícil na presença do osmólito, pois há uma maior barreira de energia livre entre os dois estados. A maior organização das moléculas de água em torno da superfície externa da proteína também significa diminuição da entropia. Como a área exposta do estado D é maior do que a do estado N, a presença do osmólito diminui mais a entropia associada à hidratação da proteína no estado D que no estado N, de tal forma que isso torna o estado N mais estável do que o estado D. Devido à camada de hidratação, a desnaturação da proteína, com aumento de entropia, resultaria em aumento de energia livre, em função do aumento da superfície da proteína exposta ao solvente, o que faz com que o estado N prevaleça, apesar de o estado D isoladamente apresentar maior entropia [GEKKO e TIMASHEFF, 1981; TIMASHEFF e ARAKAWA, 1989; TIMASHEFF, 1992; LIU e BOLEN, 1995; BASKAKOV e BOLEN, 1998; TIMASHEFF, 2002; FONSECA *et al.*, 2006; ATTRI, VENKATESU e LEE, 2010].

É também possível que esse efeito osmofóbico esteja sob a influência da alteração pelo osmólito de propriedades do solvente como viscosidade e constante dielétrica [TAYLOR *et al.*, 1995; WANG, ROBERTSON e BOLEN, 1995; WANG e BOLEN, 1997; QU, BOLEN e BOLEN, 1998; SAUNDERS *et al.*, 2000; FIELDS, 2001; YANCEY, 2001]. Um aumento na viscosidade do solvente dificulta a ocorrência das transconformações necessárias para a desnaturação da proteína, com aumento da estabilidade.

Composição e estrutura das membranas biológicas

A membrana biológica é estruturalmente organizada em uma bicamada essencialmente lipídica, embora diversas outras moléculas também estejam presentes. No que se refere à hidroafinidade, ela é trilaminar, sendo as lâminas externas de natureza hidrofílica e a lâmina interna de natureza hidrofóbica. Embora a membrana seja composta por diversas classes de lipídeos, os que predominam são os fosfolipídeos, que podem representar até 95% dos lipídeos na membrana [COOPER, 1977], mas há também derivados de

fosfolipídeos como ácidos graxos livres, mono- e di-acil-gliceróis. O colesterol é também um importante lipídeo encontrado nas membranas de células eucarióticas [CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993].

Os fosfolipídeos de membrana podem ser fosfoacilgliceróis (fosfatidatos, plasmalogênios, difosfatidilgliceróis e fosfoinosítídeos) ou esfingolipídeos (ceramidas, esfingomielinas e glicoesfingolipídeos neutros e ácidos). Eles têm cadeias hidrocarbonadas longas que se unem ao glicerol (fosfoacilgliceróis) ou à esfingosina (esfingolipídeos) por ligações do tipo éster (fosfoacilgliceróis) ou amida (esfingolipídeos). Nos plasmalogênio há também uma longa cadeia hidrocarbonada unida ao glicerol por uma ligação do tipo éster [CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993].

A lâmina ou núcleo hidrofóbico da membrana é constituída pelas cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídeos e também pela porção hidrofóbica do colesterol livre. A porção polar dos fosfolipídeos é constituída por um resíduo de fosfato que se encontra esterificado a um grupo hidroxila de um álcool livre (como etanolamina, colina, serina ou glicerol) ou fosforilado (fosfoinosítídeos) ou ainda a açúcares neutros (glicoesfingolipídeos neutros) ou ácidos (glicoesfingolipídeos ácidos, como gangliosídeos e sulfatídeos). Essa porção polar fica exposta aos ambientes externo e interno da membrana, os quais têm em comum o fato de serem de natureza aquosa [CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993].

A aparência trilaminar das membranas biológicas quando vistas em microscopia eletrônica é determinada por um núcleo hidrofóbico radiolúcido (lâmina clara), constituído pelas porções hidrofóbicas de fosfolipídeos e de colesterol livre, e por linhas radiopacas (lâminas escuras), constituídas pelas porções hidrofílicas de fosfolipídeos e de colesterol livre, e localizadas em ambos os lados do núcleo hidrofóbico [MURRAY e GRANNER, 2002].

Proteínas e outros polímeros de aminoácidos também são encontrados distribuídos na membrana de modo irregular e, muitas vezes, conjugadas com carboidratos [DANIELLI e DAVSON, 1935]. As proteínas imersas ou apenas contíguas à membrana estabelecem numerosas forças atrativas de van-der Waals com os fosfolipídeos ao seu redor, mantendo-se unidas a eles [SINGER e NICHOLSON, 1972; CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993].

As proteínas de membrana podem ser intrínsecas, quando estão imersas na estrutura [LAGUE *et al.*, 2001] ou extrínsecas, quando estão projetadas para a superfície interna e/ou externa da membrana [CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993; LAGUE *et al.*, 2001].

As proteínas intrínsecas ou integrais de membrana devem ter um domínio hidrofóbico na região que está em contato com o núcleo apolar da membrana. Já as proteínas extrínsecas ou superficiais não carecem desse tipo de domínio e permanecem ligadas à membrana de modo mais lábil [MURRAY e GRANNER, 2002].

As proteínas podem constituir até 80% da composição das membranas. Um eritrócito, por exemplo, apresenta cerca de vinte tipos de proteínas estruturais importantes além de outras com funções diversas como o transporte de diferentes solutos [STORRY, 2004]. As proteínas estruturais e os lipídeos da membrana estão associadas ao citoesqueleto protéico subjacente por interações proteína-proteína e proteína-lipídeo [BENNETT e STENBUCK, 1979; BRANTON, COHEN e TYLER, 1981; COHEN, 1983; MARCHESI, 1983], que são essenciais para a deformabilidade e estabilidade da membrana [CHASIS e MOHANDAS, 1986].

A composição de uma membrana pode variar de acordo com a função que ela desempenha [STORRY, 2004]. Variações na composição ainda são verificadas quando se analisa as monocamadas interna e externa de uma mesma membrana quanto ao conteúdo lipídico, protéico e glicídico [DI *et al.*, 2006].

Fluidez e funcionalidade de membranas

O núcleo apolar da bicamada lipídica, onde estão localizadas as porções hidrofóbicas dos fosfolipídeos e de outros constituintes da membrana, mostra-se mais fluido que as porções expostas ao ambiente. Essa fluidez é decorrente do fato de as forças de van-der-Waals que unem os lipídeos de membrana entre si e às proteínas, ser limitada e permitir a ocorrência de alguma liberdade de movimentação das estruturas. A composição da membrana é importante para a determinação do grau de fluidez necessário (fluidez

crítica) para o desempenho das funções da membrana [SINGER e NICHOLSON, 1972; MURRAY e GRANNER, 2002].

Diferenças na fluidez podem ser verificadas entre as camadas externa e interna e mesmo entre regiões diferentes de uma mesma camada da membrana [COOPER, 1977]. A existência destas diferenças é fundamentada na existência de diferenças na composição e na movimentação das moléculas por propagação lateral [SINGER, 1974; FRICK, SCHMIDT e NICHOLS, 2007], rotação e/ou translação [GOLDSTEIN, 1984].

O grau de liberdade de movimentação das moléculas depende (1) do número de interações que unem as moléculas entre si, o que está diretamente relacionado com a superfície de contato entre elas, (2) da natureza dessas interações e (3) da massa molecular. A fluidez da membrana varia inversamente com o número de interações intermoleculares (ou da superfície de contato) entre as moléculas que constituem a membrana, pois quanto mais densamente essas moléculas estiverem unidas por forças atrativas, menor será o grau de liberdade que terão. Desse modo, o teor de ácidos graxos saturados (SFA) nos fosfolipídeos leva a menor fluidez da membrana, pois as cadeias hidrocarbonadas longas e lineares se atraem por grande quantidade de forças atrativas de van der Waals. Já as cadeias dos ácidos graxos insaturados (UFA) apresentam um dobramento CIS que diminui sua superfície linear de contato e o número de atrações de van der Waals, o que resulta em maior fluidez [SINGER e NICHOLSON, 1972; CRIBIER, MORROT e ZACHOWSKI, 1993]. Em bactérias, isso é especialmente importante porque os fosfolipídeos são os únicos lipídeos presentes na membrana [COOPER, 1977]. Outro fator importante na mobilidade molecular é a massa. Quanto maior a massa de uma molécula, menor é a sua capacidade de movimentação.

O acúmulo de esteróis na membrana resulta em diminuição da fluidez [TSUDA e NISHIO, 2003]. O núcleo rígido e de grande superfície de contato dos esteróis diminui a liberdade de movimentação das outras moléculas, e resulta em aumento da rigidez da membrana [GARCETTI *et al.*, 2001; MURRAY e GRANNER, 2002].

A fluidez de membrana é essencial para determinação da deformabilidade de células sanguíneas, como os eritrócitos, e do comportamento reológico do sangue. É por isso

que a influência dos lipídeos plasmáticos na reologia do sangue têm sido motivo de muitos estudos [VAYÁ *et al.*, 1993; MARTINEZ *et al.*, 1996; ALOULOU *et al.*, 2006; MAEDA *et al.*, 2006; SEKI *et al.*, 2006; VELCHEVA *et al.*, 2006; ZILBERMAN-KRAVITS *et al.*, 2006].

Influência do conteúdo de colesterol na fluidez de membrana

O colesterol é o mais importante esterol presente nas membranas dos mamíferos. As membranas plasmáticas são as que mostram o maior percentual em peso de colesterol, que pode chegar a 20%. Nas membranas das organelas celulares esse conteúdo é menor, sendo de 3% nas mitocôndrias, 6% nos complexos de Golgi (CG) e 6% nos retículos endoplasmáticos (RE) [JAMIESON e ROBINSON, 1977].

Não só a morfologia, mas também processos como a vesiculação de membrana, dependem do controle da fluidez, que diminui com aumento no teor de colesterol (**Figura 1.2**) [KROES, OSTWALD e KEITH, 1972; VANDERKOOI *et al.*, 1974; SHATTIL e COOPER, 1976; LEMMICH *et al.*, 1997]. O excesso de colesterol prejudica a deformabilidade e a permeabilidade da membrana [BRETSCHER e MUNRO, 1993].

A forma plana e rígida e a natureza apolar do anel esteroidal do colesterol aumenta a quantidade das interações de van de Waals, o que aumenta a rigidez mecânica da membrana e reduz sua fluidez [HUBBELL e McCONNELL, 1971; SHINITZKY, 1976; RAFFY e TEISSIÉ, 1999]. Em certo nível, isso contribui para o estabelecimento da fluidez crítica da membrana, mas se a taxa de colesterol for muito alta haverá diminuição da estabilidade e aumento da friabilidade da membrana (**Figura 1.2**).

Conteúdo de colesterol nas membranas de eritrócitos como reflexo do conteúdo de colesterol no plasma

Em células onde não há síntese de colesterol, como os eritrócitos, o teor de colesterol de membrana deve depender de lipoproteínas plasmáticas [COOPER, 1977]. De fato, a existência de relação entre os teores de colesterol e fosfolipídeos de membrana com os

teores nas lipoproteínas plasmáticas já foi confirmada em vários experimentos tanto *in vitro* quanto *in vivo* [COOPER *et al.*, 1972; COOPER *et al.*, 1975].

O colesterol é transferido da LDL para a membrana do eritrócito por difusão simples, em um processo de equilíbrio dinâmico, ou por um processo de difusão dependente da razão molar colesterol/fosfolípidos existente em cada uma daquelas estruturas, com transferência de colesterol para a estrutura com menor razão colesterol/fosfolípidos [NIKOLIC *et al.*, 2007].

De fato, a razão molar colesterol/fosfolípidos nas membranas dos eritrócitos está aumentada em pacientes com hipercolesterolemia familiar [VAYA *et al.*, 1993; MARTINEZ *et al.*, 1998; MICHALSKA-MALECKA *et al.*, 2008; SPENGLER *et al.*, 2008] ou hipercolesterolemia de uma maneira em geral [SCHICK e SCHICK, 1985; MARTINEZ *et al.*, 1996; ÖZDEMIRLER *et al.*, 2001].

Na dinâmica de interação entre a lipoproteína e o eritrócito há também transferência de fosfolípidos. De fato, em pacientes com abetalipoproteinemia, o plasma sanguíneo apresenta uma redução na razão lecitina/esfingomielina também verificada na membrana de eritrócitos [COOPER, 1977].

A existência de relação entre o teor de colesterol na membrana de eritrócitos e na LDL sugere a existência de relação entre o teor de colesterol no eritrócito e a aterosclerose. Já em 1976 Arbogast e colegas destacavam a importância da dinâmica de troca do colesterol entre lipoproteínas e membranas com o desenvolvimento da aterosclerose em animais com dieta dislipidêmica [ARBOGAST *et al.*, 1976].

Os eritrócitos devem funcionar como um “tampão” de colesterol, contribuindo para abaixar os níveis de LDL-C e para atenuar o desenvolvimento da aterosclerose. De acordo com esta perspectiva, a reciclagem dos eritrócitos seria um poderoso mecanismo de eliminação do excesso de colesterol, de tal forma que as novas células vermelhas, lançadas na circulação sanguínea, estariam mais aptas a baixar os níveis de LDL-C, mas as células mais velhas já teriam um teor mais elevado de colesterol e não contribuiriam para regular os níveis de LDL-C. De fato, os eritrócitos são as células do sangue com o maior conteúdo de colesterol livre, o que justificaria sua relação com o acúmulo de colesterol nas placas

ateroscleróticas [YEAGLE, 1985; KOLODGIE *et al.*, 2003; ARBUSTINI, 2007; KOLODGIE *et al.*, 2007; TZIAKAS *et al.*, 2007]. Além de eritrócitos, outras células sanguíneas, como plaquetas e macrófagos, têm teores de colesterol de membrana relacionados com o teor de colesterol das lipoproteínas plasmáticas [COOPER, 1977] e poderiam ter papel ativo no controle da colesterolemia. Numa perspectiva mais ampla, todas as células não produtoras de colesterol devem ter papel ativo neste processo, mas por razões cinéticas as células mais abundantes e com maior *turnover* devem dar uma contribuição mais substancial no controle da colesterolemia.

O equilíbrio dos níveis de colesterol plasmático e de membrana na anemia *spur-cell*

A anemia chamada de *spur-cell* é uma doença que acomete indivíduos em que o metabolismo primário de suas lipoproteínas está comprometido. Normalmente ocorre em pacientes com doenças graves do fígado. Ela recebe o nome de *spur-cell* devido à forma adquirida pelos eritrócitos, que apresentam “esporas” em sua membrana. Na anemia *spur-cell* os eritrócitos tem seu tempo de vida reduzido, pois são precocemente destruídos no baço. Além disso, tais eritrócitos possuem um maior conteúdo de colesterol em suas membranas [COOPER, 1969].

Em indivíduos normais a relação máxima colesterol/fosfolípidos é sempre menor que 1,0. Em testes feitos *in vitro*, usando colesterol e fosfolípidos purificados e agitados de modo suave, essa relação chega a 1,0. Valores maiores que esse são obtidos somente com uso de ultra-som [COOPER *et al.*, 1975; ARBOGAST *et al.*, 1976]. Em estados patológicos a relação colesterol/fosfolípidos pode estar alterada. Na anemia *spur-cell* o nível de fosfolípidos está dentro dos padrões normais, porém o conteúdo de colesterol está de 25% a 65% aumentado [COOPER *et al.*, 1972].

Se a forma de espora dessas células fosse determinada por algum fator genético ligado ao seu desenvolvimento, eritrócitos saudáveis transfusionados em um indivíduo acometido da doença permaneceriam normais. Entretanto, observações clínicas provam que os eritrócitos transfusionados adquirem a forma dos eritrócitos *spur-cell*. A mudança

na forma ocorreria pela transferência de colesterol das lipoproteínas plasmáticas para a membrana dos eritrócitos transfusionados [COOPER, 1969].

Para ter segurança de que algum fator próprio da anemia *spur-cell*, talvez ainda desconhecido, não estaria influenciando direta ou indiretamente esse equilíbrio, Cooper [1969] avaliou *in vitro* o equilíbrio de fases de eritrócitos normais incubados em dispersões sonicadas com conteúdo variado de colesterol/fosfolipídeos. Os resultados obtidos em todos os casos mostrou que a fração molar de colesterol na membrana dos eritrócitos ao final da incubação era sempre proporcional à da dispersão, o que confirmou as conclusões que tinham sido obtidas na análise dos pacientes acometidos [COOPER *et al.*, 1975]. Resultados semelhantes também foram encontrados para as plaquetas [SHATTIL *et al.*, 1975; SHATTIL e COOPER, 1976].

Efeito de alterações na fluidez de membrana na fisiologia celular

A conservação da fluidez apropriada da membrana é um fator importante para a manutenção da fisiologia normal das células [CALISKAN *et al.*, 2000; GARCÍA *et al.*, 2005]. Alterações em propriedades enzimáticas ou no funcionamento de receptores e transportes já foram caracterizadas em doenças associadas a alteração na fluidez de membrana [COOPER, 1977].

Em plaquetas, a diminuição da fluidez provocada pelo aumento no conteúdo de colesterol de membrana afeta a atividade da adenilato-ciclase [SINHA, SHANTTIL e COLMAN, 1977]. Em células renais, o excesso de colesterol de membrana leva a inibição da sódio-potássio-ATPase, embora no cérebro um conteúdo maior de colesterol seja para funcionamento da sódio-potássio-ATPase [COOPER, 1977].

Este tipo de efeitos não deve ser prerrogativa da ação do colesterol em si, pois a diminuição da fluidez provocada pela diminuição da temperatura [HAZEL e PROSSER, 1974] também afeta a atividade de várias enzimas presentes na membrana [HAZEL e PROSSER, 1974].

Receptores da superfície das membranas das células sofrem alterações na sua posição de acordo com a fluidez da membrana. A rigidificação de membrana expõe os receptores ao meio aquoso, ao passo que a fluidificação permite que os receptores mergulhem mais profundamente na estrutura da membrana, reduzindo sua exposição ao meio [BO-ROCHOV e SHINITZKY, 1976].

Uma alteração na fluidez da membrana possivelmente produz modificações conformacionais em proteínas envolvidas no transporte de íons ou moléculas. Essa deve ser a razão pela qual a redução na fluidez de membrana dos eritrócitos pelo aumento de colesterol reduz a permeabilidade à várias substâncias que atravessam a membrana por difusão facilitada [WILEY e COOPER, 1975], enquanto o aumento na fluidez de membrana pela redução no teor de colesterol leva a aumento do transporte ativo de sódio acoplado a ATPase [COOPER, 1977].

Além da anemia *spur-cell* e da abetalipoproteinemia, outras doenças também estão relacionadas com variações na fluidez de membrana dos eritrócitos. A fluidez de membrana dos eritrócitos está aumentada na distrofia muscular miotônica (DMM) e miotonia congênita (doença de Thomsen), apesar de não estar alterada na distrofia muscular de Duchenne [COOPER, 1977].

Para as plaquetas, a funcionalidade está estreitamente relacionada com a sua capacidade de agregação. Essa funcionalidade também está relacionada com a fluidez de sua membrana. Quando a membrana plaquetária se torna enrijecida pelo aumento no conteúdo de colesterol, a sua habilidade de agregação induzida por ADP e adrenalina se torna aumentada [SHATTIL *et al.*, 1975; SHATTIL e COOPER, 1976]. Essa mesma anormalidade funcional pode ser vista em pacientes portadores de hiperlipoproteinemia do tipo IIa [CARVALHO, COLMAN e LEES, 1974], em decorrência também da elevação da fração molar de colesterol nas membranas das plaquetas [SHATTIL *et al.*, 1977]. Assim, níveis elevados de LDL-C seriam determinantes não somente de aterosclerose, mas também de trombose, de tal forma a estabelecer uma relação causal entre níveis altos de LDL-C e a aterotrombose como um todo e não somente com a aterosclerose, como é o senso corrente na literatura.

Para os macrófagos, uma importante característica que precisa ser mantida para o bom desempenho de sua função é a capacidade de fagocitar. Essa capacidade também é influenciada pela alteração na fluidez de sua membrana. Um aumento na rigidez de membrana dos macrófagos, induzida por aumento na fração molar de colesterol, está relacionado com a diminuição de sua habilidade de fagocitar materiais *non-self*, embora o aumento excessivo na fluidez por redução no conteúdo de colesterol de membrana também deprima a capacidade de endocitose de outras células [COOPER, 1977].

O comportamento reológico do sangue é outro fator influenciado pela fluidez da membrana, o que pode afetar a funcionalidade de vários sistemas. A circulação sanguínea exige que os eritrócitos sofram acentuadas mudanças de forma para conseguirem passar por capilares que sejam menores que o diâmetro dessa célula. Uma redução na fluidez da membrana do eritrócito, por aumento no teor de colesterol, faz com que a célula se torne mais rígida [CHABANEL *et al.*, 1983; KOTER *et al.*, 2002] e tenha uma sensível diminuição em sua habilidade de fluir para o baço [COOPER 1969; COOPER, DUROCHER e LESLIE, 1977], de tal forma que sua destruição somente vai ocorrer após sucessivas passagens pelo baço [COOPER, KIMBALL e DUROCHER, 1974].

Podemos concluir, portanto, que o teor de colesterol de membrana precisa ser mantido dentro de estreitos limites para permitir a funcionalidade ideal da célula. O aumento ou redução desses níveis fisiológicos é acompanhado de prejuízo à funcionalidade da célula (**Figura 1.2**).

Deformabilidade e estabilidade da membrana eritrocitária

O comportamento reológico do sangue é influenciado diretamente por duas propriedades distintas dos eritrócitos, a deformabilidade e a estabilidade. A deformabilidade é a medida da extensão da distorção que a membrana do eritrócito pode sofrer quando submetida a uma pressão externa definida. Já a estabilidade é a maior distorção que a membrana de um eritrócito pode sofrer sem que a deformação se torne permanente. A deformabilidade deve ser suficiente para que o eritrócito consiga passar por capilares

menores que o seu diâmetro e a estabilidade deve ser suficiente para que a célula não se fragmente quando submetida a esse estresse.

A rede de proteínas que constitui o citoesqueleto das células seguramente exerce um papel fundamental na determinação tanto da deformabilidade quanto da estabilidade do eritrócito [EVANS e HOCHMUTH, 1977; FISCHER *et al.*, 1978; LIU e PALEK, 1980; MOHANDAS, CHASIS e SHOHET, 1983; SMITH e PALEK, 1983]. Estudos feitos com pacientes que possuíam anormalidades mensuráveis no citoesqueleto mostraram que o citoesqueleto exerce influencia sobre a estabilidade das membranas dos eritrócitos [WAUGH e LA CELLE, 1980; LIU *et al.*, 1981; TCHERIA, MOHANDAS e SHOHET, 1981; MOHANDAS *et al.*, 1982; WOLFE *et al.*, 1982; MENTZER, LAROCCHI e MOHANDAS, 1984].

A diminuição da deformabilidade pode estar associada com aumento ou diminuição da estabilidade e mesmo uma deformabilidade normal pode estar associada a diminuição da estabilidade. A explicação para esses paradoxos pode ser encontrada não só nas propriedades e comportamento das proteínas do citoesqueleto [CHASIS e MOHANDAS, 1986], mas na interação dessas proteínas com os lipídeos de membrana e no conjunto de variáveis sanguíneas e hematológicas direta ou indiretamente relacionadas com a composição e comportamento de membrana dos eritrócitos. Esse é exatamente o contexto que motivou o estudo apresentado nesta tese.

Os eritrócitos como modelo de estudo da estabilidade de membranas e complexos organizacionais membranosos

O eritrócito constitui um modelo muito utilizado para avaliação da estabilidade de membranas, pelo fato da sua lise poder ser acompanhada pela liberação de hemoglobina, que pode ser quantificada por espectrofotometria na região visível do espectro. A incubação de eritrócitos em gradiente de hipotonicidade ou de concentração de um caotrópico leva a aumento na liberação de hemoglobina com a diminuição na concentração de sal ou aumento na concentração do caotrópico. Os valores de absorvância na região de 540 nm (Y) em função da concentração de sal ou do caotrópico (X) podem ser ajustados por regressão não-linear sigmoidal, com base na equação de Boltzmann. Como o aumento da

lise ocorre com a diminuição na concentração salina ou aumento na concentração do agente caotrópico, a curva de lise por hipotonicidade é dada por uma sigmóide decrescente, enquanto lise pelo caotrópico é dada por uma sigmóide crescente [CUNHA *et al.*, 2007; PENHA-SILVA *et al.*, 2008]. A **Figura 1.3** ilustra uma curva de lise por hipotonicidade.

A regressão sigmoidal observada nessas relações é típica de sistemas cooperativos saturáveis, em que a liberação de hemoglobina parte de um platô mínimo estável (dado pelo valor estacionário médio de absorvância A_2) e então sofre uma aceleração exponencial com a diminuição na concentração de sal até o ponto intermediário da curva, a partir do qual a liberação de hemoglobina sofre uma desaceleração hiperbólica retangular com a diminuição na concentração de sal até atingir um platô máximo estável (dado pelo valor estacionário médio de absorvância A_1). A transição entre os valores de A_2 e A_1 exige uma variação na concentração de sal (X) dada por $4 \times dX$ e passa por um ponto intermediário de concentração salina (H_{50}). As variáveis dX e H_{50} estão relacionadas com a estabilidade de membrana dos eritrócitos. Quanto menor o valor de dX , menor é a estabilidade ou maior é a fragilidade osmótica dos eritrócitos, pois foi necessária uma menor variação na concentração salina para promover a hemólise. Por outro lado, quanto menor o valor de H_{50} maior é a estabilidade ou menor é a fragilidade osmótica dos eritrócitos, pois maior foi a hipotonicidade necessária para promover a hemólise [PENHA-SILVA *et al.*, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2008, DE FREITAS *et al.*, 2010].

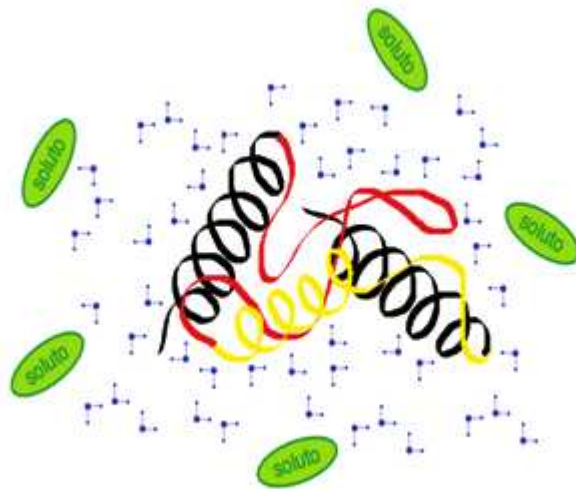
Considerações finais

Doenças degenerativas como os acidentes vasculares, de grande incidência na população ocidental, estão estreitamente relacionadas aos hábitos alimentares modernos e a grande ingestão de alimentos ricos em colesterol. Muito se tem pesquisado na tentativa de se obter uma droga capaz de conter ou mesmo reverter os danos vasculares provocados pelo colesterol.

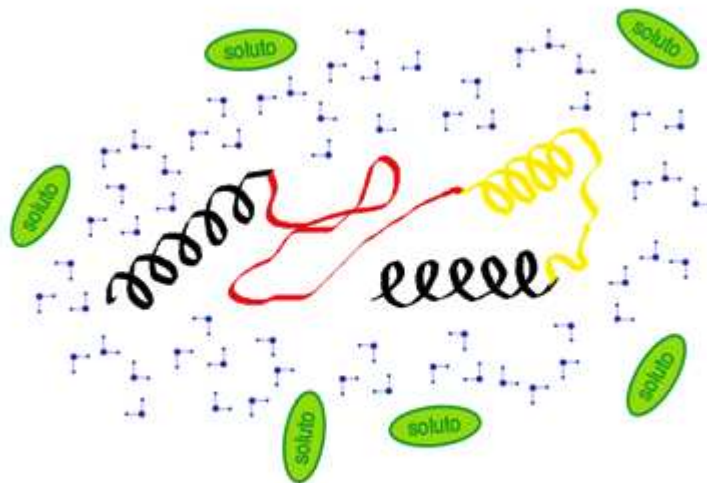
Os eritrócitos constituem um material biológico de acesso pouco invasivo e capaz de ser obtido sem prejuízo do paciente. Eles podem refletir o comportamento vascular e

das lipoproteínas plasmáticas quando se avalia o efeito de medidas preventivas ou terapêuticas no combate às doenças degenerativas provocadas por dislipidemias de origem nutricional ou hereditária.

A medição do conteúdo de colesterol na membrana dos eritrócitos é um procedimento difícil e controverso, no entanto a medida da estabilidade deles pode ser facilmente apurada e diretamente relacionada ao nível de colesterol/fosfolípidos nas membranas dessas células. Assim, a avaliação da estabilidade da membrana dos eritrócitos pode assumir um importante papel na avaliação de terapia medicamentosa para tratamento das doenças degenerativas vasculares, bem como para descrição de estados patológicos que de alguma forma estão relacionados a alterações do perfil lipídico dos pacientes.



(A)



(B)

Figura 1.1. Hidratação preferencial de uma proteína nos estados nativo (A) e desnaturado (B). Note que a superfície de contato da proteína com as moléculas de água é maior no estado desnaturado que no estado nativo, o que demanda maior investimento de energia livre para sua hidratação.

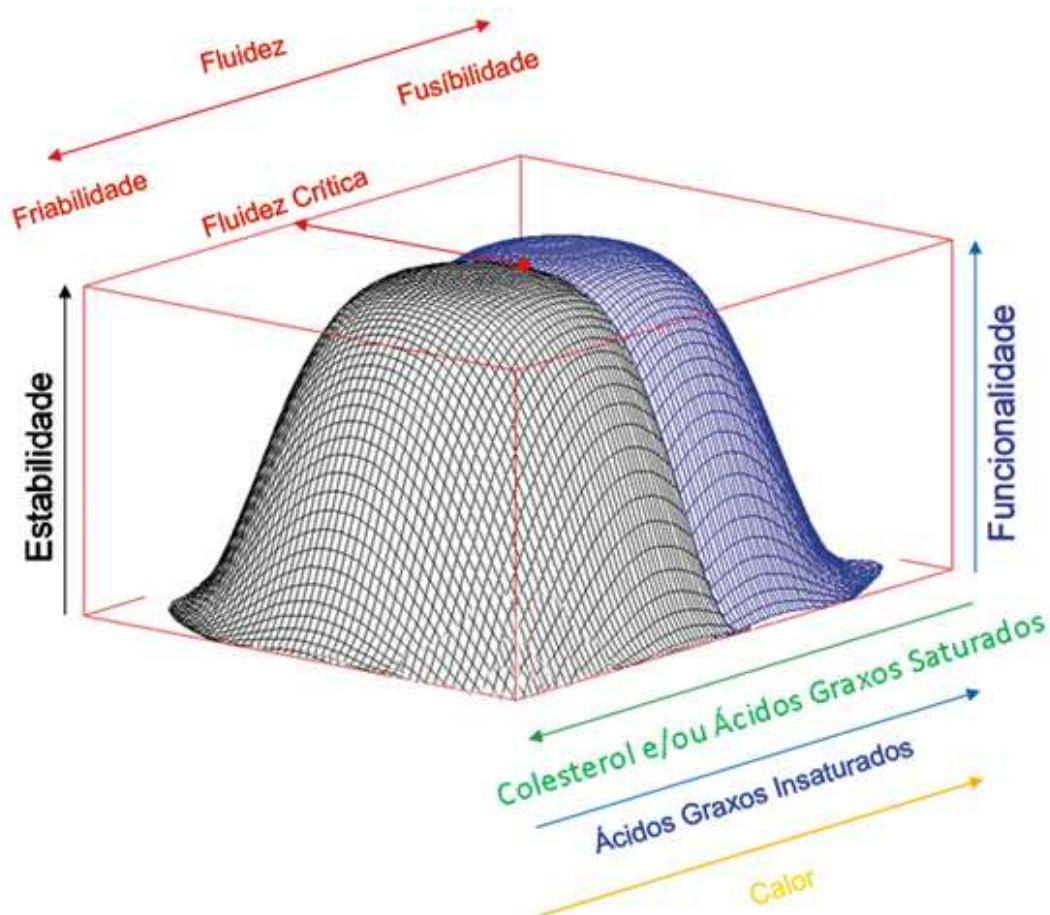


Figura 1.2. Relação entre estabilidade, funcionalidade e fluidez de membrana. Note a relação entre essas três importantes características da membrana com o conteúdo de colesterol, ácidos graxos saturados, ácidos graxos insaturados e temperatura.

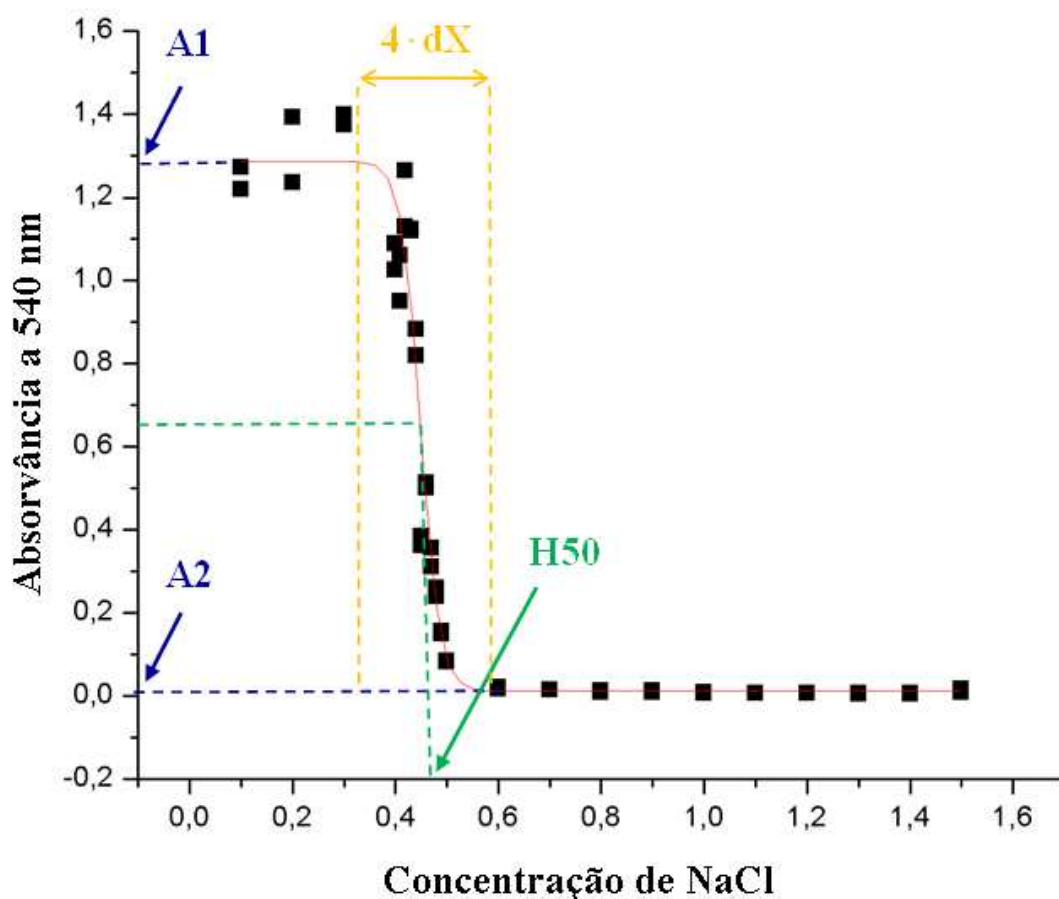


Figura 1.3. Ajuste sigmoidal da relação entre a absorvância a 540 nm de uma alíquota de sangue humano e a diminuição na concentração de NaCl. A_1 representa a absorvância média máxima, associada a hemólise total. A_2 representa a absorvância média mínima, associada a ausência de hemólise ou hemólise residual inespecífica. H_{50} representa a concentração de NaCl necessária promover lise de 50% da população de eritrócito. dX representa a variação na concentração de NaCl para conduzir os eritrócitos do estado íntegro (A_2) ao estado lisado (A_1).

Referências

ALMARZA, J.; RINCON, L.; BAHASAS, A.; BRITO, F. Molecular Mechanism for the Denaturation of Proteins by Urea. **Biochemistry**, v.48, n.32, p.7608-13, 2009.

ALOULOU, I.; VARLET-MARIE, E.; MERCIER, J.; BRUN, J.F. Hemorheological disturbances correlate with the lipid profile but not with the NCEP-ATPIII score of the metabolic syndrome. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.35, p.207-212, 2006.

ARBOGAST, L.Y.; ROTHBLAT, G.H.; LESLIE, M.H.; COOPER, R.A. Cellular cholesterol ester accumulation induced by free cholesterol-rich lipid dispersions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.73, p.3680-3684, 1976.

ARBUSTINI, E. Total erythrocyte membrane cholesterol. **Journal of the American College of Cardiology**, v.49, n.21, p. 2090-2092, 2007.

ATTRI, P.; VENKATESU, P.; LEE, M.J. Influence of Osmolytes and Denaturants on the Structure and Enzyme Activity of r-Chymotrypsin. **The Journal of Physical Chemistry**, v.114, p.1471-1478, 2010

BASKAKOV, H.; BOLEN, D. W. Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.9, p.4831-4834, 1998.

BENNETT, V.; STENBUCK, P.J. Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. **Journal of Biological Chemistry**, v.254, p.2533-2541, 1979.

BENNION, B.J.; DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.5142-47, 2003.

BOROCHOV, H.; SHINITZKY, M. Vertical displacement of membrane proteins mediated by changes in microviscosity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.73, p.4526-4530, 1976.

- BRANDEN, C.; TOOZE, J. Prediction, engineering, and design of protein structures. **Introduction to Protein Structure**, p.247-266, 1991
- BRANTON, D.; COHEN, C.M.; TYLER, I. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. **Cell**, v.24, p.24-32, 1981.
- BRETSCHER, M. S.; MUNRO, S. Cholesterol and the Golgi apparatus. **Science**. v.261, p.280-1281, 1993.
- CALISKAN, S.; CALISKAN, M.; KURALAY, B.; ÖNVURAL, B. Effect of simvastatin therapy on blood and tissue ATP levels and erythrocyte membrane lipid composition. **Research in Experimental Medicine**, v.199, p.189-194, 2000.
- CAMILLONI, C.; GUERINI ROCCO, A.; EBERINI, I.; GIANAZZA, E.; BROGLIA, R.A.; TIANA, G. Urea and Guanidinium Chloride Denature Protein L in Different Ways in Molecular Dynamics Simulations. **Biophysical Journal**, v.94, n.12, p.4654-61, 2008.
- CARVALHO A.C.A.; COLMAN, R.W.; LEES, R.S. Platelet function in hyperlipoproteinemia. **New England Journal of Medicine**, v.290, p.434-438, 1974.
- CHABANEL, A.; FLAMM, M.; SUNG, K.L.; LEE, M.M.; SCHACHTER, S.L.; CHIEN, S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophysical Journal**, v.44, p.171-176, 1983.
- CHASIS, J. A.; MOHANDAS, N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. **The Journal Cell Biology**, v.103, p.343-350, 1986.
- CHI, E.Y.; KRISHNAN, S.; RANDOLPH, T.W.; CARPENTER, J.F. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. **Pharmaceutical Research**, v.20, n.9, p.1325-36, 2003.
- COHEN, C.M. The molecular organization of the red cell membrane skeleton. **Seminars in Hematology**. v.20, p.141-158, 1983.
- COOPER, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.3, n.5, p.557-63, 1999.

COOPER, R.A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. **Seminars in Medicine of the Beth Israel hospital**, v.297, n.7, p.371-377, 1977.

COOPER, R.A. Anemia with spur-cells: a red cell defect acquired in serum and modified in the circulation. **The Journal of Clinical Investigation**. v.48, p.1820-1831, 1969.

COOPER, R.A.; ARNER, E.C.; WILEY, J.S.; SHATTIL, S.J. Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions: a model of primary spur-cell defect. **The Journal of Clinical Investigation**, v.55, p115-126, 1975.

COOPER, R.A.; DILOY-PURAY, M.; LANDO P.; GREENBERG, M.S. An analysis of lipoproteins, bile acids and red cell membrane associated with target cell and spur-cell in patients with liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v.51, p.3182-3192, 1972.

COOPER, R.A.; DUROCHER, J.R.; LESLIE, M.H. Increased microviscosity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v.60, p.115-121, 1977.

COOPER, R.A.; KIMBALL, D.B.; DUROCHER, J.R. Role of the spleen in membrane conditioning and hemolysis of spur-cells in liver disease. **The New England Journal of Medicine**, v.290, p.1279-1284, 1974.

CRIBIER, S.; MORROT G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.48, p.27-32, 1993.

CUNHA, C. C.; ARVELOS, L. R.; COSTA, J. O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.

DANIELLI J.F.; DAVSON H. A contribution to the theory of permeability of thin films. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v.5, p.495-508, 1935.

DE FREITAS, M.V.; NETTO, RDE C.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p.219-24, 2008.

DE FREITAS, M.V.; OLIVEIRA, M.R.; DOS SANTOS, D.F.; NETTO, R.C.M.; FENELON, S.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. **Journal of Membrane Biology**, v. 233, p. 127-134, 2010.

DI, L.; LIU, W.; LIU, Y.; WANG, J.Y. Effect of asymmetric distribution of phospholipids ghost membrane from rat blood on peroxidation induced by ferrous ion. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.580, p.685-690, 2006.

DILL, K.A.; SHORTLE, D. Denatured states of proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v.60, p.795-825, 1991.

EVANS, E.A.; HOCHMUTH, R.M.. A solid-liquid composite model of the red cell membrane. **The Journal of Membrane Biology**, v.30, p.351-362, 1977.

FIELDS, P.A. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v.129, p.417-431, 2001.

FISCHER, T.M.; HAEST, C.W.M.; STOHR, M.; KAMP, D.; DEUTICKE, B. Selective alteration of erythrocyte deformability by SH-reagents. Evidence for an involvement of spectrin in membrane shear elasticity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.510, p.270-282, 1978.

FONSECA, L. C.; CORRÊA, N.C.R; GARROTE-FILHO, M.S.; CUNHA, C.C.; PENHA-SILVA, N. Effects of the solvent composition on the stability of proteins in aqueous Solutions. **Química Nova**, v.29, p.543-548, 2006.

FRICK, M.; SCHMIDT, K.; NICHOLS, B.J. Modulation of Lateral Diffusion in the Plasma Membrane by Protein Density. **Current Biology**, v.17, n.5, p.462-467, 2007.

GARCETTI, G.G.; TRANQUILLI, A.L.; CUGINI, A.M.; MAZZANTI, L.; CESTER, N.; ROMANINI, C. Altered lipid composition, increased lipid peroxidation and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.25, n.6, p.352-355, 2001.

GARCÍA, J.J.; MARTÍNEZ-BALLARÍN, E.; MILLÁN-PLANO, S.; ALLUÉ, J.L.; ALBANDEA, C.; FUENTES, L.; ESCANERO, J.F. Effects of trace elements on membrane fluidity. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.19, n.1, p.19-22, 2005.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. **Biochemistry**. v.20, p.4667-4676, 1981.

GOLDSTEIN, D. B. The effects of drugs on membrane fluidity. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v.24, p.43-64, 1984.

HAZEL, J.R.; PROSSER, C.L.; Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. **Physiological Reviews**., v.54, p.620-677, 1974.

HUBBELL, W.L.; McCONNELL, H.M. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v.93, p.314-326, 1971.

JAMIESON, G. A.; ROBINSON, D.M. **Mammalian Cell Membranes**, vol.2., Butterworth, London, 1977.

KOLODIE, F.D.; BURKE, A.P.; NAKAZAWA, G.; CHENG, Q.; XU X.; VIRMANI, R. Free cholesterol in atherosclerotic plaques: where it come from? **Current Opinion in Lipidology**, v.18, p.500-507. 2007.

KOLODIE, F.D; GOLD, H.K; BURKE, A.P.; FOWLER, D.R.; KRUTH, H.S.; WEBER, D.K.; FARB, A.; GUERRERO, L.J; HAYASE, M.; KUTYS, R.; NARULA, J.; FINN, A.V.; VIRMANI, R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. **New England Journal of Medicine**., v.349, p.2316-2325, 2003.

KOTER, M.; BRONCEL, M.; CHOJNOWSKA-JEZIERSKA, J.; KLIKCYNSKA, K.; FRANIAK, I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.58, p.501-506, 2002.

KROES, J.; OSTWALD, R.; KEITH A. Erythrocyte membrane: compression of lipid phases by increased cholesterol content. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.274, p.71-74, 1972.

LAGUE, P.; ZUCKERMANN, M.J.; ROUX, B. Lipid-Mediated Interactions between Intrinsic Membrane Proteins: Dependence on Protein Size and Lipid Composition. **Biophysical Journal**, v.81, n.1, p.276-284, 2001.

LEMMICH, J.; MORTENSEN, K.; IPSEN, J.H.; HONGER, T.; BAUER, R.; MOURITSEN O.G. The effect of cholesterol in small amounts on lipid bilayer softness in the region on the main phase transition. **European Biophysics Journal**, v.25, p.293-304, 1997

LIU, S.C.; PALEK, J. Spectrin tetramer-dimer equilibrium and the stability of erythrocyte membrane skeletons. **Nature (Lond.)**, v.285, p.586-588, 1980.

LIU, S.C.; PALEK, J.; PRCHAL, J.; CASTLEBERRY, R.P. Altered spectrin dimer-dimer association and instability of erythrocyte membrane skeletons in hereditary pyropoikilocytosis. **Journal of Clinical Investigation**, v.68, p.597-605, 1981.

LIU, Y.; BOLEN, D. W. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. **Biochemistry**, v.34, p.12884-12891, 1995.

MAEDA, N.; CICHA, I.; TATEISHI N.; SUZUKI, Y. Triglyceride in plasma: prospective effects on microcirculatory functions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.34, p.341-346, 2006.

MARCHESI, V. T. The red cell membrane skeleton: recent progress. **Blood**, v.61, p.1-11, 1983.

MARTINEZ, M.; VAYA, A.; GIL, L.; MARTI, R.; DALMAU J.; AZNAR, J. The cholesterol/phospholipid ratio of the erythrocyte membrane in children with familial hypercholesterolemia. Its relationship with plasma lipids and red blood cell aggregability. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.18, p.259-263, 1998.

MARTINEZ, M.; VAYÁ, A.; MARTÍ, R; GIL, L.; LLUCH, I.; CARMENA R.; AZNAR, J. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin, **Thrombosis Research**, v.83, n.5, p.375-388, 1996.

MENTZER, W.C.; LAROCCI, T.A.; MOHANDAS, N. Modulation of RBC membrane mechanical fragility by 2,3-DPG in transient neonatal poikilocytosis. **Blood.**, v.64(Suppl. 1), p.28a, 1984.

MICHALSKA-MALECKA, K.; SLOWINSKA, L.; DORECKA, M.; ROMANIUK, W. Correlations in some pathogenetic factors and values of hemorheological parameters in age-related macular degeneration. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.38, n.3, p 209-216, 2008.

MOECKEL, G.W.; SHADMAN R.; FOGEL J.M.; SADRZADEH S.M.H. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life Sciences**, v.71, n.20, p.2413-2424, 2002.

MOHANDAS, N.; CHASIS, I.A.; SHOHET, S.B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. **Seminars in Hematology**, v.20, p.225-242, 1983.

MOHANDAS, N.; CLARK, M.R.; HEATH, B.P.; ROSSI, M.; WOLFE, L.C.; LUX, S.E.; SHOBET, S.B. A technique to detect reduced mechanical stability of red cell membranes: relevance to elliptocytic disorders. **Blood.**, v.59, p.768-774, 1982.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K. Membranas: estrutura, montagem e função. In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. **Harper's Biochemistry**. 9th. São Paulo: Atheneu Editora, 2002.

NIKOLIC, M.; STANIC, D.; BARICEVIC, I.; JONES, D.R.; NEDIC, O.; NIKETIC, U. Efflux of cholesterol and phospholipids derived from the haemoglobin-lipid adduct in human red blood cells into plasma. **Clinical Biochemistry**, v.40, p.305-309, 2007.

NOSOH, Y.; SEKIGUCHI, T. Protein engineering thermostability. **Tibtech**. v.8, p.16-20, 1990.

NOZAKI, Y.; TANFORD, C. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. **The Journal of Biological Chemistry**, v.238, n.12, p.4074-4081, 1963.

ÖZDEMIRLER, G.; KÜÇÜK, S.; ORHAN, Y.; AYKAÇ-TOKER, G.; UYSAL, M. Lipid and protein oxidation in erythrocyte membranes of hypercholesterolemic subjects. **Clinical Biochemistry**, v. 34, p.335-339, 2001.

PENHA-SILVA N, ARVELOS LR, CUNHA CC, AVERSI-FERREIRA TA, GOUVÊA-E-SILVA LF, GARROTE-FILHO MS, FINOTTI CJ, BERNARDINO-NETO M, DE FREITAS REIS FG. Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 23-29, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; REIS, F. G. F.; HUSS, J. C. C.; SOUZA, T.M.T.; DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 128, p. 444–449, 2007.

QU, Y.; BOLEN, C.L.; BOLEN D.W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.16, p.9268-9273, 1998.

RAFFY, S.; TEISSIÉ, J. Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content. **Biophysical Journal**, v.76, p.2072-2080, 1999

ROSSKY, P.J. Protein denaturation by urea: Slash and bond. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.44, p.16825-6, 2008.

SAUNDERS, A.J.; DAVIS-SEARLES, P.R.; ALLEN, D.L.; PIELAK, G.J.; ERIE, D.A. Osmolyte induced changes in protein conformational equilibria. **Biopolymers**, v.53, p.293-307, 2000.

SHELLMAN, J.A. Solvent denaturation. **Biopolymers**, v.17, p.1305-1322, 1978.

SCHICK, B.P.; SCHICK, P.K. Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 833, p.281-290, 1985.

SEKI, K.; SUMINO, H.; NARA, M.; ISHIYAMA, N.; NISHINO M.; MURAKAMI, M. Relationships between blood rheology and age, body mass index, blood cell count, fibrinogen, and lipids in healthy subjects. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.34, p.401-410, 2006.

SHATTIL, J.S.; COOPER, R.A. Membrane microviscosity and human platelet function. **Biochemistry**, v.15, p.4832-4837, 1976.

SHATTIL, S.J.; ANAYA-GALINDO, R.; BENNETT, J.; COLMAN, R.W.; COOPER, R.A. Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. **Journal of Clinical Investigation**, v.55, p636-643, 1975.

SHATTIL, S.J.; BENNETT, J.S.; COLMAN, R.W.; COOPER R.A. Abnormalities of cholesterol-phospholipid composition in platelet and low-density-lipoprotein of human hyperbetalipoproteinemia. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.89, p.341-353, 1977.

SHINITZKY, M.; INBAR, M. Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.433, p.133-149, 1976.

SINGER S.J. The molecular organization of membranes. **Annual Review of Biochemistry**, v.43, n.1, p.805-833, 1974.

SINGER S.J.; NICHOLSON G.L. The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes. **Science**, v.175, p.720-731, 1972.

SINHA, A.K.; SHATTIL, S.J.; COLMAN, R.W. Cyclic AMP metabolism in cholesterol-rich platelets. **Journal of the Biological Chemistry**, v.252, p3310-3314, 1977.

SMITH, D.K.; PALEK, J. Sulfhydryl reagents induce altered spectrin self-association, skeletal instability, and increased thermal sensitivity of red cells. **Blood**, v.62, p.1190-1196, 1983.

SPENGLER, M.I.; BERTOLUZZO, S.M.; CATALANI, G.; RASIA, M.L. Study on membrane fluidity and erythrocyte aggregation in equine, bovine and human species. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.38, n.3, p.171-176, 2008.

STORRY, J.R. Review: The function of blood group specific RBC membrane components. **Immunohematology**, v.20, n.4, p.206-216, 2004.

TANFORD, C. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. **Journal of American Chemistry Society**. v.84, p.4240-4247, 1962.

TANFORD, C. Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solutions. **Journal of American Chemistry Society**. v.86, p.2050-2059, 1963.

TAYLOR, L. S.; YORK, P.; WILLIAMS, A. C.; EDWARDS, H. G. M.; MEHTA, V.; JACKSON, G. S.; BADCOE, I. G.; CLARKE, A. R. Sucrose reduces the efficiency of protein denaturation by a chaotropic agent. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1253, p.39-46, 1995.

TCHEMIA, G.; MOHANDAS, N.; SHOHET, S.B. Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. **Journal of Clinical Investigation**, v.68, p.454-460, 1981.

TIMASHEFF, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.99, p.9721-9726, 2002.

TIMASHEFF, S. N. Solvent effects on protein stability. **Current Opinion in Structural Biology**, v.2, p.35-39, 1992.

TIMASHEFF, S.N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. **Advances in Protein Chemistry**, v.51, p.355-432, 1998.

TIMASHEFF, S.N.; ARAKAWA, T. Stabilization of protein structure by solvents. In: **Protein Structure: a practical approach**. CREIGHTON, T.E. (Ed.), Oxford: IRL Press, p.331-345, 1989.

TSUDA, K.; NISHIO, I. Membrane fluidity and hypertension. **American Journal of Hypertension**, v.16, n.3, p.259-261, 2003.

TZIAKAS, D.N.; KASKI, J.C.; CHALIKIAS, G.K.; ROMERO, C; FREDERICKS, S.; TENTES, I.K.; KORTSARIS, A.X.; HATSERAS D.I.; HOLT, D.W. Total cholesterol content of erythrocyte membranes is increased in patients with acute coronary syndrome a new marker of clinical instability. **Journal of the American College of Cardiology**, v.49, n.21, p.2081-2089, 2007.

VANDERKOOI, J.; FISCHKOFF, S.; CHANCE, B.; COOPER R.A. Fluorescent probe analysis of the lipid architecture of natural and experimental cholesterol-rich membranes. **Biochemistry**, v.13, p.1589-1595, 1974.

VAYA, A.; MARTINEZ, M.; CARMENA R.; AZNAR J. The lipid composition of red blood cells and their hemorheological behavior in patients with primary hyperlipoproteinemia. **Clinical Hemorheology**, v.13, p.447-457, 1993

VELCHEVA, I.; ANTONOVA, N.; DIMITROVA, V.; DIMITROV, N.; IVANOV. I. Plasma lipids and blood viscosity in patients with cerebrovascular disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.35, p.155-157, 2006.

WANG, A.; BOLEN, D.W. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. **Biochemistry**, v.36, p.9101-9108, 1997.

WANG, A.; ROBERTSON, A.D.; BOLEN, D.W. Effects of a naturally occurring compatible osmolyte on the internal dynamics of ribonuclease A. **Biochemistry**, v.34, n.46, p.15096-15104, 1995.

WAUGH, R.E.; LA CELLE, P.L. Abnormalities in the membrane material properties of hereditary spherocytosis. **Journal of Biomechanical Engineering**, v.102, p.240-246, 1980.

WILEY, J.S.; COOPER, R.A. Inhibition of cation cotransport by cholesterol enrichment of human red cell membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.413, p.425-431, 1975.

WOLFE, L.C.; JOHN, K.M.; FALCONE, J.C.; BYRNE A.M.; LUX, S.E. A genetic defect in the binding of protein 4.1 to spectrin in a kindred with hereditary spherocytosis. **New England Journal of Medicine**, v.307, p.1367-1374, 1982.

YANCEY, P.H. Water stress, osmolytes and proteins. **American Zoologist**, v.41, n.4, p.699-709, 2001.

YANG, A.S.; HONIG, B. Electrostatic effects on protein stability. **Current Opinion in Structural Biology**, v.2, p.40-45, 1992.

YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.822, p.267-287, 1985.

ZILBERMAN-KRAVITS, D.; HARMAN-BOEHM, I.; SHUSTER, T.; MEYERSTEIN, N. Increased red cell aggregation is correlated with HbA1C and lipid levels in type 1 but not type 2 diabetes. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.35, p.463-471, 2006.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE CORRELAÇÕES ENTRE ESTABILIDADE DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS, NÍVEIS SÉRICOS DE LIPÍDEOS E VARIÁVEIS HEMATIMÉTRICAS

RESUMO

Análise de correlações entre estabilidade de membrana de eritrócito, níveis séricos de lipídeos e variáveis hematimétricas

A constatação de que a fluidez da membrana deve permanecer dentro de um intervalo crítico fora do qual a estabilidade e funcionalidade da célula tende a diminuir nos mostra que estabilidade, fluidez e funcionalidade estão relacionadas e que a medida da estabilidade dos eritrócitos permite inferências sobre a fluidez ou funcionalidade dessas células. O teste da fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE) nos fornece três parâmetros para aferição da estabilidade: dX , H_{50} e dX/H_{50} . Estes parâmetros nos permitem relacionar diversas variáveis hematológicas e bioquímicas com fluidez ou funcionalidade eritrocitária e, por consequência, associar essas variáveis ao risco de doenças. O presente trabalho determina por meio desses parâmetros quais as variáveis bioquímicas e hematológicas que estão direta ou indiretamente relacionadas com a estabilidade eritrocitária e como elas se relacionam mutuamente, além de conhecer quais são as variáveis mais significantes. Para isso, a estabilidade osmótica de eritrócitos foi medida e correlacionada com diversas variáveis bioquímicas e hematológicas de 71 voluntários. Esses dados foram tratados matematicamente por correlação simples e estatística multivariada. A estabilidade dos eritrócitos mostrou maior associação com as variáveis hematológicas que com as bioquímicas. A RDW se destaca por sua correlação forte, significativa e livre de influências. Para as variáveis bioquímicas a estabilidade dos eritrócitos foi mais sensível ao LDL-C. A estabilidade eritrocitária está significativamente associada ao RDW e ao LDL-C. Assim, o nível de LDL-C é um elo consistente entre estabilidade e funcionalidade, permitindo que a medida da estabilidade seja mais um parâmetro indireto de avaliação do risco de doenças vasculares.

Palavras-chave: eritrócito, estabilidade, lipidemia, hematimetria

ABSTRACT

Analysis of correlations between stability of erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables

The observation that the membrane fluidity must remain within a critical interval outside which the stability and functionality of the cell tends to decrease, shows that the stability, fluidity and function are related and that the measure of erythrocytes stability allows inferences about the fluidity or functionality of these cells. The test of the FOE provides three parameters to measure stability: dX , H_{50} and dX/H_{50} . These parameters enable us to relate various hematological and biochemical variables with erythrocyte fluidity or functionality and, consequently, to associate these variables to the risk of disease. This study determines the biochemical and hematological variables that are directly or indirectly related to the stability of erythrocyte through those parameters and how they relate to each other, besides knowing what are the most significant variables. For this, we measured the erythrocytes stability by the FOE method and correlated them with various hematologic and biochemical variables for 71 patients. These data were treated mathematically by simple correlation and multivariate statistics. The erythrocytes stability showed a greater association with hematologic variables than the biochemical variables. The RDW stands out for their strong and significant correlation, and freedom of influences. For the biochemical variables the erythrocytes stability was more sensible to LDL-C. Erythrocyte stability is significantly associated with RDW and LDL-C. Thus, the level of LDL-C is a consistent link between stability and functionality, allowing a measure of stability is more one indirect parameter for assessing the risk of vascular diseases.

Keywords: erythrocyte, stability, lipidaemia, hematimetry

INTRODUÇÃO

A estabilidade das membranas biológicas é fundamental para o desempenho das funções das células. A ausência da integridade da membrana em células animais pode afetar a fisiologia normal dessa célula e levá-la à morte [MCNEIL e STEINHARDT, 1997]. Do mesmo modo, a fluidez da membrana também é essencial para que a célula permaneça metabolicamente ativa, sendo que essa fluidez precisa estar entre limites ideais para que a função normal das células possa ser exercida [GARCÍA *et al.*, 2005].

A manutenção da fluidez depende, dentre outros fatores, do teor de colesterol, ácidos graxos saturados (SFA) e ácidos graxos insaturados (UFA) dos seus fosfolipídeos [CRI-BIER *et al.*, 1993]. O colesterol é o mais importante esterol presente na membrana dos mamíferos. Entre todos os complexos membranosos celulares, a membrana plasmática é a que apresenta maior percentual em peso de colesterol, que pode chegar a 20% [JAMIE-SON e ROBINSON, 1977]. O teor de colesterol na membrana varia inversamente com sua fluidez [TSUDA e NISHIO, 2003]. O núcleo esterol rígido do colesterol contribui para a diminuição da liberdade de movimentação das outras moléculas constituintes da membrana e compete para o aumento da sua rigidez [RAFFY e TEISSIÉ, 1999; GARCETTI *et al.*, 2001; MURRAY e GRANNER, 2002]. Assim, existe um determinado teor de colesterol na membrana que estará relacionado com a fluidez ideal e qualquer fuga dessa faixa crítica de concentração pode comprometer as propriedades biológicas da membrana e da própria célula.

Variações no teor de colesterol podem alterar a permeabilidade, a deformabilidade [BRETSCHER e MUNRO, 1993] e a morfologia da membrana da célula e de organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi, bem como a eficiência de processos como a vesiculação de membranas [LEMMICH *et al.*, 1997].

Uma fluidez crítica é indispensável para que a célula tenha flexibilidade suficiente para permitir a ocorrência das transconformações necessárias para o bom desempenho de funções como a transdução de sinais relacionados à manutenção, diferenciação e pro-

lificação [SINENSKY, 1974]. Grandes variações no teor de colesterol podem levar a alteração significativa na fisiologia celular [CALISKAN *et al.*, 2000]. A redução da fluidez provocada pelo aumento da razão colesterol/fosfolípidos nas plaquetas aumenta atividade da adenilato-ciclase [SINHA, SHANTTIL e COLMAN, 1977]. A elevação do conteúdo de colesterol inibe a Na^+/K^+ -ATPase renal, embora um conteúdo adicional de colesterol seja necessário para a correta função da Na^+/K^+ -ATPase de cérebro [COOPER, 1977]. Uma redução na fluidez de membrana dos eritrócitos induzida pelo maior nível de colesterol/fosfolípidos diminui a permeabilidade do eritrócito a várias substâncias [WILEY e COOPER, 1975], mas a recuperação da fluidez por redução na razão colesterol/fosfolípidos eleva o transporte ativo de sódio acoplado à ATPase [COOPER, 1977].

Quando a membrana das plaquetas se torna enrijecida pelo aumento do conteúdo de colesterol, sua habilidade de agregação induzida por ADP ou adrenalina se torna aumentada [SHATTIL *et al.*, 1975; SHATTIL e COOPER, 1976].

O comportamento reológico do sangue depende da deformabilidade dos eritrócitos para passar por finos capilares. O estudo da influência dos lipídeos plasmáticos na reologia do sangue tem sido o objeto de muitos estudos [VAYA *et al.*, 1993; MARTINEZ *et al.*, 1996; ALOULOU *et al.*, 2006; MAEDA *et al.*, 2006; SEKI *et al.*, 2006; VELCHEVA *et al.*, 2006; ZILBERMAN-KRAVITS *et al.*, 2006]. Uma redução na fluidez da membrana dos eritrócitos provoca seu enrijecimento [CHABANEL *et al.*, 1983; KOTER *et al.*, 2002] e diminui portanto sua habilidade de fluir, particularmente no baço [COOPER, 1969; COOPER, DUROCHER e LESLIE, 1977]

Os eritrócitos são células muito sensíveis a alterações na concentração de colesterol no meio extracelular [COOPER *et al.*, 1975; SCHICK e SCHICK, 1985]. Vários estudos em pacientes com hipercolesterolemia familiar mostraram que eles apresentam conteúdo de colesterol aumentado nas membranas de eritrócitos [VAYA *et al.*, 1993; MARTINEZ *et al.*, 1998; MICHALSKA-MALECKA *et al.*, 2008; SPENGLER *et al.*, 2008].

Os eritrócitos são as células com o maior conteúdo de colesterol não esterificado entre todas as células do fluido sanguíneo [ARBUSTINI, 2007; KOLODIE *et al.*, 2007] e, por isso, estão relacionados com o acúmulo de colesterol nas placas ateroscleróticas [YE-

AGLE, 1985] e com síndromes coronarianas agudas [KOLOGIE *et al.*, 2003; TZIAKAS *et al.*, 2007].

As drogas hipocolesterolemiantes, como as estatinas, podem reduzir o teor de colesterol aumentar a fluidez de membrana de eritrócitos [RABINI *et al.*, 1993; BLUM, 1994; SEHAYEK *et al.*, 1994; MARTINEZ *et al.*, 1996; SACKS *et al.*, 1996; LIPID, 1998; CORSINI *et al.*, 1999; SENA *et al.*, 2003; NASSIEF e MARSH, 2008], com diminuição da viscosidade e melhora da microcirculação sanguínea [MARTINEZ *et al.*, 1996].

O presente trabalho analisa a existência de relações entre a estabilidade osmótica de membrana de eritrócitos e a lipidemia e diferentes variáveis hematimétricas, com o intuito de avaliar se as variáveis usadas na determinação da estabilidade de membrana [PENHA-SILVA *et al.*, 2007; DE FREITAS *et al.*, 2008; DE FREITAS *et al.*, 2010] são sensíveis a oscilações na lipidemia.

MATERIAL E METODOS

Amostras de material biológico

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

As amostras de sangue foram coletadas de uma população de 71 indivíduos após jejum de 8 a 12 horas no laboratório LABORMED, em Uberlândia, MG, Brasil, por punção intravenosa, diretamente em tubos evacuados contendo K₄EDTA a 1g/dL como anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil) e conservadas em refrigerador a temperaturas entre 0 e 4 °C até a hora de realização dos ensaios.

Reagentes

Somente foram utilizados reagentes com grau ACS de pureza. O NaCl usado foi da marca Labsynth (Diadema, SP, Brasil) e tinha grau de pureza de 99,5%, o qual foi devidamente corrigido para preparo de suas soluções.

Equipamentos

As medidas de massa foram feitas em uma balança digital de precisão (AND, modelo 870, Japão) e as medidas de volume foram feitas em provetas de vidro refratário ou com a utilização de pipetas automáticas (Labystems, modelo Finnpipette Digital, Helsinki, Finlândia). As incubações em temperaturas definidas foram feitas em banho termostaticado (Marconi, modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil). A centrifugação foi feita em centrífuga Hitachi Koki (modelo CF15RXII, Hitachinaka, Japão) e as leituras de absorvância em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV1650TC, Japão) sob controle do programa UV Probe 2.21. O hemograma foi feito com a utilização de sistema automatizado (Sysmex K4500, Sysmex Corporation, Mundelein, IL, EUA). As dosagens de colesterol total (Col-T), HDL-colesterol (HDL-C), LDL-colesterol (LDL-C), VLDL-colesterol (VLDL-C), triglicérides (TG) e

glicemia (GLU) foram feitas em analisador automático (Hitachi 917, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA).

Determinação da fragilidade osmótica eritrócitária (FOE)

Conjuntos em duplicata de 24 minitubos (Eppendorf®) contendo 2 mL de solução de NaCl em concentrações entre 0 e 1,5 g/dL foram pré-incubados em banho termostatzado a 37 °C por 15 min. Após adição de 20 µL de sangue total, os tubos foram fechados, homogeneizados e incubados por 30 min a 37 °C. Após centrifugação por 10 minutos a 1600 x *g* e a 20 °C, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos com pipeta automática e submetidos a leitura de absorvância a 540 nm. Os ensaios sempre foram conduzidos num período entre 6 e 10 horas após a coleta de sangue. A influência do tempo de coleta do sangue sobre os parâmetros de estabilidade de eritrócitos foi devidamente avaliada nos tempos 0, 24 e 48 horas após a coleta.

Cálculos, edição de dados e análises estatísticas

Os cálculos, as edições dos dados e as análises estatísticas da dependência entre hemólise e concentração de NaCl foram executados com a utilização do aplicativo Origin 8.0 (Microcal Inc., Northampton, Massachusetts, EUA).

A relação da absorvância em 540 nm (**A₅₄₀**) com a concentração de NaCl (**X**) foi ajustada a uma linha de regressão sigmoideal de acordo com a equação de Boltzmann:

$$A_{540} = \frac{A_{\min} - A_{\max}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\max} \quad (2.1),$$

em que **A_{min}** e **A_{max}** representam os valores médios de **A₅₄₀** nos platôs mínimo e máximo, **H₅₀** é a concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise e **dX** é a variação na concentração do sal responsável pela transição da lise dos eritrócitos.

Os parâmetros **A₁**, **A₂**, **dX** e **H₅₀** obtidos a 0, 24 e 48 horas da coleta de sangue foram estatisticamente comparados entre si por meio de teste de Kruskal-Wallis e pós teste de

Dunn, com a utilização do aplicativo GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

As relações entre os parâmetros da estabilidade eritrocitária e as variáveis bioquímicas e hematológicas foram analisadas por correlações simples e multivariadas. As correlações simples foram ajustadas por regressão linear e as análises multivariadas foram feitas por meio de correlações canônicas e análises de trilha. As análises de correlação canônica testaram as associações existentes entre o grupo de parâmetros de fragilidade osmótica (dX e dX/H_{50}), considerado como variável dependente, e grupos formados por variáveis hematológicas ou bioquímicas, consideradas como variáveis explicativas. Para essas análises foram utilizadas matrizes de correlação de Pearson. As correlações desdobradas por meio da análise de trilha [WRIGTH, 1921; WRIGTH, 1923; LI, 1975] consideraram como variável dependente a relação dX/H_{50} e como variáveis explicativas os parâmetros hematológicos e bioquímicos que mostraram correlações simples mais expressivas. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa de distribuição gratuita GENES (Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil).

RESULTADOS

Dependência dos parâmetros obtidos no teste de fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE) com o tempo de coleta das amostras de sangue

A influência do tempo após a coleta de sangue (0, 24 e 48 horas) sobre os parâmetros A_1 , A_2 , dX e H_{50} está mostrada na **Figura 2.1**. Como não houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de cada uma destas variáveis nos diferentes momentos após a coleta, certamente que eventuais diferenças entre as variáveis não podem ser atribuídas ao tempo de coleta da amostra de sangue.

Dependência de dX com variáveis hematológicas e bioquímicas

A dependência de dX , obtido a partir da medida da fragilidade osmótica eritrocitária (FOE), com as variáveis hematológicas foi significativa para (1) o volume corpuscular médio (VCM) (**Figura 2.2**), (2) a hemoglobina corpuscular média (HCM) (**Figura 2.3**) e (3) a *Red Cell Distribution Width* (RDW) (**Figura 2.4**). O VCM apresentou dois pontos díssonos em extremos opostos na parte superior da linha de regressão (**Figura 2.2**), mas que não provocam distorção nessa linha por se equilibrarem reciprocamente e por isso não foram censurados. O HCM também apresentou dois pontos nos extremos opostos também em situação de equilíbrio e ainda um ponto díssono à esquerda (**Figura 2.3**), o qual também não foi objurgado por se postar sobre a linha de regressão, o que nos garante que ele não adultera seu coeficiente angular.

O parâmetro dX não mostrou dependência com as seguintes variáveis hematológicas: (1) eritrócitos (RBC), (2) hemoglobina (Hb), (3) hematócrito (Ht) e (4) concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (**Tabela 2.1**).

Com relação às variáveis bioquímicas, o parâmetro dX apresentou dependência significativa com: (1) colesterol total (Col-T) (**Figura 2.5**) e (2) LDL-colesterol (LDL-C) (**Figura 2.6**). As variáveis Col-T e LDL-C tiveram censurados dois e três pontos díssonos respec-

tivamente, que juntos forçavam uma redução no coeficiente angular da reta de ajuste linear do conjunto dos pontos (**Figuras 2.5 e 2.6**). A dependência de dX com essas variáveis apresentou-se ainda mais significativa após a observância e censura dos pontos supracitados (**Tabela 2.2**). O referencial dX não apresentou dependência com as variáveis (1) HDL-colesterol (HDL-C), (2) VLDL-colesterol (VLDL-C), (3) triglicérides (TG) e (4) glicemia (Glu) (**Tabela 2.2**).

Dependência de H_{50} com variáveis hematológicas e bioquímicas

O parâmetro referencial de estabilidade eritrocitária H_{50} mostrou dependência significativa com as seguintes variáveis hematológicas: (1) VCM (**Figura 2.7**), (2) HCM (**Figura 2.8**) e (3) RDW (**Figura 2.9**). Porém, quando censurados os pontos díssonos, as correlações entre H_{50} e as variáveis VCM e HCM perderam a significância. O referencial H_{50} não mostrou dependência com as demais variáveis hematológicas: (1) RBC, (2) Hb, (3) Ht e (4) CHCM (**Tabela 2.3**).

Entre os parâmetros bioquímicos, o referencial H_{50} apresentou dependência significativa com as variáveis: (1) LDL-C (**Figura 2.10**), (2) VLDL-C (**Figura 2.11**) e (3) TG (**Figura 2.12**). A dependência com o LDL-C somente se tornou significativa após censura de três pontos tendenciosos que forçavam inclinação positiva à reta de ajuste linear do conjunto dos pontos (**Figura 2.10**). A dependência de H_{50} com o VLDL-C (**Figuras 2.11**) e TG (**Figura 2.12**) foi mantida significativa mesmo após a censura de pontos díssonos (**Tabela 2.4**). O parâmetro H_{50} não mostrou dependência com as demais variáveis bioquímicas adotadas: (1) Col-T, (2) HDL-C e (3) Glu (**Tabela 2.4**).

Dependência de dX/H_{50} com variáveis hematológicas e bioquímicas

O parâmetro referencial de estabilidade eritrocitária dX/H_{50} mostrou dependência significativa com: (1) VCM (**Figura 2.13**), (2) HCM (**Figura 2.14**) e (3) RDW (**Figura 2.15**). A dependência com o VCM apresentou dois pontos acima da linha de regressão nos extre-

mos opostos em situação de equilíbrio (**Figura 2.13**) e por isso esses pontos não foram censurados. A dependência com o HCM também apresentou dois pontos díssonos em situação de equilíbrio, os quais não foram censurados, e um ponto díssono no extremo esquerdo, que foi censurado (**Figura 2.14**). A dependência de dX/H_{50} com HCM permaneceu significativa após a censura desse ponto (**Tabela 2.5**). Situação de equilíbrio análoga ocorreu com o RDW, envolvendo 4 pontos que não foram censurados (**Figura 2.15**).

O parâmetro dX/H_{50} não apresentou dependência significativa com as outras variáveis hematológicas adotadas: (1) RBC, (2) Hb, (3) Ht e (4) CHCM (**Tabela 2.5**).

Com relação às variáveis bioquímicas, o parâmetro dX/H_{50} apresentou dependência significativa com: (1) Col-T (**Figura 2.16**) e (2) LDL-C (**Figura 2.17**). O referencial dX/H_{50} somente mostrou correlação significativa com a variável Col-T após a censura de um ponto díssono (**Figura 2.16**), mas a correlação já era limítrofe antes da objurgação (**Tabela 2.6**). A relação de dX/H_{50} com LDL-C também teve um ponto tendencioso censurado (**Figura 2.17**), mas ela se manteve significativa após a censura (**Tabela 2.6**).

O parâmetro dX/H_{50} não apresentou dependência significativa com as outras variáveis bioquímicas adotadas: (1) HDL-C, (2) VLDL-C, (3) TG e (4) Glu (**Tabela 2.6**).

Em suma, as análises de correlação simples mostraram que o aumento na estabilidade de eritrócitos, indicado pelo aumento nos valores de dX e/ou de dX/H_{50} ou redução de H_{50} , foi associado a aumento nos valores de RDW (**Figuras 2.4, 2.9 e 2.15**) e redução nos valores de VCM (**Figuras 2.2, 2.7 e 2.13**) e HCM (**Figuras 2.3, 2.8 e 2.14**) (**Tabelas 2.1, 2.3 e 2.5**). Ficou evidente que a resistência dos eritrócitos à fragilidade osmótica e, por consequência, sua estabilidade, aumenta na medida direta dos níveis séricos de Col-T (**Figuras 2.5 e 2.16**) e LDL-C (**Figuras 2.6, 2.10 e 2.17**). Uma relação direta entre fragilidade osmótica eritrocitária e os níveis de VLDL-C (**Figura 2.11**) e triglicérides (**Figura 2.12**) também pôde ser verificada (**Tabelas 2.2, 2.4, 2.6**).

Correlações canônicas

As correlações canônicas foram feitas para avaliar a significância e a força da correspondência entre grupos de variáveis. Os parâmetros avaliadores da estabilidade dos eritrócitos (dX e dX/H_{50}) constituíram o grupo de variáveis dependentes e as diversas variáveis hematológicas e bioquímicas foram organizadas em grupos de possíveis variáveis explicativas, descritas na **Tabela 2.8**.

O grupo formado pelas variáveis explicativas RBC e RDW (grupo 1) (**Tabela 2.8**) mostrou correlação forte ($r = 0,9262$) e extremamente significativa ($p = 0,0000$) com o primeiro par canônico formado pelo grupo das variáveis dependentes (dX e dX/H_{50}), sendo que nessa correlação a variável RDW foi a que gerou maior impacto na determinação dos valores do grupo das variáveis dependentes. As cargas canônicas foram positivas para todas as variáveis, o que significa que o grupo 1 contribui de modo forte e significativo para aumento dos valores do grupo das variáveis dependentes e, portanto, para aumento da estabilidade dos eritrócitos, sendo que a RDW se configura como a principal variável determinante dessa relação (**Tabela 2.9**).

O grupo formado pelas variáveis explicativas Col-T, HDL-C, LDL-C e Glu (grupo 2) (**Tabela 2.8**) não apresentou correlação significativa com o primeiro par canônico ($p = 0,2255$) nem com o segundo par canônico ($p = 0,8504$) formados pelo grupo das variáveis dependentes. Em função da não significância dos dois coeficientes de correlação canônica, não podemos afirmar que exista uma relação de dependência entre os grupos de variáveis dependentes e as variáveis do grupo 2 (**Tabela 2.10**).

O grupo das variáveis explicativas Hb, Ht, VCM, HCM e CHCM (grupo 3) (**Tabela 2.8**), apresentaram correlação forte ($r = 0,7927$) e extremamente significativa ($p = 0,0000$) com o primeiro par canônico formado pelo grupo das variáveis dependentes, sendo que a variável CHCM se mostrou a que mais contribuiu nessa relação. As cargas canônicas de todas aquelas variáveis foram negativas, com exceção da variável Ht, o que significa que elas competem de modo forte e significativo para redução dos valores do grupo das variáveis dependentes (dX e dX/H_{50}) e, por consequência, para a redução da estabilidade dos eritrócitos (**Tabela 2.11**).

Análise de trilha

A análise de trilha foi feita com a finalidade de entender as causas existentes nas correlações entre variáveis hematológicas e bioquímicas e o parâmetro avaliador da estabilidade dos eritrócitos dX/H_{50} . Cada uma das variáveis foi avaliada no seu efeito direto sobre dX/H_{50} e efeito indireto via várias outras variáveis.

O valor do coeficiente de determinação obtido para a análise de trilha feita para o grupo 4 (**Tabela 2.8**) foi de 0,8690 e a magnitude do efeito da variável residual foi de 0,3620.

Todas as variáveis do grupo 4 (Col-T, HDL-C, LDL-C, Glu, RBC, RDW) apresentaram efeitos direto e total positivos com o parâmetro dX/H_{50} (**Tabela 2.12**). A variável RDW foi a que mostrou maior efeito sobre os valores de dX/H_{50} , com um coeficiente de determinação de (+) 0,9177, que foi 2,53 vezes maior que coeficiente obtido para o efeito da variável residual (0,3620). O sinal positivo dos coeficientes de trilha significam que a influência dessas variáveis sobre a determinação dos valores de dX/H_{50} é positiva, ou seja, a estabilidade dos eritrócitos aumenta com o aumento dos valores de cada variável, sendo a RDW a variável que mais influencia os valores de dX/H_{50} (**Tabela 2.12**).

O valor do coeficiente de determinação obtido para análise de trilha feita para o grupo 5 (**Tabela 2.8**) foi de 0,6218 e a magnitude do efeito da variável residual foi de 0,6149.

As variáveis VLDL-C, Hb, VCM e CHCM apresentaram efeito direto negativo sobre dX/H_{50} e as variáveis Ht e HCM apresentaram efeito direto positivo. As estimativas dos efeitos diretos das variáveis Hb, Ht, VCM e HCM foram respectivamente de 3,26; 3,22; 1,94 e 1,53 vezes superior ao valor do efeito da variável residual. Assim, o efeito direto das variáveis Ht e HCM contribuem para aumento dos valores do parâmetro dX/H_{50} e o efeito direto das variáveis Hb e VCM contribuem para a redução dos valores desse parâmetro. O sentido do efeito total foi o mesmo observado no efeito direto para todas as variáveis, com exceção da variável HCM, que teve um efeito total negativo e um efeito direto positivo. Isso significa que o efeito direto do HCM contribui para aumentar os valo-

res de dX/H_{50} e o efeito indireto, resultante da influencia de todas as outras variáveis, contribui para reduzir os valores do parâmetro dX/H_{50} (**Tabela 2.13**).

DISCUSSÃO

A sensibilidade dos eritrócitos à concentração de colesterol no meio extracelular [COOPER *et al.*, 1975; SCHICK e SCHICK, 1985] é apoiada pelos estudos que revelaram a existência de relação entre os níveis de colesterol plasmático de pacientes com hipercolesterolemia familiar e o aumento da concentração de colesterol na membrana de eritrócitos [MICHALSKA-MALECKA *et al.*, 2008; SPENGLER *et al.*, 2008; VAYA *et al.*, 1993; MARTINEZ *et al.*, 1998]. Esse aumento no teor de colesterol determina diminuição na fluidez de membranas [CHABANEL *et al.*, 1983 KOTER *et al.*, 2002] e prejuízos funcionais [CRIBIER *et al.*, 1993] como diminuição do aporte de oxigênio, disfunção endotelial e hiperviscosidade sanguínea por diminuição da flexibilidade dos eritrócitos [COOPER, 1977; DWIGHT, MENDES-RIBEIRO e HENDRY, 1996].

A constatação de que a fluidez deve permanecer dentro de um intervalo crítico fora do qual a estabilidade e funcionalidade da célula tende a diminuir (**Figura 1.2**) nos mostra que estabilidade, fluidez e funcionalidade estão relacionadas e que a medida de estabilidade dos eritrócitos permite inferências sobre a fluidez e funcionalidade dessas células.

Como o risco de aterotrombose aumenta com alterações nas propriedades reológicas do sangue, é possível que esse risco possa ser estimado a partir da estabilidade de membrana de eritrócitos, uma vez que ela está associada com elevação no teor de colesterol, diminuição na fluidez e prejuízo à funcionalidade da membrana dessas células.

A estabilidade de eritrócitos é uma função inversa de sua fragilidade osmótica que pode ser medida pelo teste de fragilidade osmótica eritrocitária (FOE). O teste da FOE nos fornece três parâmetros para aferição da estabilidade das células: dX , H_{50} e dX/H_{50} (**Figura 1.3**). O parâmetro dX expressa a variação na concentração salina necessária para levar os eritrócitos íntegros (A_2) à lise completa (A_1). Maiores valores de dX expressam maior estabilidade dos eritrócitos, pois maiores variações na concentração salina são necessárias para promoção da lise de toda a população de eritrócitos. Por outro lado, o parâmetro H_{50} expressa a concentração salina necessária para gerar 50% de hemólise. Maiores valo-

res de H_{50} expressam menor estabilidade de eritrócitos, pois menores diminuições na concentração salina serão suficientes para lisar 50% da população de eritrócitos. Em função das relações direta e inversa existentes entre dX e H_{50} e a estabilidade de eritrócitos, a razão dX/H_{50} apresenta uma relação direta com a estabilidade das células vermelhas do sangue.

A determinação da significância (p), do sentido (positivo ou negativo) e da força (r) das correlações existentes entre aqueles parâmetros (dX , H_{50} e dX/H_{50}) e as diversas variáveis hematológicas e bioquímicas consideradas neste trabalho pode representar um primeiro passo para o estabelecimento de um novo método de predição do risco de desenvolvimento de doenças degenerativas.

Independentemente disso, o conhecimento das inter-relações existentes permite que se tenha uma visão mais completa da complexa rede de fatores capazes de afetar a estabilidade e o comportamento de eritrócitos.

Em relação às variáveis hematológicas, houve correlação significativa dos parâmetros dX ou dX/H_{50} com VCM, HCM e RDW (**Tabela 2.1 e 2.5**) e de H_{50} com RDW (**Tabela 2.3**). Os valores de dX e de dX/H_{50} diminuíram com o aumento no VCM (**Figuras 2.2 e 2.13**) e na HCM (**Figuras 2.3 e 2.14**) e aumentaram com o aumento da RDW (**Figuras 2.4 e 2.15**). Já os valores de H_{50} aumentaram com o aumento no VCM (**Figuras 2.6**) e na HCM (**Figura 2.8**), embora essas correlações tenham perdido a significância com a censura de pontos “outlier” (**Tabela 2.3**), e diminuíram com aumento na RDW (**Figura 2.9**). Isso significa que na presença de outras variáveis, a estabilidade de eritrócitos aumenta com a diminuição do volume e da concentração de hemoglobina dos eritrócitos. Uma maior concentração média de hemoglobina (HCM) faz com que a diferença de pressão osmótica entre o meio extracelular e o meio interno do eritrócito seja menor, de tal forma que a célula retém mais água e apresenta maior volume (VCM) (**Figura 2.18**). Eritrócitos mais volumosos se encontram em um estado menos tensionado (estado R) e menos estável. Pelo contrário, uma menor concentração média de hemoglobina (HCM) torna maior a diferença de pressão osmótica entre o meio externo e interno do eritrócito, de maneira que a célula retém menos água e apresenta um menor volume (VCM). Eritrócitos menos

volumosos têm maior aproximação de lipídeos e intensificação das forças atrativas de van der Waals no interior da membrana, mais tensionado (estado T) e mais estável [BERNARDINO NETO, 2006; FINOTTI, 2006; GOUVÊA-E-SILVA, 2006; DE FREITAS REIS, 2007; CUNHA *et al.*, 2008; PENHA-SILVA *et al.*, 2008].

A RDW foi a única variável hematológica cuja dependência foi significativa com os três parâmetros usados para avaliação da estabilidade eritrocitária (**Figuras 2.4, 2.9 e 2.15 e Tabelas 2.1, 2.3 e 2.5**). Os sentidos dessas correlações mostram que a estabilidade das células aumenta com o aumento da anisocitose. Como as causas mais comuns de anisocitose na população em geral são deficiências de ferro e/ou de proteínas, o que está associado a diminuição na HCM e no VCM, os sentidos das correlações observadas com RDW são consistentes com os sentidos das correlações observadas com a HCM e o VCM, pois as células de menor volume são mais estáveis que as mais volumosas.

Em relação às variáveis bioquímicas, houve correlações significantes de dX ou dX/H₅₀ com Col-T (**Figuras 2.5 e 2.16 e Tabelas 2.2 e 2.6**) e LDL-C (**Figuras 2.6 e 2.17 e Tabelas 2.2 e 2.6**) e de H₅₀ com LDL-C (**Figura 2.10 e Tabela 2.4**), VLDL-C (**Figura 2.11 e Tabela 2.4**) e triglicérides (**Figura 2.12 e Tabela 2.4**). Os sentidos positivos das correlações de dX e dX/H₅₀ com Col-T (**Figuras 2.5 e 2.16**) e com LDL-C (**Figuras 2.6 e 2.17**) e o sentido negativo da correlação de H₅₀ com LDL-C (**Figura 2.10**) indicam que a estabilidade de eritrócitos aumenta com o aumento da concentração de colesterol total e de LDL-C. Esse resultado é apoiado por diversos estudos que confirmam que a hipercolesterolemia é acompanhada de aumento na fração molar do colesterol nas membranas dos eritrócitos [MICHALSKA-MALECKA *et al.*, 2008; SPENGLER *et al.*, 2008; VAYA *et al.*, 1993; MARTINEZ *et al.*, 1998] e que o aumento do colesterol de membrana aumenta a rigidez dela pela presença do núcleo esteróide, que diminui o grau de mobilidade na membrana [HUBBELL e McCONNELL, 1971; SHINITZKY, 1976]. Esses resultados estão associados a elevados valores de LDL-C, que intercambiam colesterol com a membrana dos eritrócitos [NIKOLIC *et al.*, 2007]. Esse mecanismo de transferência de colesterol visa equilibrar a estabilidade de membrana com a fluidez necessária para exercício de suas funções. Níveis muito baixos de colesterol diminuem a estabilidade e aumentam excessivamente a fluidez de membrana, favorecendo sua fusão. Embora a estabilidade aumente com o aumento no teor de

colesterol, um aumento excessivo diminui excessivamente a fluidez da membrana, o que compromete suas funções (**Figura 1.2**).

O sentido positivo observado nas correlações de H_{50} com VLDL-C (**Figura 2.11**) e TG (**Figura 2.12**) é condizente com aqueles obtidos nas correlações de dX e dX/H_{50} com Col-T e LDL-C, com base na relação existente entre LDL-C e VLDL-C ou TG descrita na equação de [Friedewald e colaboradores \[1972\]](#),

$$LDL-C = Col-T - HDL-C - VLDL-C \quad (2.2),$$

onde

$$VLDL-C = TG/5 \quad (2.3),$$

uma vez que o aumento na concentração de LDL-C ocorre associado a uma diminuição na concentração de VLDL-C, que corresponde a um quinto da concentração de TG. Assim, quanto maior é o VLDL-C, menor é o LDL-C, e menor é a estabilidade. Da mesma forma, a concentração de TG deve apresentar a mesma relação de proporcionalidade com a estabilidade de eritrócitos. É por isso que H_{50} aumenta e, por conseguinte, a estabilidade diminui com aumento em VLDL-C e TG.

Dentre os parâmetros usados na avaliação da estabilidade de eritrócitos (dX , H_{50} e dX/H_{50}), dX/H_{50} expressou de forma mais completa as correlações que dX e H_{50} apontaram individualmente, tanto no que concerne à significância quanto ao sentido da dependência, de tal forma que ele pode ser usado para inferir sozinho as mesmas conclusões suportadas individualmente por dX e por H_{50} .

Dentre as variáveis hematológicas, a RDW foi a única que gerou correlação significativa com todos os parâmetros de estabilidade. Como, além disso, as correlações com RDW estiveram entre as mais fortes do grupo, isso deve significar que a estabilidade de membrana é bem sensível a oscilações nesta variável hematológica.

Dentre as variáveis bioquímicas, a estabilidade foi mais sensível à LDL-C, que apresentou correlação significativa com todos os parâmetros. Esse achado é muito importante, uma vez que é a lipoproteína de baixa densidade que intercambia colesterol com a

membrana dos eritrócitos [NIKOLIC *et al.*, 2007], afetando a reologia do fluido sanguíneo e, por consequência, predispondo a doenças vasculares degenerativas. Estudos já comprovaram que o risco de aterosclerose está mais estreitamente ligado aos níveis de LDL-C que aos níveis de Col-T [HOEFNER, *et al.*, 2001; OKADA, MATSUTO e OBAYASHI, 2004]. Desse modo, a LDL-C associa a estabilidade dos eritrócitos ao risco daquelas doenças e sugere que a medida da estabilidade dos eritrócitos pelo método da FOE possa fornecer uma estimativa indireta desse risco.

Os resultados das correlações simples apresentados acima não são suficientes para apontar qual dos grupos de variáveis, hematológicas ou bioquímicas, se correlaciona com maior força e significância com a estabilidade. Por meio de correlações simples também não podemos apontar qual das variáveis dentro de cada grupo é mais impactante nessa correlação ou como uma variável influencia as outras variáveis do mesmo grupo. Foi nesse sentido que os dados deste trabalho foram também avaliados por correlação canônica e análise de trilha.

A correlação canônica foi usada para avaliar a significância e a força da correlação entre os parâmetros de estabilidade e os grupos de variáveis hematológicas ou bioquímicas analisadas como conjuntos.

A análise de correlação canônica constitui um modo simples de diminuir as complexidades envolvidas em relacionar dois conjuntos de variáveis. O principal problema da técnica é a interpretação das soluções canônicas. A análise canônica identifica várias correlações que, embora sejam estatisticamente significantes, associam as variáveis utilizadas de uma forma heterogênea e de difícil interpretação. Isto decorre do fato de os fatores canônicos serem representados por funções lineares que podem não refletir necessariamente partes significativas da variância dos respectivos domínios de medidas. Entretanto, alguns artifícios foram desenvolvidos para auxiliar na interpretação dos resultados, permitindo a identificação dos tipos de relações que estão sendo representadas por um fator canônico. Um desses artifícios é a matriz canônica de estruturação fatorial, que representa a correlação entre as variáveis originais e as canônicas [ABREU e VETTER, 1978]. A matriz canônica de estruturação fatorial fornece as correlações das variáveis pertinen-

tes a um domínio de medidas com os fatores canônicos extraídos e substitui os vetores de coeficientes canônicos cujas variâncias não podem ser controladas. Esta matriz é obtida por meio da multiplicação da matriz de correlação das variáveis pertinentes a cada domínio de medidas pela matriz de coeficientes canônicos. Os elementos da matriz canônica de estruturação fatorial são úteis na interpretação dos fatores canônicos, porque eles são similares às cargas fatoriais da análise fatorial [ABREU e VETTER, 1978].

Para a correlação canônica reunimos as variáveis nos grupos 1, 2 e 3, conforme caracterizado na **Tabela 2.8**. As variáveis hematológicas foram separadas das bioquímicas para avaliar qual desses grupos apresenta correlação mais forte com a estabilidade. As variáveis com sentidos de correlação opostos também foram separadas para que o efeito de uma não invalidasse o efeito da outra, impedindo assim qualquer conclusão. Dos três parâmetros de estabilidade escolhemos o ΔX e o $\Delta X/H50$ para constituírem o grupo de variáveis dependentes por eles terem o mesmo sentido de correlação e assim permitir a interpretação das associações.

O grupo 1 (**Tabela 2.9**) apresentou correlação forte e significativa com o primeiro par canônico do grupo dos parâmetros de estabilidade (grupo das variáveis dependentes), sendo que as cargas canônicas foram todas positivas tanto para o RDW quanto para o RBC. Isso significa que as variáveis hematológicas desse grupo associam-se com os parâmetros de estabilidade de modo direto e forte. A variável RDW foi a mais impactante nessa associação. Esses dados são consistentes com os achados nas correlações simples e reforçam a sensibilidade da associação entre os valores de RDW e a estabilidade dos eritrócitos.

O grupo 3 (**Tabela 2.11**) também apresentou correlação forte e significativa com o primeiro par canônico do grupo das variáveis dependentes. Como poderia se esperar, as cargas canônicas foram todas negativas, com exceção da variável Ht, cuja contribuição pode ser desconsiderada em função de sua pequena dimensão. Dentre as variáveis hematológicas de correlação negativa com a estabilidade, a CHCM foi a que mais contribuiu nessa relação. Esse dado é bastante consistente pois à medida que os valores de CHCM aumentam a diferença de gradiente de concentração entre os meios interno e externo

das células também aumenta, o que provoca aumento do volume celular e diminuição da estabilidade como foi anteriormente discutido. Provavelmente, as correlações simples entre os parâmetros de estabilidade utilizados e a CHCM não apresentaram significância em decorrência da influência das outras variáveis hematológicas e bioquímicas. A influência dessas outras variáveis sobre a CHCM não pode ser dimensionada em uma correlação simples, o que encobre esse importante resultado.

As variáveis bioquímicas cujas correlações foram negativas com os parâmetros de estabilidade não constituíram um grupo, uma vez que VLDL-C e TG têm valores numericamente associados e, evidentemente, não podem ser analisadas por correlações canônicas.

As variáveis bioquímicas que constituíram o grupo 2 (**Tabela 2.10**) não apresentaram correlação significativa com nenhum par canônico.

Porque os grupos das variáveis hematológicas (grupo 1 e grupo 3) apresentaram correlações fortes e significantes com o grupo dos parâmetros de estabilidade (grupo das variáveis dependentes), e as variáveis bioquímicas não mostraram correlação? A resposta para essa pergunta está no delineamento do presente estudo. As variáveis hematológicas têm efeito direto e imediato sobre a estabilidade, pois elas são variáveis intrínsecas dos eritrócitos e, assim, seu efeito pode ser mais facilmente verificado em um estudo transversal. Já as variáveis bioquímicas têm ações intermediadas sobre a estabilidade e seu efeito seria melhor acompanhado em um estudo longitudinal.

A análise de trilha foi usada para avaliar a possível influência mútua entre as variáveis de mesmo sentido de correlação com dX/H_{50} . Nessa análise foram verificados os efeitos diretos de cada variável sobre os valores de dX/H_{50} e os efeitos indiretos via as outras variáveis do mesmo grupo sobre o mesmo parâmetro de estabilidade. Para a análise de trilha reunimos as variáveis nos grupos 4 e 5 conforme caracterizado na **Tabela 2.8**. O parâmetro de estabilidade escolhido foi o dX/H_{50} porque, conforme já foi discutido, ele representa sozinho o que os parâmetros dX e H_{50} representam isoladamente e, por isso, se torna o melhor parâmetro. As variáveis bioquímicas e hematológicas agora não foram

separadas, uma vez que parte do objetivo dessa análise está na aferição da influência que existe entre elas.

Todas as variáveis do grupo 4 (**Tabela 2.12**) mostraram efeitos direto e total positivos. Esse sentido de correlação já era esperado e reforça que a conclusão de que o aumento nos valores variáveis está associado a aumento nos valores de dX/H_{50} . O valor do coeficiente de determinação obtido nessa análise de trilha foi de 0,8690, o que certifica com solidez os resultados obtidos.

Os maiores efeitos direto e total sobre os valores de dX/H_{50} foram apresentados pela variável RDW. Esses efeitos foram (direto e total) foram respectivamente 2,53 e 2,55 vezes maiores que a variável residual (0,3620). Além de ter sido a única variável desse grupo que apresentou efeito direto e total acima da variável residual, a RDW também apresentou um efeito direto (+0,9177) muito próximo do efeito total (+0,9258), o que significa que seu efeito sobre dX/H_{50} quase não sofre influência das outras variáveis do grupo.

Analisando paralelamente as estatísticas multivariadas e as correlações simples, podemos concluir que a RDW é uma variável que está associada à estabilidade de eritrócitos de modo significativo, forte e praticamente livre de influências das outras variáveis. Os efeitos indiretos da RDW intermediados pelas outras variáveis estiveram todos próximos de 0,00 (**Tabela 2.12**). A RDW é, portanto, uma variável cujo efeito sobre a estabilidade não será distorcido por outras variáveis de mesmo sentido de correlação. Podemos afirmar ainda que, como seu efeito na correlação simples foi positivo e significativo, o efeito da RDW sobre a estabilidade também não sofreu distorção pelas outras variáveis de sentido oposto.

As variáveis do grupo 5 (**Tabela 2.13**) que apresentaram efeito direto e efeito total negativos foram VLDL-C, Hb, VCM e CHCM. A variável HCM apresentou efeito direto positivo e efeito total negativo. A variável Ht apresentou efeito direto e efeito total positivos. O coeficiente de determinação obtido nessa análise de trilha foi de 0,6218, o que atesta a validade dos resultados obtidos.

Os efeitos diretos das variáveis Hb e VCM foram negativos e superiores ao valor da variável residual (0,6149) em 3,26 e 1,94 vezes, respectivamente. Esses resultados confirmam que maiores valores de hemoglobina levam ao aumento do VCM e são acompanhados de redução da estabilidade dos eritrócitos. Esses dados são apoiados pelo sentido das correlações simples de ambas as variáveis.

O sentido negativo do efeito direto e total da variável CHCM também corrobora com essa lógica e, apesar de seu efeito direto estar abaixo do valor do efeito da variável residual, o efeito total deve ser considerado. A análise das correlações canônicas, discutidas anteriormente, é consistente com este resultado.

A variável Ht apresentou efeito direto positivo e 3,22 vezes maior que o efeito da variável residual (0,6149). Esse achado faz sentido na medida em que, uma maior estabilidade de eritrócitos vai preservar ou aumentar sua proporção em relação ao um dado volume de sangue e, conseqüentemente, maior será o Ht. Esse sentido positivo na associação do Ht com os parâmetros de estabilidade não pôde ser verificado na correlação simples e o motivo disso está claro na **Tabela 2.13**. Nessa tabela pode-se ver que a influencia das outras variáveis consideradas no grupo 5 faz com que o efeito total do Ht sobre os valores de dX/H_{50} caia de 98,12%. Considerando ainda que na correlação simples outras variáveis não consideradas nesse grupo estão presentes, parece bastante provável que a correlação positiva entre Ht e dX/H_{50} foi mascarada, o que somente poderia ser verificado pela análise de trilha.

Ainda no grupo 5, pode-se ver que o efeito total do HCM foi negativo, como esperado, e apesar de estar abaixo do valor da variável residual, ele está próximo dela. No entanto, seu efeito direto foi positivo e 1,53 vezes maior que o efeito da variável residual. Sendo o efeito direto um valor associado à exclusão da influência das outras variáveis do mesmo grupo, podemos entender que o HCM tem importante ligação com outra variável fora do grupo considerado (grupo 5), cujo efeito não foi excluído nessa análise. Essa variável pode ser bioquímica, hematológica ou ainda um terceiro fator que não foi considerado na análise. Além disso, como o efeito total negativo do HCM se deu sobre o parâmetro

combinado de estabilidade (dX/H_{50}), é possível que a influência esteja se manifestando isoladamente sobre dX ou H_{50} .

Na tentativa de avaliar melhor a influência do HCM sobre a estabilidade de eritrócitos, uma nova análise de trilha foi conduzida, agora com a totalidade das variáveis bioquímicas e hematológicas consideradas neste trabalho, e utilizando não mais o parâmetro combinado de estabilidade (dX/H_{50}), mas sim dX e H_{50} isoladamente (**Tabela 2.14**).

Para a análise da influência do HCM sobre dX , o valor do coeficiente de determinação obtido foi de 0,3650 e a magnitude do efeito da variável residual foi de 0,7968. Esta análise mostrou que o efeito direto e o efeito total do HCM sobre dX foram ambos negativos, no entanto inferiores ao efeito da variável residual.

Para a análise da influência do HCM sobre H_{50} , o valor do coeficiente de determinação obtido foi de 0,4060 e a magnitude do efeito da variável residual foi de 0,7707. Esta análise mostrou que o efeito total do HCM sobre H_{50} foi positivo, porém também abaixo do efeito da variável residual. Somente o efeito direto do HCM sobre H_{50} foi superior ao valor da variável residual, porém em sentido inverso ao sentido observado na análise de correlação simples entre essas mesmas variáveis. Isso deve significar que foi H_{50} o parâmetro de estabilidade que governou a influência da relação do HCM com o parâmetro combinado de estabilidade (dX/H_{50}). Como o efeito direto exclui somente a influência das demais variáveis do grupo considerado, certamente um agente externo que está fora do conjunto das variáveis bioquímicas e hematológicas consideradas neste trabalho exerceu influência significativa sobre o efeito do HCM sobre H_{50} , de tal maneira que esta relação fosse determinada por uma dependência inversa e não direta como observado na análise de correlação simples.

Certamente esse agente não é o tempo transcorrido após a coleta da amostra de sangue, que mostrou não exercer influência sobre as variáveis de estabilidade analisadas (**Figura 2.1**).

A identificação desse agente pode ser obtida pela incorporação de outras variáveis sanguíneas na análise multivariada.

CONCLUSÕES

A medida da estabilidade dos eritrócitos pode ser usada como um meio de inferir a fluidez de sua membrana ou sua funcionalidade. Assim, sendo um parâmetro avaliador da reologia e funcionalidade dos eritrócitos, a medida da estabilidade é um meio indireto de avaliar o risco do indivíduo a doenças degenerativas de origem vascular. O parâmetro de estabilidade eritrocitária dX/H_{50} que foi obtido pelo teste de FOE é um bom parâmetro para avaliação da estabilidade dessas células e pode atestar como diversas variáveis bioquímicas e hematológicas se associam com a estabilidade delas.

Dentre as variáveis hematológicas, a estabilidade dos eritrócitos é mais sensível a alterações no VCM, HCM e RDW. A estabilidade eritrocitária aumenta com os valores de RDW e diminui com o aumento dos valores HCM e VCM. A RDW é a variável que se associa à estabilidade de modo mais forte, significativo e livre de influências de outras variáveis.

Dentre as variáveis bioquímicas, a estabilidade é mais sensível a variações nos níveis de LDL-C, com correlação também direta. Sendo essa lipoproteína a responsável por intercambiar o colesterol plasmático com a membrana dos eritrócitos, pode-se concluir que a LDL-C associa de modo consistente a estabilidade dos eritrócitos ao risco dessas doenças degenerativas e faz com que a medida da estabilidade dos eritrócitos pelo método da FOE seja um meio indireto de avaliar esse risco.

As variáveis hematológicas estão associadas com a estabilidade de modo mais próximo que as bioquímicas porque elas são variáveis intrínsecas dos eritrócitos, enquanto as variáveis bioquímicas são variáveis extrínsecas e exercem apenas influências intermediadas sobre essas células.

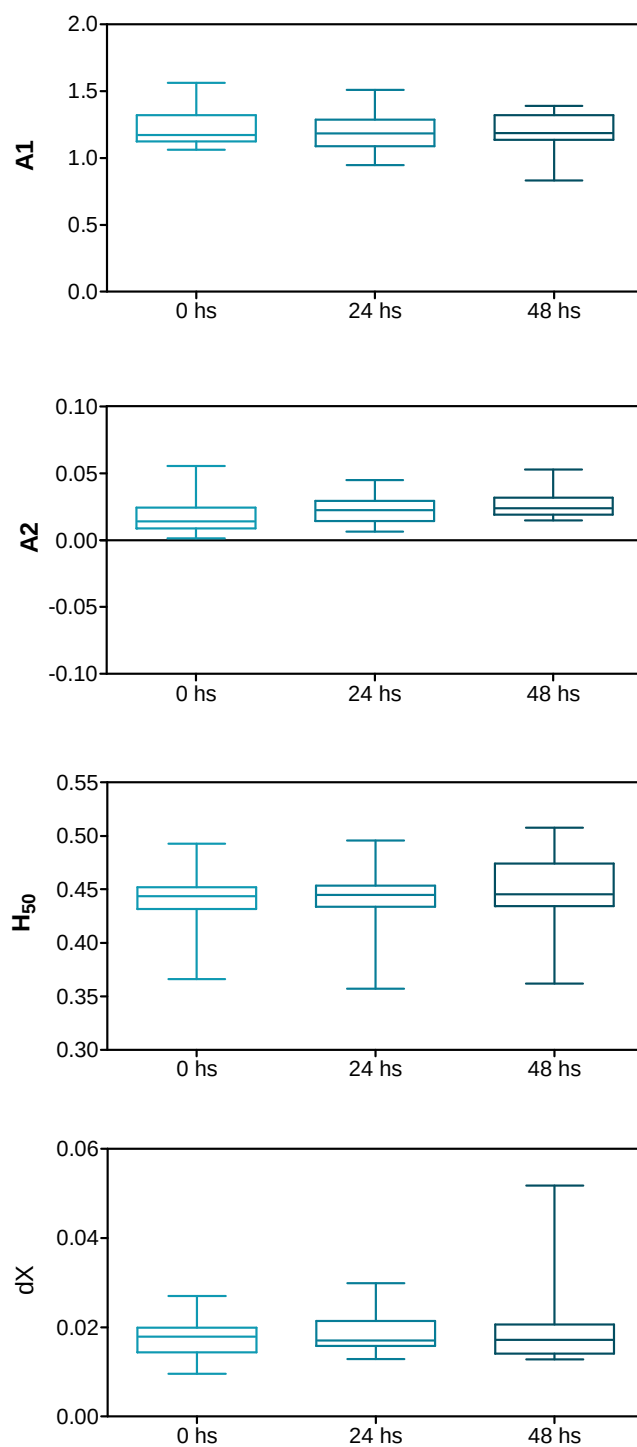


Figura 2.1. Comparação dos valores de A_1 , A_2 , dX e H_{50} obtidos a partir de eritrócitos conservados a 0 °C por 0, 24 e 48 horas. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tempos de conservação para todos os quatro parâmetros ($p > 0.05$, teste de Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn).

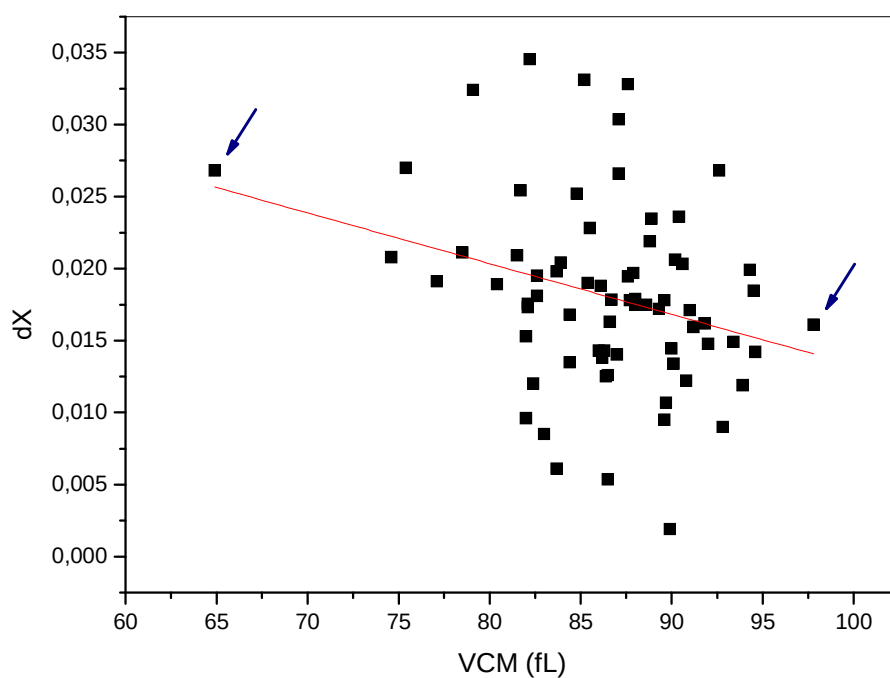


Figura 2.2. Relação entre os valores de dX e de volume corpuscular médio (VCM) dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0709$; $p = 0,0141$). As setas azuis indicam dois pontos díssonos em situação de equilíbrio.

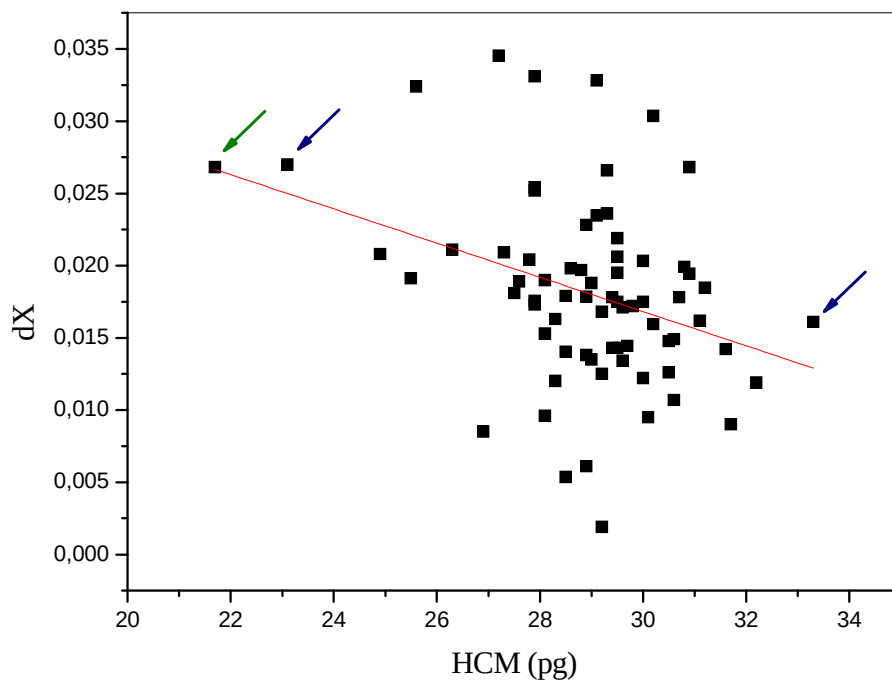


Figura 2.3. Relação entre valores de dX e de hemoglobina corpuscular média (HCM) dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,1064$; $p = 0,0032$). As setas azuis indicam dois pontos díssonos em situação de equilíbrio e a seta verde um ponto que, apesar de ser destoante da média, não frauda a linha de regressão por se posicionar sobre ela.

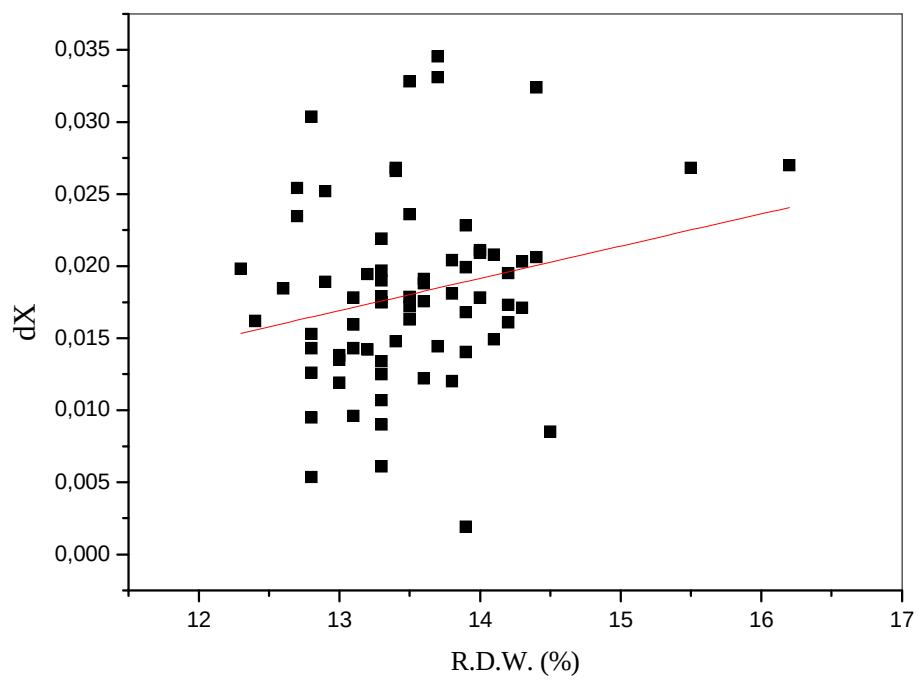


Figura 2.4. Relação entre valores de dX e de RDW dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0373$; $p = 0,0582$).

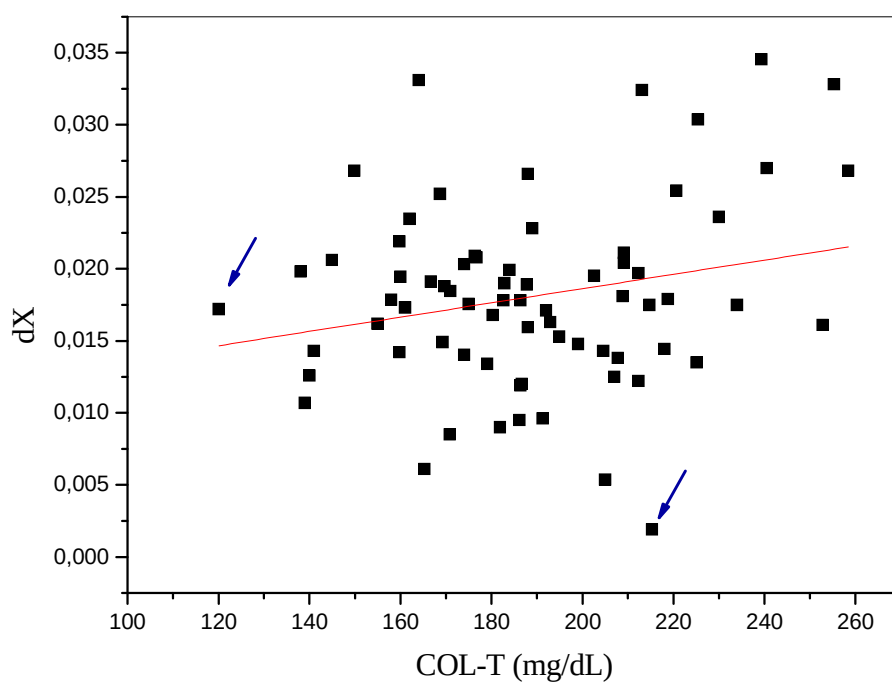


Figura 2.5. Relação entre valores de dX e de Col-T dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0385$; $p = 0,0553$). A linha de regressão após exclusão dos pontos assinalados permaneceu significativa ($n = 69$; $r^2 = 0,0644$; $p = 0,0200$).

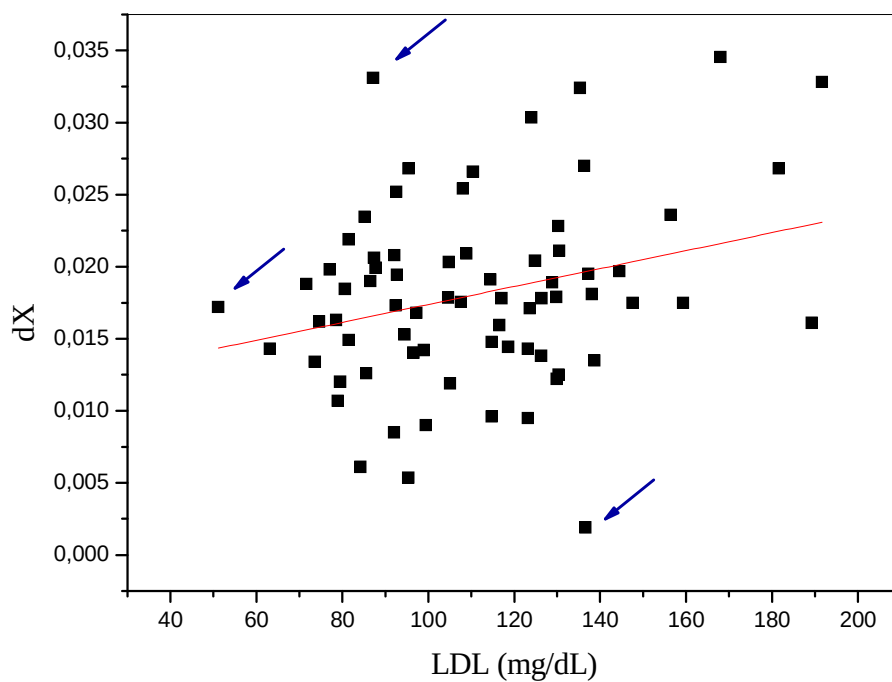


Figura 2.6. Relação entre valores de dx e de LDL-C dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0661$; $p = 0,0173$). Após exclusão dos pontos assinalados, a linha de regressão permaneceu significativa ($n = 68$; $r^2 = 0,1345$; $p = 0,0012$).

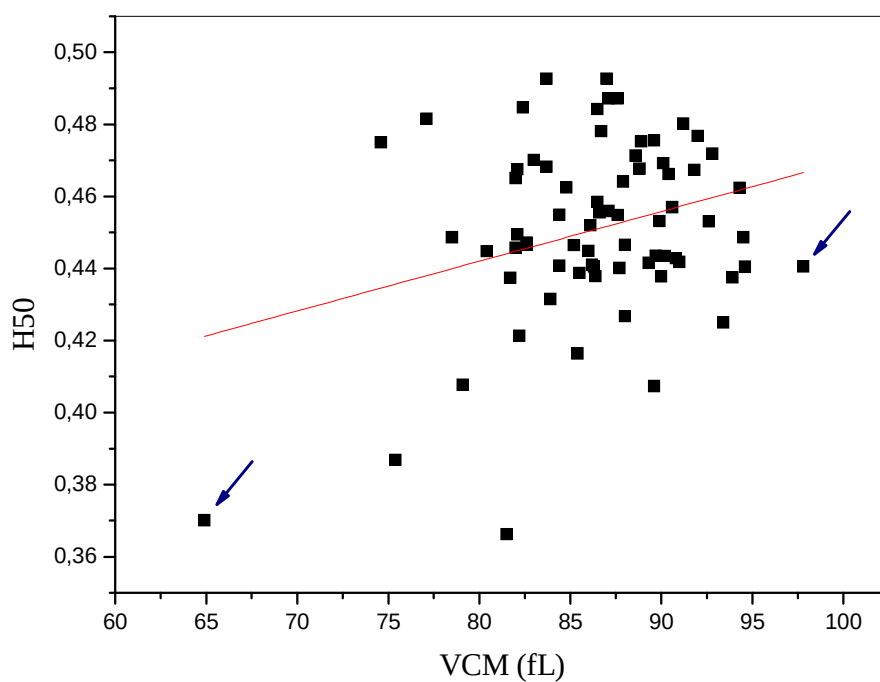


Figura 2.7. Relação entre valores de H_{50} e de volume corpuscular médio (VCM) dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0718$; $p = 0,0136$). Após exclusão dos pontos assinalados, a linha de regressão perdeu sua significância ($n = 69$; $r^2 = 0,0086$; $p = 0,2121$).

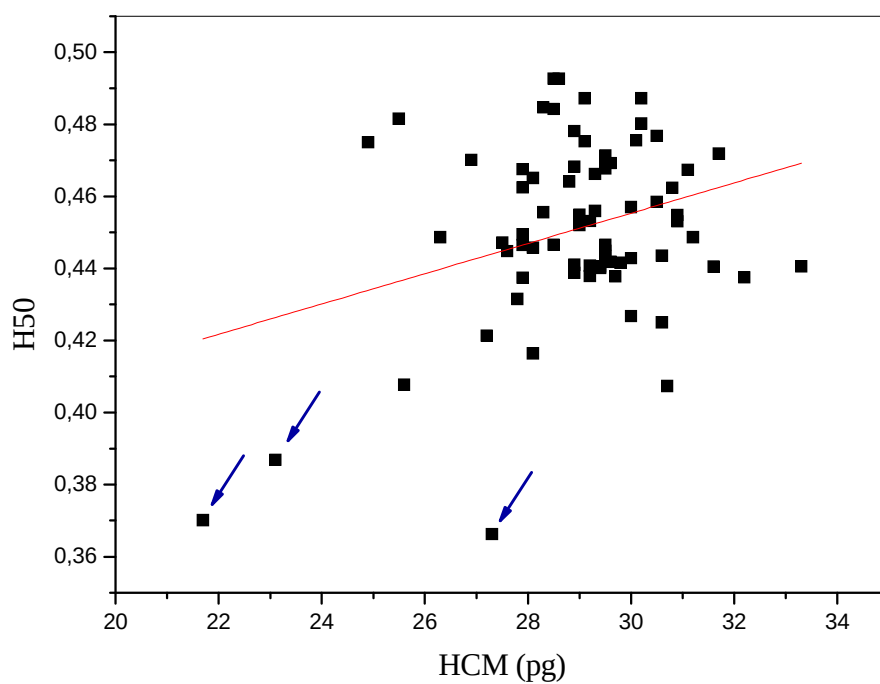


Figura 2.8. Relação entre valores de H_{50} e de hemoglobina corpuscular média (HCM) dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r = 0,0856$; $p = 0,0076$). Após exclusão dos pontos assinalados, a linha de regressão perdeu sua significância ($n = 68$; $r^2 = 0,0124$; $p = 0,6711$).

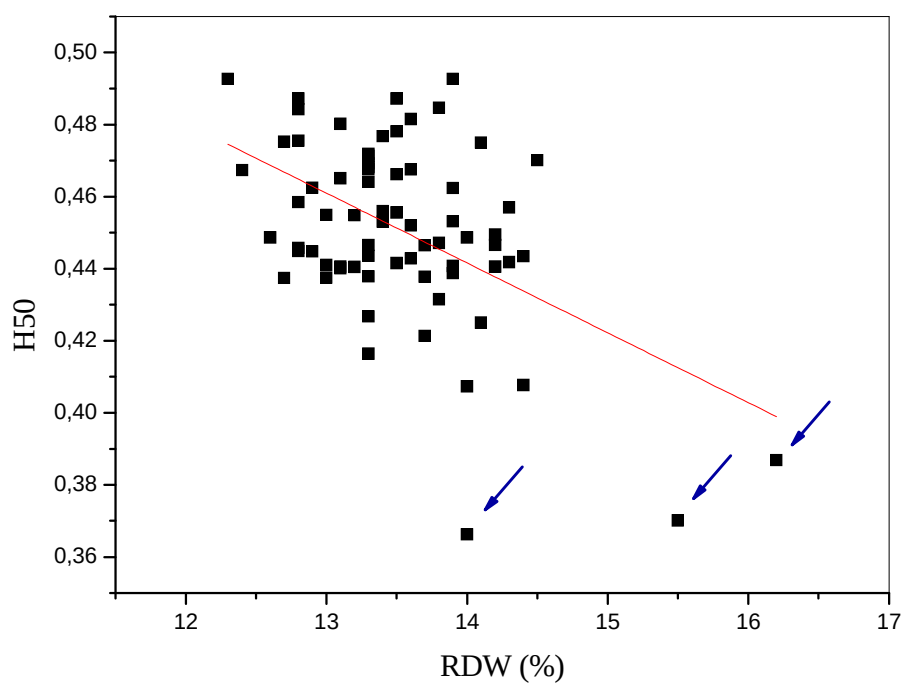


Figura 2.9. Relação entre valores de H_{50} e de RDW dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,2412$; $p = 0,0000$). A análise de regressão Após exclusão dos pontos assinalados, a linha de regressão permaneceu significativa ($n = 68$; $r^2 = 0,0613$; $p = 0,0235$).

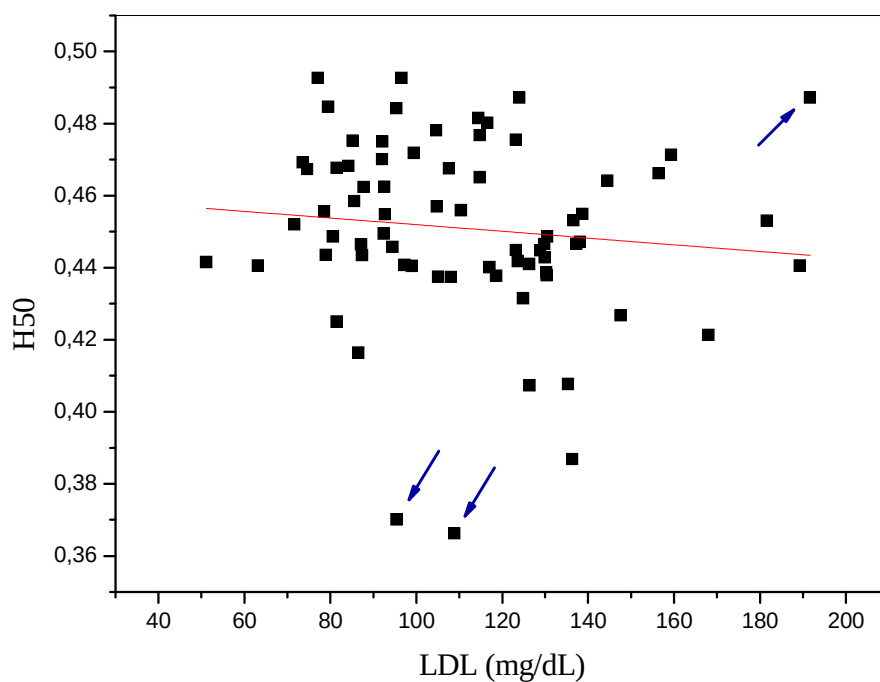


Figura 2.10. Relação entre valores de H_{50} e de LDL-C dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0026$; $p = 0,3694$). Após exclusão dos pontos assinalados, a linha de regressão apresentou significância ($n = 68$; $r^2 = 0,0483$; $p = 0,0397$).

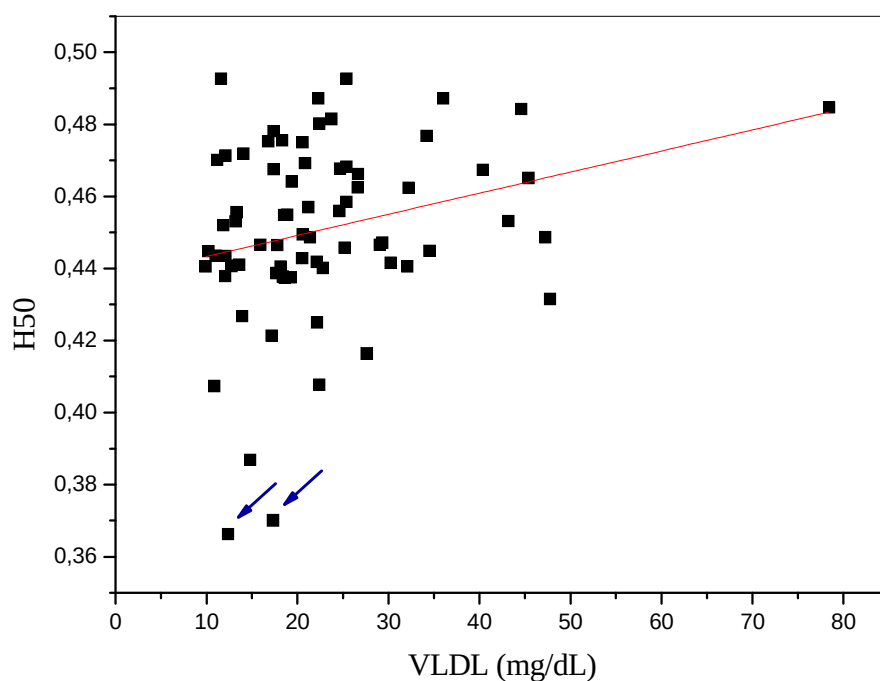


Figura 2.11. Relação entre valores de H_{50} e de VLDL-C dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0584$; $p = 0,0238$). Após exclusão dos pontos assinalados, a linha de regressão permaneceu significativa ($n = 69$; $r^2 = 0,0455$; $p = 0,0433$).

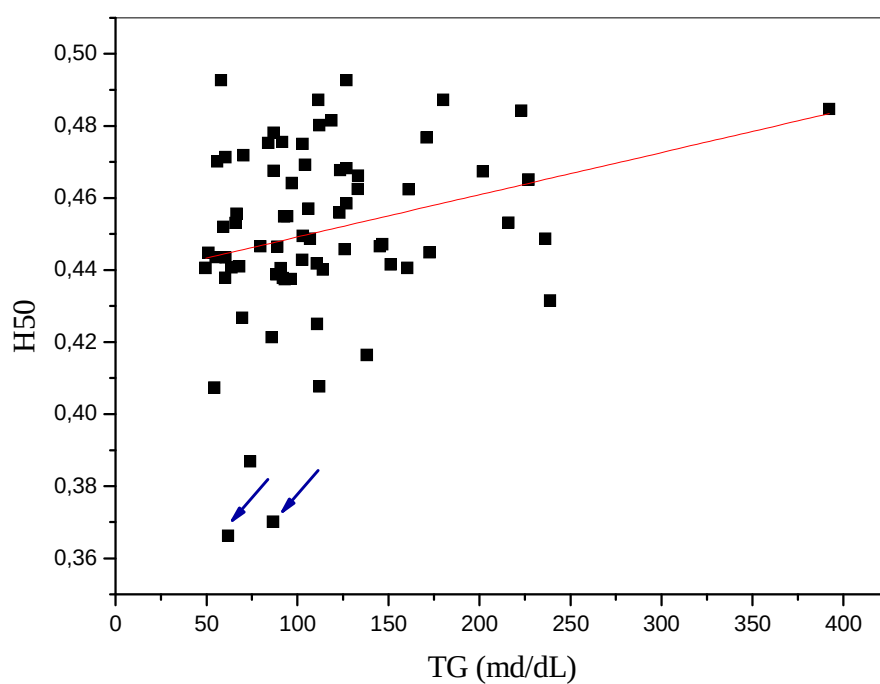


Figura 2.12. Relação entre os valores de H₅₀ e de TG dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0584$; $p = 0,0238$). Após exclusão dos pontos assinalados, a linha de regressão permaneceu significativa ($n = 69$; $r^2 = 0,0455$; $p = 0,0433$).

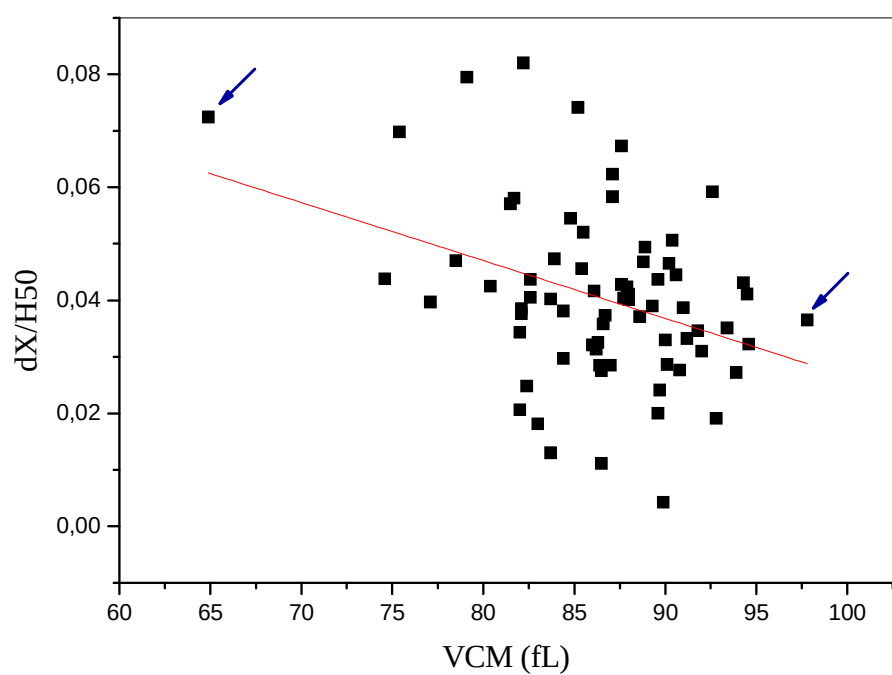


Figura 2.13. Relação entre os valores de dX/H_{50} e de VCM dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,1143$; $p = 0,0023$). Os pontos assinalados, embora díssonos, se encontram em situação de equilíbrio.

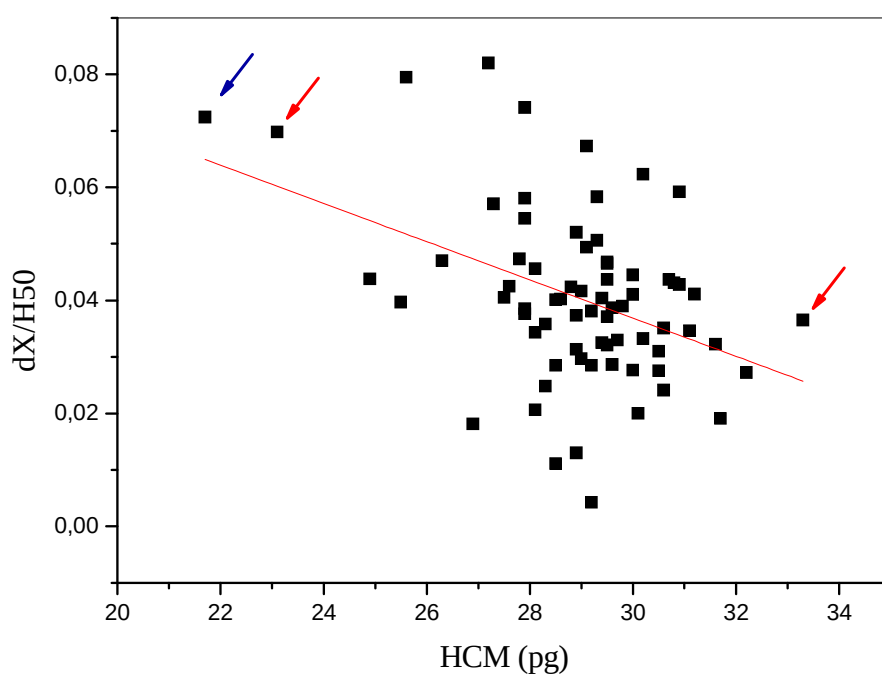


Figura 2.14. Relação entre os valores de dX/H_{50} e de HCM (hemoglobina corpuscular média) dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,1611$; $p = 0,0003$). Após exclusão do ponto assinalado em azul, a linha de regressão permaneceu significativa ($n = 70$; $r^2 = 0,1091$; $p = 0,0030$). Os pontos assinalados em vermelho, embora díssonos, se encontram em situação de equilíbrio.

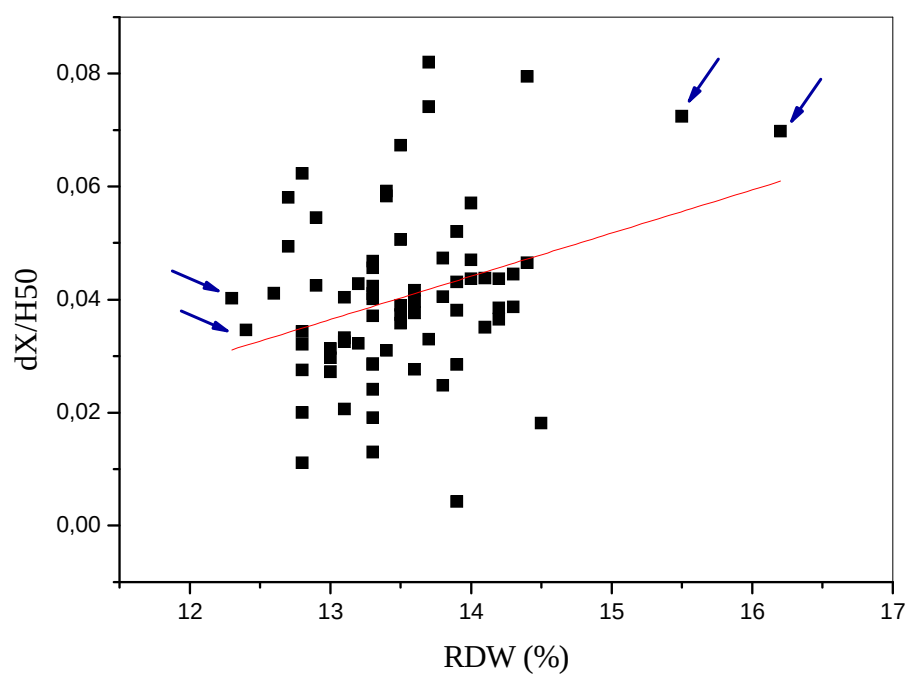


Figura 2.15. Relação entre os valores de dX/H_{50} e de RDW (*Red Cell Distribution Width*) dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0930$; $p = 0,0056$). Os pontos assinalados, embora díssonos, se encontram em situação de equilíbrio.

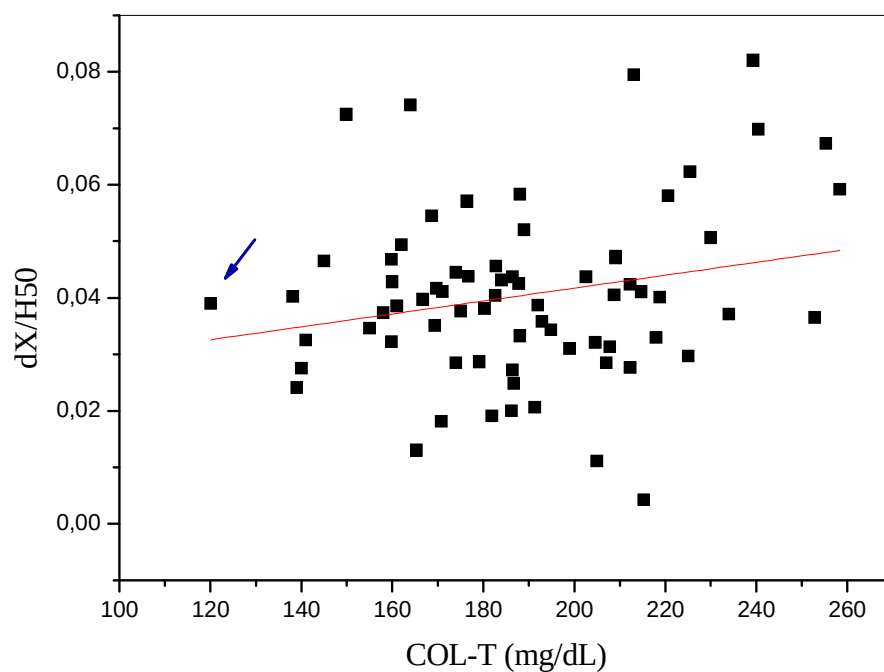


Figura 2.16. Relação entre os valores de dX/H_{50} e de Col-T (colesterol total) dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0357$; $p = 0,0622$). Após exclusão do ponto assinalado, a linha de regressão ainda apresentou significância ($n = 70$; $r^2 = 0,0382$; $p = 0,0573$).

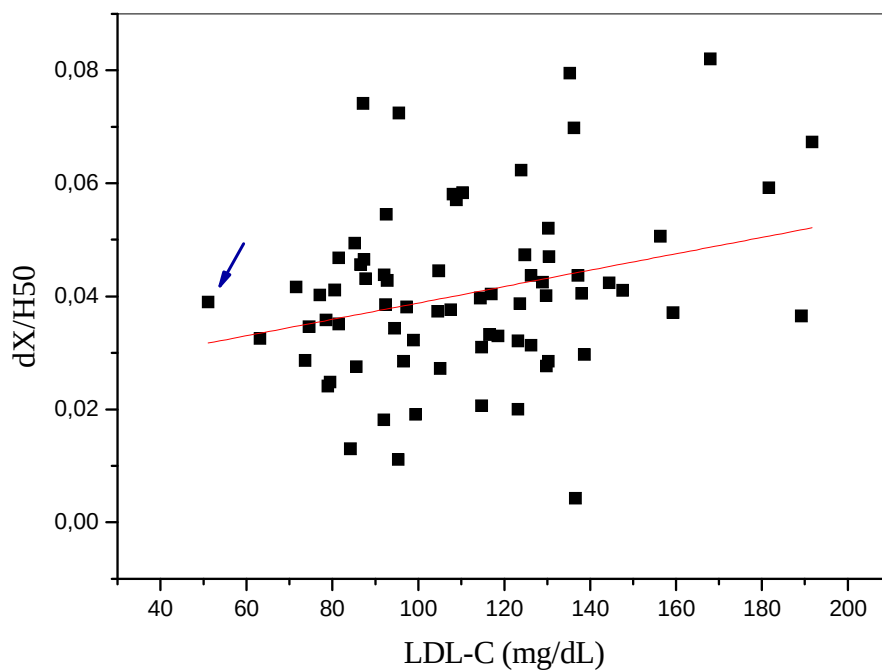


Figura 2.17. Relação entre os valores de dX/H50 e de LDL-C (LDL-colesterol) dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r^2 = 0,0634$; $p = 0,0193$). Após exclusão do ponto assinalado, a linha de regressão permaneceu significativa ($n = 70$; $r = 0,0666$; $p = 0,0175$).

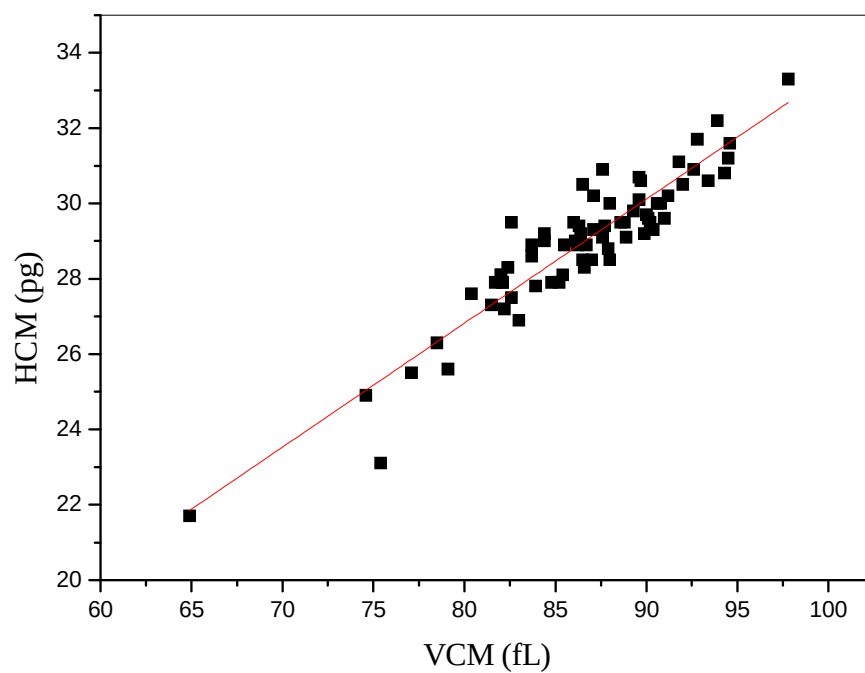


Figura 2.18. Relação entre os valores de HCM e de VCM dos voluntários. A linha de regressão mostrada foi obtida com todos os pontos experimentais ($n = 71$; $r = 0,8638$; $p = 0,0000$).

Tabela 2.1. Correlações simples entre dX e diversas variáveis hematológicas

Variável	<i>n</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i>	
RBC	71	0,0214	0,1162	
Hemoglobina	71	0,0107	0,6150	
Hematócrito	71	0,0145	0,9767	
VCM	71	(-) 0,0709	0,0141	*
HCM	71	(-) 0,1064	0,0032	*
CHCM	71	0,0058	0,4431	
<i>RDW</i>	71	(+) 0,0373	0,0582	*

* $p < 0,05$ indicando correlação estatisticamente significativa.

Tabela 2.2. Correlações simples entre dX e diversas variáveis bioquímicas

Variável	<i>n</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i>	
Col-T	71	(+) 0,0385	0,0553	*
	69	(+) 0,0644	0,0200	*
HDL-C	71	0,0132	0,7653	
LDL-C	71	(+) 0,0661	0,0173	*
	68	(+) 0,1345	0,0012	*
VLDL-C	71	0,0165	0,1449	
TG	71	0,0165	0,1449	
Glu	65	0,0083	0,4942	

* $p < 0,05$ indicando correlação estatisticamente significativa.

Tabela 2.3. Correlações simples entre H₅₀ e diversas variáveis hematológicas

Variável	<i>n</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i>	
RBC	71	0,0226	0,1102	
Hemoglobina	71	0,0112	0,6351	
Hematócrito	71	0,0137	0,8208	
VCM	71 69	(+) 0,0718 0,0086	0,0136 0,2121	*
HCM	71 68	(+) 0,0856 0,0124	0,0076 0,6711	*
CHCM	71	0,0127	0,1728	
RDW	71 68	(-) 0,2412 (-) 0,0613	0,0000 0,0235	* *

* *p* < 0,05 indicando correlação estatisticamente significativa.

Tabela 2.4. Correlações simples entre H₅₀ e diversas variáveis bioquímicas

Variável	<i>n</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i>	
Col-T	71	0,0095	0,5629	
HDL -C	71	0,0013	0,2993	
LDL -C	71	0,0026	0,3694	
	68	(-) 0,0483	0,0397	*
VLDL -C	71	(+) 0,0584	0,0238	*
	69	(+) 0,0455	0,0433	*
TG	71	(+) 0,0584	0,0238	*
	69	(+) 0,0455	0,0433	*
GLU	65	0,0002	0,3255	

* *p* < 0,05 indicando correlação estatisticamente significativa.

Tabela 2.5. Correlações simples entre dX/H₅₀ e diversas variáveis hematológicas

Variável	<i>n</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i>	
RBC	71	0,0309	0,0767	
Hemoglobina	71	0,0078	0,5012	
Hematócrito	71	0,0142	0,8804	
VCM	71	(-) 0,1143	0,0023	*
HCM	71	(-) 0,1611	0,0003	*
	70	(-) 0,1091	0,0030	*
CHCM	71	0,0040	0,2617	
RDW	71	(+) 0,0930	0,0056	*

* *p* < 0,05 indicando correlação estatisticamente significativa.

Tabela 2.6. Correlações simples entre dX/H₅₀ e diversas variáveis bioquímicas

Variável	<i>n</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i>	
Col-T	71	(+) 0,0357	0,0622	*
	70	(+) 0,0382	0,0573	
HDL-C	71	0,0115	0,6508	
LDL-C	71	(+) 0,0634	0,0193	*
	70	(+) 0,0666	0,0175	*
VLDL-C	71	0,0279	0,0872	
Triglicérides	71	0,0278	0,0878	
Glicemia	65	0,0046	0,4035	

* *p* < 0,05 indicando correlação estatisticamente significativa.

Tabela 2.7. Sentido das correlações entre parâmetros de estabilidade eritrocitária e diversas variáveis hematológicas e bioquímicas

Variáveis*	dX	H ₅₀	dX/H ₅₀
RBC	(+) N	(-) N	(+) L (p = 0,0767)
Hb	(-) N	(+) N	(-) N
Ht	(-) N	(+) N	(-) N
VCM	(-) S (p = 0,0141)	(+) N	(-) S (p = 0,0023)
HCM	(-) S (p = 0,0032)	(+) N	(-) S (p = 0,0030)
CHCM	(-) N	(+) N	(-) N
RDW	(+) S (p = 0,0582)	(-) S (p = 0,0235)	(+) S (p = 0,0056)
Col-T	(+) S (p = 0,0200)	(-) N	(+) S (p = 0,0573)
HDL-C	(+) N	(-) N	(+) N
LDL-C	(+) S (p = 0,0012)	(-) S (p = 0,0397)	(+) S (p = 0,0175)
VLDL-C	(-) N	(+) S (p = 0,0433)	(-) L (p = 0,0872)
TG	(-) N	(+) S (p = 0,0433)	(-) L (p = 0,0878)
Glu	(+) N	(-) N	(+) N

S = correlação significativa ($p < 0,05$); N = correlação não significativa ($p > 0,05$); L = correlação limítrofe ($p \cong 0,05$); (+) = correlação positiva (aumento dos valores da variável é acompanhado de aumento nos valores do parâmetro de estabilidade); (-) = correlação negativa (aumento dos valores da variável é acompanhado de redução nos valores do parâmetro de estabilidade).

Tabela 2.8. Grupos organizados para análise estatística multivariada: correlações canônicas (grupos 1, 2 e 3) e análise de trilha (grupos 4 e 5)

Grupo	Variáveis*	Característica do grupo
1	RBC, RDW	Variáveis hematológicas cujas correlações simples com dX e dX/H ₅₀ foram positivas
2	Col-T, HDL-C, LDL-C, Glu	Variáveis bioquímicas cujas correlações simples com dX e dX/H ₅₀ foram positivas
3	Hb, HT, VCM, HCM, CHCM	Variáveis hematológicas cujas correlações simples com dX e dX/H ₅₀ foram negativas
4	Col-T, HDL-C, LDL-C, Glu, RBC, RDW	Variáveis cujas correlações simples com dX/H ₅₀ foram positivas
5	VLDL-C, Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM	Variáveis cujas correlações simples com dX/H ₅₀ foram negativas

*Col-T: colesterol total; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low density lipoprotein cholesterol; Glu: glicemia; RBC: red blood cells; Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: red cell distribution width.

Tabela 2.9. Coeficientes de correlações canônicas entre os pares canônicos estimados para os parâmetros de estabilidade dX e dX/H₅₀ e variáveis do grupo 1 (RBC e RDW)

Variáveis *	Par canônico	
	Primeiro	Segundo
dX	(+) 0,2436	(+) 0,9699
dX/H ₅₀	(+) 0,9996	(-) 0,0274
RBC	(+) 0,2684	(+) 0,9633
RDW	(+) 1,0000	(+) 0,0020
r	0,9262	0,1365
Significância	0,0000	0,2597

*RBC: red blood cells; RDW: red cell distribution width.

Tabela 2.10. Coeficientes de correlações canônicas entre os pares canônicos estimados para os parâmetros de estabilidade dX e dX/H₅₀ e as variáveis do grupo 2 (Col-T, HDL-C, LDL-C e Glu)

Variáveis*	Par canônico	
	Primeiro	Segundo
dX	(+) 0,9139	(-) 0,4059
dX/H ₅₀	(+) 0,5945	(+) 0,8041
Col-T	(+) 0,6702	(-) 0,0393
HDL-C	(+) 0,1484	(+) 0,3192
LDL-C	(+) 0,7923	(-) 0,3110
Glu	(+) 0,3295	(+) 0,8106
r	0,3702	0,1091
Significância	0,2255	0,8504

*Col-T: colesterol total; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; Glu: glicemia.

Tabela 2.11. Coeficientes de correlações canônicas entre os pares canônicos estimados para os parâmetros de estabilidade dX e dX/H₅₀ e as variáveis do grupo 3 (Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM)

Variáveis *	Par canônico	
	Primeiro	Segundo
dX	(+) 0,3353	(+) 0,9421
dX/H ₅₀	(+) 0,9924	(-) 0,1230
Hb	(-) 0,1931	(-) 0,0225
Ht	(+) 0,0448	(-) 0,0368
VCM	(-) 0,3913	(-) 0,4445
HCM	(-) 0,0693	(-) 0,3848
CHCM	(-) 0,8981	(+) 0,3493
r	0,7927	0,4443
Significância	0,0000	0,5817

* Hb: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 2.12. Coeficientes de trilha dos efeitos diretos, indiretos (das variáveis do grupo 4) e totais sobre o parâmetro de estabilidade dX/H_{50}

Variável	Efeito	Via	dX/H_{50}	Variável	Efeito	Via	dX/H_{50}
Col-T	Direto		(+) 0,0068	HDL-C	Direto		(+) 0,1142
	Indireto	HDL-C	(+) 0,2087		Indireto	Col-T	(+) 0,0012
		LDL-C	(+) 0,0079			LDL-C	(-) 0,0017
		Glu	(+) 0,0026			Glu	(-) 0,0027
		RBC	(-) 0,0027			RBC	(-) 0,0087
		RDW	(+) 0,1086			RDW	(-) 0,0416
	Total		(+) 0,1440		Total		(+) 0,0606
LDL-C	Direto		(+) 0,0091	Glu	Direto		(+) 0,0188
	Indireto	Col-T	(+) 0,0059		Indireto	Col-T	(+) 0,0009
		HDL-C	(-) 0,2142			HDL-C	(-) 0,0166
		Glu	(+) 0,0021			LDL-C	(+) 0,0010
		RBC	(+) 0,0001			RBC	(+) 0,0007
		RDW	(+) 0,1512			RDW	(+) 0,1387
	Total		(+) 0,1471		Total		(+) 0,1436
RBC	Direto		(+) 0,3006	RDW	Direto		(+) 0,9177
	Indireto	Col-T	(-) 0,0006		Indireto	Col-T	(+) 0,0008
		HDL-C	(-) 0,0332			HDL-C	(-) 0,0052
		LDL-C	(+) 0,0000			LDL-C	(+) 0,0015
		Glu	(+) 0,0004			Glu	(+) 0,0028
		RDW	(+) 0,2481			RBC	(+) 0,0081
	Total		(+) 0,2448		Total		(+) 0,9258

Tabela 2.13. Coeficientes de trilha dos efeitos diretos, indiretos (via variáveis do grupo 5) e totais sobre o parâmetro de estabilidade dX/H_{50}

Variável	Efeito	Via	dX/H_{50}	Variável	Efeito	Via	dX/H_{50}
VLDL-C	Direto		(-) 0,0063	Hb	Direto		(-) 2,0031
	Indireto	Hb	(-) 0,3636		Indireto	VLDL-C	(-) 0,0011
		Ht	(+) 0,3179			Ht	(+) 1,9109
		VCM	(+) 0,0279			VCM	(-) 0,2399
		HCM	(+) 0,0027			HCM	(+) 0,2446
		CHCM	(-) 0,0640			CHCM	(-) 0,0620
	Total		(-) 0,0853		Total		(-) 0,1507
Ht	Direto		(+) 1,9830	VCM	Direto		(-) 1,1915
	Indireto	VLDL-C	(-) 0,0010		Indireto	VLDL-C	(+) 0,0001
		Hb	(-) 1,9302			Hb	(-) 0,4034
		VCM	(-) 0,2553			Ht	(+) 0,4249
		HCM	(+) 0,1634			HCM	(+) 0,8762
		CHCM	(+) 0,0773			CHCM	(+) 0,0101
	Total		(+) 0,0372		Total		(-) 0,2835
HCM	Direto		(+) 0,9417	CHCM	Direto		(-) 0,5531
	Indireto	VLDL-C	(-) 0,0000		Indireto	VLDL-C	(-) 0,0007
		Hb	(-) 0,5203			Hb	(-) 0,2246
		Ht	(+) 0,3442			Ht	(-) 0,2771
		VCM	(-) 1,1086			VCM	(+) 0,0218
		CHCM	(-) 0,1809			HCM	(+) 0,3081
	Total		(-) 0,5241		Total		(-) 0,7256

Tabela 2.14. Coeficientes de trilha dos efeitos diretos, indiretos (via influência de todas as variáveis bioquímicas e hematológicas) e totais do HCM sobre os parâmetros de estabilidade dX e H₅₀ isoladamente

Variável	Efeito	Via	dX	Variável	Efeito	Via	H ₅₀
HCM	Direto		(-) 0,2039	HCM	Direto		(-) 1,8605
	Indireto	Col-T	(-) 0,0074			Col-T	(-) 0,0287
		HDL-C	(+) 0,0168			HDL-C	(+) 0,0573
		LDL-C	(-) 0,0026			LDL-C	(-) 0,0184
		VLDL-C	(-) 0,0013			VLDL-C	(-) 0,0015
		TG	(-) 0,0013			TG	(-) 0,0015
		Glu	(-) 0,0056			Glu	(+) 0,0116
		RBC	(+) 0,4062			RBC	(+) 0,7332
		Hb	(-) 1,0339			Hb	(+) 0,1315
		Ht	(+) 0,8373			Ht	(+) 0,1412
		VCM	(-) 0,6858			VCM	(+) 0,7563
		CHCM	(+) 0,3025			CHCM	(+) 0,1343
		RDW	(+) 0,0302			RDW	(+) 0,2470
	Total		(-) 0,3452		Total		(+) 0,3141

Referências

ABREU, M. A.; VETTER, D. A análise de relações entre conjuntos de variáveis na matriz geográfica: correlação canônica. In: FAISSOL, S. **Tendências Atuais na Geografia Urbano/Regional: teorização e quantificação**. Rio de Janeiro: IBGE, 1978. p. 133-144.

ALOULO, I.; VARLET-MARIE, E.; MERCIER, J.; BRUN, J.F. Hemorheological disturbances correlate with the lipid profile but not with the NCEP-ATPIII score of the metabolic syndrome. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.35, p.207-212, 2006.

ARBUSTINI, E. Total erythrocyte membrane cholesterol. **Journal of the American College of Cardiology**, v.49, .n.21, p. 2090-2092, 2007.

BERNARDINO NETO, M. **Origem da Estabilização de Eritrócitos por Sorbitol**. Uberlândia, 2006. 66f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Nilson Penha-Silva (Orientador).

BLUM, C.B. Comparison of properties of four inhibitors on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. **The American Journal of Cardiology**, v.73, p.3D-11D, 1994.

BRETSCHER, M. S.; MUNRO, S. Cholesterol and the Golgi apparatus. **Science**. v.261, p.280-1281, 1993.

CALISKAN, S.; CALISKAN, M.; KURALAY, B.; ÖNVURAL, B. Effect of simvastatin therapy on blood and tissue ATP levels and erythrocyte membrane lipid composition. **Research in Experimental Medicine**, v.199, p.189-194, 2000.

CHABANEL, A.; FLAMM, M.; SUNG, K.L.; LEE, M.M.; SCHACHTER, S.L.; CHIEN, S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. **Biophysical Journal**, v.44, p.171-176, 1983.

COOPER, R.A. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital**, v.297, n.7, p.371-377, 1977.

COOPER, R.A. Anemia with spur-cells: a red cell defect acquired in serum and modified in the circulation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.48, p.1820-1831, 1969.

COOPER, R.A.; ARNER, E.C.; WILEY J.S.; SHATTIL, J.S. Modifications of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersion. **The Journal of Clinical Investigation**, v.55, p.115-125, 1975.

COOPER, R.A.; DUROCHER, J.R.; LESLIE, M.H. Increased microviscosity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v.60, p.115-121, 1977.

CORSINI, A; BELLOSTA, S; BAETTA, R; FUMAGALLI, R; PAOLETTI, R; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v.84, p.413-428, 1999.

CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.48, p.24-32, 1993.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos Biométricos Aplicados no Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV-Imprensa Universitária, 390p, 1994.

CUNHA, C.C.; ARVELOS, L.R.; COSTA, J.O.; PENHA-SILVA, N. Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, p. 341-347, 2007.

DE FREITAS REIS, F.G. **Influência de Glicerol e Sorbitol Sobre a Dependência Térmica da Estabilização e Desestabilização in Vitro de Eritrócitos Humanos**. 2007. 74f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2007. Nilson Penha-Silva (Orientador).

DE FREITAS, M.V.; NETTO, RDE C.; DA COSTA HUSS, J.C.; DE SOUZA, T.M.; COSTA, J.O.; FIRMINO, C.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p.219-24, 2008.

DE FREITAS, M.V.; OLIVEIRA, M.R.; DOS SANTOS, D.F.; NETTO, R.C.M.; FENELON, S.B.; PENHA-SILVA, N. Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. **Journal of Membrane Biology**, v. 233, p. 127-134, 2010.

DWIGHT, J.F.; MENDES-RIBEIRO, A.C.; HENDRY, B.M. Effects of HMG-CoA reductase inhibition on erythrocyte membrane cholesterol and acyl chain composition. **Clinica Chimica Acta**, v.256, p.53-63, 1996.

FINOTTI, C.J. **Dependência Térmica da Osmoestabilização de Eritrócitos por Glicerol**. 2006. 59f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, 2006. Nilson Penha-Silva (Orientador).

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

GARCETTI, G.G.; TRANQUILLI, A.L.; CUGINI, A.M.; MAZZANTI, L.; CESTER, N.; ROMANINI, C. Altered lipid composition, increased lipid peroxidation and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.25, n.6, p.352-355, 2001.

GARCÍA, J.J.; MARTÍNEZ-BALLARÍN, E.; MILLÁN-PLANO, S.; ALLUÉ, J.L.; ALBANDEA, C.; FUENTES, L.; ESCANERO, J.F. Effects of trace elements on membrane fluidity. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.19, n.1, p.19-22, 2005.

GOUVÊA-E-SILVA, L.F. **Caracterização da Estabilização de Eritrócitos por Etanol**. Uberlândia, 2006, 53f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Nilson Penha-Silva (Orientador).

HOEFNER, D. M.; HODEL, S.D.; O'BRIEN, J.F.; BRANUM, E.L.; SUN, D.; MEISSNER, I.; McCONNELL, J.P. Development of a Rapid, Quantitative Method for LDL Subfractionation with Use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. **Clinical Chemistry**, v.47, n.2, p.266-274, 2001.

HUBBELL, W.L.; McCONNELL, H.M. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v.93, p.314-326, 1971.

JAMIESON, G. A.; ROBINSON, D.M. **Mammalian Cell Membranes**, vol.2., Butterworth, London, 1977.

KOLODIE, F.D.; BURKE, A.P.; NAKAZAWA, G.; CHENG, Q.; XU X.; VIRMANI, R. Free cholesterol in atherosclerotic plaques: where it come from? **Current Opinion in Lipidology**, v.18, p.500-507. 2007.

KOLODIE, F.D.; GOLD H.K.; BURKE A.P.; FOWLER, D.R.; KRUTH, H.S.; WEBER, D.K.; FARB, A.; GUERRERO, L.J.; HAYASE, M.; KUTYS, R.; NARULA, J.; FINN A.V.; VIRMANI, R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. **New England Journal of Medicine**, v.349, p.2316-2325, 2003.

KOTER, M.; BRONCEL, M.; CHOJNOWSKA-JEZIERSKA, J.; KLIKCYNSKA, K.; FRANIAK, I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.58, p.501-506, 2002.

LEMMICH, J.; MORTENSEN, K.; IPSEN, J.H.; HONGER, T.; BAUER, R.; MOURITSEN O.G. The effect of cholesterol in small amounts on lipidbilayer softness in the region on the main phase transition. **European Biophysics Journal**, v.25, p.293-304, 1997

LI, C.C. **Path Analysis: a Primer**. Boxwood: Pacific Grove, 346p, 1975.

LIPID. The long-term intervention with pravastatin in ischemic disease study group: prevention cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and broad range of initial cholesterol levels. **The New England Journal of Medicine**, v.339, p.1349-1357, 1998.

MAEDA, N.; CICHA, I.; TATEISHI N.; SUZUKI, Y. Triglyceride in plasma: prospective effects on microcirculatory functions. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.34, p.341-346, 2006.

MARTINEZ, M.; VAYA, A.; GIL, L.; MARTI, R.; DALMAU J.; AZNAR, J. The cholesterol/phospholipid ratio of the erythrocyte membrane in children with familial hypercholesterolemia. Its relationship with plasma lipids and red blood cell aggregability. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.18, p.259-263, 1998.

MARTINEZ, M.; VAYA, A.; MARTI, R.; GIL, L.; LIUCH, J.; CARMENA, R.; AZNAR, J. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and haemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. **Thrombosis Research**, v.83, p.375-388, 1996.

MCNEIL, P.L.; STEINHARDT, R.A. Loss, restoration and maintenance of plasma membrane integrity. **The Journal of Cell Biology**, v.137, p.1-4, 1997

MICHALSKA-MALECKA, K.; SLOWINSKA, L.; DORECKA, M.; ROMANIUK, W. Correlations in some pathogenetic factors and values of hemorheological parameters in age-related macular degeneration. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.38, n.3, p 209-216, 2008.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K. Membranas: estrutura, montagem e função. In: Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. **Harper's Biochemistry**. 9th. São Paulo: Atheneu Editora, 2002.

NASSIEF, A.; MARSH, J.D. Statins therapy for stroke prevention. **Stroke**, v.39, p.1042-1048, 2008.

NIKOLIC, M.; STANIC, D.; BARICEVIC, I.; JONES, D.R.; NEDIC, O.; NIKETIC, U. Efflux of cholesterol and phospholipids derived from the haemoglobin-lipid adduct in human red blood cells into plasma. **Clinical Biochemistry**, v.40, p.305-309, 2007.

OKADA, M.; MATSUTO, T.; OBAYASHI, K. Lipid Analyses for the Management of Vascular Diseases. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.4, n.11, p.190-199, 2004.

PENHA-SILVA, N.; ARVELOS, L.R.; CUNHA, C.C.; AVERSI-FERREIRA, T.A.; GOUVÊA-E-SILVA, L.F.; GARROTE-FILHO, M.S.; FINOTTI, C.J.; BERNARDINO-NETO, M.; DE FREITAS REIS, F.G.

Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 23-29, 2008.

PENHA-SILVA, N.; FIRMINO, C.B.; REIS, F. G. F.; HUSS, J. C. C.; SOUZA, T.M.T.; DE FREITAS, M.V.; NETTO, R.C.M. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 128, p. 444–449, 2007.

RABINI, R.A.; POLENTA, M.; STAFFOLANI, R.; TOCCHINI, M.; SIGNORI, R.; TESTA, I.; MAZZANTI, L. Effect of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors on the functional properties of erythrocytes membranes. **Experimental and Molecular Pathology**, v.59, p.51-57, 1993.

RAFFY, S.; TEISSIÉ, J. Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content. **Biophysical Journal**, v.76, p.2072-2080, 1999

SACKS, F.M.; PFEFFER, M.A.; MOYE, L.A.; ROULEAU, J.L.; RUTHERFORD, J.D.; COLE, T.G.; BROWN, L.; WARNICA, J.W.; ARNOLD, J.M.; WUN, C.C.; DAVIS, B.R.; BRAUNWALD, E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. **The New England Journal of Medicine**, v.335, p.1001-1009, 1996.

SCHICK, B.P.; SCHICK, P.K. Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.833, p.281-290, 1985.

SEHAYEK, E.; BUTBUL, E.; AVNER, R. Enhanced cellular metabolism of very low lipoprotein by simvastatin : a novel mechanism of action of HMG-CoA reductase inhibitors. **European Journal of Clinical Investigation**, v.24, p.173-178, 1994.

SEKI, K.; SUMINO, H.; NARA, M.; ISHIYAMA, N.; NISHINO M.; MURAKAMI, M. Relationships between blood rheology and age, body mass index, blood cell count, fibrinogen, and lipids in healthy subjects. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.34, p.401-410, 2006.

SENA, A.; PEDROSA, R.; MORAIS, M.G. Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v.250, p.754-55, 2003.

SHATTIL, J.S.; COOPER, R.A. Membrane microviscosity and human platelet function. **Biochemistry**, v.15, p.4832-4837, 1976.

SHATTIL, S.J.; ANAYA-GALINDO, R.; BENNETT, J.; COLMAN, R.W.; COOPER, R.A. Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. **Journal of Clinical Investigation**, v.55, p.636-643, 1975.

SHINITZKY, M.; INBAR, M. Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.433, p.133-149, 1976.

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation. A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.71, p.522-525, 1974.

SINHA, A.K.; SHATTIL, S.J.; COLMAN, R.W. Cyclic AMP metabolism in cholesterol-rich platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v.252, p.3310-3314, 1977.

SPENGLER, M.I.; BERTOLUZZO, S.M.; CATALANI, G.; RASIA, M.L. Study on membrane fluidity and erythrocyte aggregation in equine, bovine and human species. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.38, n.3, p.171-176, 2008.

TSUDA, K.; NISHIO, I. Membrane fluidity and hypertension. **American Journal of Hypertension**, v.16, n.3, p.259-261, 2003.

TZIAKAS, D.N.; KASKI, J.C.; CHALIKIAS, G.K.; ROMERO, C; FREDERICKS, S.; TENTES, I.K.; KORTSARIS, A.X.; HATSERAS D.I.; HOLT, D.W. Total cholesterol content of erythrocyte membranes is increased in patients with acute coronary syndrome a new marker of clinical instability. **Journal of the American College of Cardiology**, v.49, n.21, p.2081-2089, 2007.

VAYÁ, A.; MARTINEZ, M.; CARMENA R.; AZNAR J. The lipid composition of red blood cells and their hemorheological behavior in patients with primary hyperlipoproteinemia. **Clinical Hemorheology**, v.13, p.447-457, 1993

VELCHEVA, I.; ANTONOVA, N.; DIMITROVA, V.; DIMITROV, N.; IVANOV, I. Plasma lipids and blood viscosity in patients with cerebrovascular disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.35, p.155-157, 2006.

WILEY, J.S.; COOPER, R.A. Inhibition of cation cotransport by cholesterol enrichment of human red cell membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.413, p.425-431, 1975.

WRIGTH, S. Correlation and causation. **Journal of Agricultural Research**, v.20, p.557-585, 1921.

WRIGTH, S. The theory of path coefficients – a replay to Nile's criticism. **Genetics**, v.8, p.239-255, 1923.

YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.822, p.267-287, 1985.

ZILBERMAN-KRAVITS, D.; HARMAN-BOEHM, I.; SHUSTER, T.; MEYERSTEIN, N. Increased red cell aggregation is correlated with HbA1C and lipid levels in type 1 but not type 2 diabetes. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.35, p.463-471, 2006.