



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

**ANÁLISE MULTIVARIADA DA ESTABILIDADE OSMÓTICA DE ERITRÓCITOS  
EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS DOS GÊNEROS MASCULINO E FEMININO**

**Aluno**

Mario da Silva Garrote Filho

**Orientador**

Prof. Dr. Nilson Penha Silva

**UERLANDIA, MG**

**2014**



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

**ANÁLISE MULTIVARIADA DA ESTABILIDADE OSMÓTICA DE ERITRÓCITOS  
EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS DOS GÊNEROS MASCULINO E FEMININO**

**Aluno**

Mario da Silva Garrote Filho

**Orientador**

Prof. Dr. 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)**

**UERLANDIA, MG**

**2014**



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

**ANÁLISE MULTIVARIADA DA ESTABILIDADE OSMÓTICA DE ERITRÓCITOS  
EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS DOS GÊNEROS MASCULINO E FEMININO**

**ALUNO:** Mario da Silva Garrote Filho

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Nilson Penha Silva (UFU)

**Examinadores:** Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Profa. Dra. Luciana Karen Calábria (UFU)

Prof. Dr. Morun Bernardino Neto (USP)

Profa. Dra. Valéria Troncoso Baltar (UFF)

**Data da defesa:** 30/10/2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as normas do PPGGB para o formato da tese foram contempladas.

---

**Prof. Dr. Nilson Penha Silva**

(Orientador)

*Não vá até a onde a trilha pode te levar. Ao invés disso, vá por onde não há trilha e deixe um vestígio.*

**Ralph Waldo Emerson**

*O único caminho para desvendar os limites do possível é aventurar-se um pouco além dele, adentrando o impossível.*

**Arthur C. Clarke**

## DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que estão em busca do conhecimento e que se dispõem cordialmente a compartilhá-lo com aqueles que também estão nessa mesma jornada.

## AGRADECIMENTOS

Ao **professor Dr. Nilson Penha Silva** por todo o seu apoio e consideração. Sou muito grato por acreditar em minhas potencialidades quando nem mesmo eu acreditava, e também por ajudar a desenvolvê-las. É para mim um grande exemplo de pessoa inteligente, humilde e paciente.

Aos meus pais **Mario da Silva Garrote** e **Lauricesa Rosa Garrote**, assim como à minha irmã **Marília da Silva Garrote** por todo o amor, carinho e compreensão e também por eventual ajuda financeira em momentos de dificuldade. São pessoas que, apesar da distância que nos separa, estão sempre presentes na minha vida.

Ao **Morun Bernardino Neto**, por sua persistência em aprender análise multivariada e também pela boa vontade em compartilhar seus conhecimentos. Ele abriu as portas do laboratório para um novo mundo de possibilidades para análise de dados. Os seus primeiros passos nesse novo mundo foram muito importantes para que eu seguisse o meu próprio caminho.

À **Lúbia Cristina Fonseca**, por incansavelmente me apoiar a escrever diversos artigos, em especial o da qualificação. Sou grato por ler os meus manuscritos atentamente e pelas suas contribuições valiosas para que fossem melhorados. Além disso, a sua empolgação em aprender e em realmente entender o que está lendo são cativantes. É uma pena que, oficialmente, não faça mais parte da nossa equipe. Com certeza a nossa produtividade seria bem maior se ainda fosse uma integrante efetiva do LABFIQ.

À **Lara Ferreira Paraíso**, por sua contribuição inestimável na obtenção dos dados experimentais. Também sou bastante grato por todos os voluntários que participaram desta pesquisa.

Ao **Luiz Carlos de Oliveira Júnior**, por seu empenho em me fazer ter ânimo suficiente para superar as adversidades com as quais tenho que lidar diariamente. Esse ânimo também tem me ajudado a continuamente buscar novos desafios importantes para o meu crescimento pessoal e profissional.

A **Alice Vieira** pela sua alegria contagiante, ajuda nos experimentos e disposição a aprender. Todas essas qualidades contribuem para um ambiente de trabalho bastante motivador. É uma pessoa com um grande potencial e que já está contribuindo muito na realização das atividades do laboratório.

A toda a equipe do LABFIQ pelo excelente ambiente de trabalho. Sou grato pelo apoio recebido e principalmente pela oportunidade que me deram em ajudá-los. Dentre eles se destacam: **Letícia Arvelos, Lucas Cunha, Márcia Aires, Corina Cardoso, Rita Netto, Mariana Vaini e Liandra Bernardes.**

À **Maria Conceição Souto**, que apesar de trabalhar conosco há pouco tempo, tem feito importantes contribuições ao LABFIQ. Também sou grato pela sua presença de espírito e disposição em tornar o LABFIQ cada vez melhor.

Ao **Lucas Tadeu Andrade** pelo seu interesse e empenho em aprender estatística a partir do que tenho a ensinar. Esse conhecimento é como uma tocha olímpica: o ideal é que outras pessoas o adquiram para que assim a sua luz se mantenha sempre acesa. Espero que outras pessoas do LABFIQ também se dediquem de coração a essa tarefa.

À **Carla Andrade** e ao **Mateus Bergamo**, por solicitarem a minha ajuda na análise dos dados, que eram diferentes daqueles com os quais eu estava habituado. Isso me motivou a aprender ainda mais. Torço para que outras pessoas também compartilhem comigo os seus dados, e que de preferência sejam bem diversificados, para que assim eu tenha motivação adicional para seguir ainda mais longe.

Ao **Ubirajara Coutinho Filho**, por todo o seu empenho em viabilizar o estudo da resistência mecânica de eritrócitos, por meio da elaboração de aparelhos destinados a essa finalidade. A sua parceria tem muito a contribuir para o desenvolvimento e diversificação das pesquisas realizadas no LABFIQ.

Aos autores de excelentes materiais sobre estatística e em especial análise de trilha usando o programa AMOS. Esses materiais foram feitos com muita competência e disponibilizados gratuitamente. Destacam-se **Karl L. Wuensch** e

**Daniel J. Denis** pelos excelentes textos, assim como **James Gaskin** e **Josimar Costa** pelas magníficas vídeo-aulas.

À **Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves**, pela sua amizade de longa data. É uma pessoa por quem tenho bastante consideração e pela qual sou muito grato por não se esquecer de mim.

Sou grato à companhia de **Ricardo Correa** e **Antenor Cardoso**, pela amizade e por me acompanhar nas corridas apesar da minha lentidão. Sou muito grato pela sua ajuda na Volta da Pampulha de 2013. Eu percorri 18 Km quando normalmente eu nem conseguia correr 10 Km. Isso é para mim uma referência de que o impossível é possível.

Sou especialmente grato à **Alice Torsian**, pelo apoio nos longões, que é feito com muita dedicação, e também pela sua amizade. É marcante para mim o seu apoio quando me acidentei devido a uma síncope que tive enquanto corria em um desses longões.

Ao **Durval Teixeira**, por compartilhar comigo a sua vasta sabedoria, a qual tem me permitido abrir a minha mente para novas possibilidades de enxergar a realidade. O trabalho por ele desenvolvido também tem me ajudado muito especialmente por mostrar que Deus está em nós mesmos.

A **CAPES**, pela bolsa que me foi concedida, a qual me foi indispensável para que eu pudesse permanecer em Uberlândia e também me dedicar integralmente ao doutorado. Também sou grato ao **Governo Federal** pelo investimento em Ciência e Tecnologia que tem sido feito nos últimos anos.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU.

E a todas as demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

**APOIO**



**Laboratório de Biofísicoquímica**



**Universidade Federal de Uberlândia**



**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais**



**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**



**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>5</b>
1.1. ERITRÓCITO .....	6
1.1.1 Estrutura e função .....	6
1.1.2 Estabilidade .....	12
1.1.3 Fatores que afetam a estabilidade.....	19
1.2. Estatística.....	25
1.2.1. Modelo Linear Generalizado.....	25
1.2.2. Análise de trilha .....	32
Referências .....	45
<b>2. ERYTHROCYTE STABILITY EXPLAINED BY THE BLOOD LEVELS OF CHOLESTEROL AND THE RED CELL DISTRIBUTION WIDTH .....</b>	<b>54</b>
2.1. ABSTRACT .....	56
2.2. INTRODUCTION.....	57
2.3. MATERIAL AND METHODS.....	58
2.3.1. Ethics Committee approval.....	59
2.3.2. Collection and analysis of blood samples .....	59
2.3.3. Reagents and equipments.....	59
2.3.4. Evaluation of the osmotic stability of erythrocytes .....	60
2.3.5. Statistical analyses .....	60
2.4. RESULTS.....	61
2.4.1. Correlations .....	61
2.4.2. Path analysis .....	62
2.5. DISCUSSION.....	63
2.5.1. Statistical tools and sample size.....	63
2.5.2. Stability source .....	64
2.5.3. RDW and dX.....	64
2.5.4. RDW and erythrocyte aging.....	65
2.5.5. Limitations .....	66
2.6. CONCLUSIONS.....	67

2.7. REFERENCES.....	67
RESUMO .....	79
<b>3. RELAÇÃO ENTRE ESTABILIDADE OSMÓTICA E DISTRIBUIÇÃO DE VOLUMES DE ERITRÓCITOS EM MULHERES SAUDÁVEIS DE ACORDO COM A ANÁLISE DE TRILHA .....</b>	<b>79</b>
3.1. ABSTRACT .....	80
3.2. INTRODUÇÃO .....	81
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	83
3.3.1. Coleta e análise das amostras de sangue.....	83
3.3.2. Reagentes e equipamentos.....	84
3.3.3. Avaliação da estabilidade osmótica de eritrócitos .....	84
3.3.4. Análises estatísticas .....	85
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	85
3.4.1. Correlações envolvendo RDW.....	85
3.4.2. Correlações envolvendo parâmetros de estabilidade .....	86
3.4.3. Menopausa.....	88
3.4.4. Análise de trilha .....	88
3.4.5. Limitações do estudo.....	91
3.5. CONCLUSÃO .....	92
3.6. REFERÊNCIAS.....	92

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Efeito do colesterol sobre a estabilidade de eritrócitos. ....	12
Figura 1.2.: Resistência osmótica de eritrócitos .....	13
Figura 1.3. Resistência mecânica de eritrócitos. ....	14
Figura 1.4. Parâmetros de estabilidade osmótica.. ....	17
Figura 1.5. <i>Parâmetros hematimétricos</i> . ....	23
Figura 1.6. Obtenção dos valores de <i>RDW</i> .....	23
Figura 1.7. Comparação entre diferentes ferramentas estatísticas. ....	25
Figura 1.8. Detecção de <i>outliers</i> por meio de <i>boxplot</i> e quartis.....	27
Figura 1.9. Elementos de um diagrama de trilha.....	33
Figura 1.10. Diagrama de trilha com RBC, MCV, RDW e dX.....	35
Figura 1.11. Efeito moderador da idade em um diagrama de trilha.....	38
Figura 2.1. A typical curve of osmotic fragility with H50. ....	74
Figura 2.2. A typical curve of osmotic stability with 1/H50.....	75
Figura 2.3. Path diagram with dX, RDW, MCV and RBC. ....	76
Figura 2.4. Increase in the value of dX by shifting.....	77
Figura 3.1. Obtenção dos parâmetros de estabilidade osmótica H50 e dX.....	105
Figura 3.2. Hipóteses para explicar a correlação negativa entre dX e Amin. ....	106
Figura 3.3. Diagrama de trilha com Age, MCHC, Amin e dX.....	107
Figura 3.4. Variação de dX.....	108
Figura 3.5. Efeito moderador da idade em dois modelos teóricos.....	109

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. <i>Exemplo de regressão linear múltipla</i> .....	30
Tabela 1.2. <i>Parâmetros de model fit</i> . ....	39
Tabela 1.3. Comparação das principais ferramentas estatísticas .....	43
Tabela 2.1. Pearson's correlation coefficients and p-values.....	72
Tabela 2.2. Path fitting obtained for the path models A and B .....	73
Tabela 3.1. Significant bivariate correlations .....	101
Tabela 3.2. Comparação de médias .....	102
Tabela 3.3. Parâmetros de <i>model fit</i> .....	103
Tabela 3.4. Efeitos totais. Estão incluídos os efeitos diretos e indiretos .....	104

## LISTA DE SIGLAS

<b>Siglas</b>	<b>Nome e significado</b>
<b>CFI</b>	Comparative Fit Index
<b>Cmin</b>	Qui-quadrado
<b>DF</b>	Degree of freedom
<b>DV</b>	Dependent variable
<b>GFI</b>	Goodness Fit Index
<b>Glu</b>	Glicose sérica
<b>Hb</b>	Hemoglobina total
<b>HDL-C</b>	High Density Lipoprotein Cholesterol
<b>Ht</b>	Hematócrito
<b>IQR</b>	Inter Quartil Range
<b>IV</b>	Independent variable
<b>LABFIQ</b>	Laboratório de Bio-Físico-Química
<b>LDL-C</b>	Low Density Lipoprotein cholesterol
<b>MCH</b>	Mean Corpuscular Hemoglobin
<b>MCHC</b>	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
<b>MCV</b>	Mean Corpuscular Volume
<b>MLR</b>	Multiple Linear Correlation
<b>NFI</b>	Normal Fit Index
<b>NNFI</b>	Non Normal Fit Index (aka TLI: Tucker Lewis Index )
<b>PCLOSE</b>	P of close
<b>RBC</b>	Red Blood Cell
<b>RDW</b>	Red Cell Distribution Width
<b>RMSEA</b>	Root Mean Square Error of Approximation
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SEM</b>	Structural Equation Modeling
<b>SRMR</b>	Standardized Root Mean Square Residual
<b>t-C</b>	Total cholesterol
<b>TGC</b>	Triglicerídeos totais
<b>VLDL-C</b>	Very Low Density Lipoprotein cholesterol

## APRESENTAÇÃO

Os eritrócitos são as células mais abundantes do sangue e se diferenciam das demais células pela ausência de núcleo e organelas. Além disso, os eritrócitos se caracterizam por apresentarem um formato bicôncavo, o que permite que essas células tenham uma maior superfície de contato. Isso favorece a captação de oxigênio, que se liga à hemoglobina, a qual existe em abundância no interior do eritrócito. A hemoglobina também é responsável pela coloração avermelhada do eritrócito, que é outra característica típica dessa célula.

Apesar de sua aparente simplicidade, o eritrócito tem sido bastante estudado nos últimos anos. Devido à relativa facilidade com que se pode quantificar a hemoglobina liberada pela lise dos eritrócitos, essas células se mostraram muito úteis no estudo da estabilidade de membranas biológicas. Uma das formas de se fazer esse estudo é por meio de teste de fragilidade osmótica. Esse teste consiste em expor os eritrócitos a soluções salinas cada vez mais hipotônicas, até que ocorra lise total.

Em nosso laboratório descobrimos que é possível construir uma sigmoide a partir dos dados obtidos no teste de fragilidade osmótica, por meio da qual se obtém parâmetros relacionados à resistência osmótica da membrana celular. Esses parâmetros possibilitaram um grande avanço no estudo da estabilidade de membranas biológicas, pois têm permitido comparar a ação de diferentes fatores responsáveis pela alteração da estabilidade dessas estruturas biológicas. Tais fatores incluem condições físicas como temperatura, além de substâncias químicas como detergentes (SDS), estabilizadores (glicerol e sorbitol) e desnaturantes (etanol e ureia).

Nesse estágio, o principal foco da nossa pesquisa era a membrana plasmática. Os eritrócitos eram meros coadjuvantes do estudo. Devido à pequena quantidade de parâmetros estudados, as ferramentas estatísticas tradicionais eram suficientes para a análise dos dados.

Contudo, esta quantidade de parâmetros estudados limitava o avanço das pesquisas que desenvolvíamos nessa área.

Contornamos esse problema pela inclusão de parâmetros hematológicos e bioquímicos relacionados às amostras de sangue estudadas. Dentre os novos

parâmetros incorporados ao estudo, estavam o nível de colesterol do plasma e os valores dos índices hematológicos, dentre os quais merece destaque o RDW. Isso abriu caminho para novas possibilidades, que permitiriam uma maior compreensão dos fenômenos estudados. O nível de colesterol nos permitiu fazer inferências a respeito do estado de fluidez da membrana do eritrócito, enquanto que o RDW fornecia importantes informações a respeito da variabilidade de volume entre os eritrócitos.

O RDW é comumente fornecido no hemograma. Entretanto, durante muitos anos esse parâmetro hematológico era ignorado pela maioria dos médicos, que não reconheciam a sua importância. Esse parâmetro basicamente se limitava a fornecer informações que seriam úteis no diagnóstico diferencial de anemias. Essa situação começou a mudar drasticamente depois que estudos iniciados por volta de 2010 revelaram que valores elevados de RDW estariam relacionados não apenas ao agravamento de anemias, mas também de diversas outras doenças.

Estudos sobre a correlação entre RDW e doenças continuam sendo realizados a todo o vapor em todo o mundo até hoje. Já foi constatada correlação entre RDW e os mais variados tipos de doenças. Percebeu-se que o RDW é uma espécie de parâmetro universal capaz de prever se o quadro clínico de um paciente tende a se agravar ou a permanecer estável. A causa dessa correlação não foi ainda descoberta e ainda permanece como um tipo de santo graal da hematologia.

Ao percebermos a importância do RDW a partir da literatura científica, o foco das nossas pesquisas se ampliou e passou a abranger também o eritrócito, que se transformou em estrela principal. Isso aconteceu porque descobrimos que o RDW é um dos principais parâmetros relacionados com a estabilidade osmótica de eritrócitos. Ficamos, então, envolvidos numa importante corrida científica, que se tornou ainda mais emocionante pelo fato de que as descobertas envolvendo o RDW são de grande importância para a saúde pública.

Tínhamos agora uma boa quantidade de parâmetros disponíveis para serem analisados. Essas análises eram feitas principalmente por meio da geração de uma matriz de correlação, que possibilitou encontrar importantes constatações. Mesmo assim os dados estavam sendo mal aproveitados. Cada parâmetro estudado era como a peça de um grande quebra-cabeça. Devido à estatística

simples que estávamos utilizando podíamos apenas juntar as peças duas a duas, sem assim conseguir enxergar o quebra-cabeça como um todo. Estava claro que precisávamos evoluir em nossas análises estatísticas.

Inicialmente, percebemos que deveríamos utilizar uma estatística do tipo multivariada. Depois de nos informarmos sobre diferentes ferramentas estatísticas desse tipo, constatamos que as melhores seriam a regressão linear múltipla, a correlação canônica e a análise de trilha. No começo foi um caminho difícil, pois na medida em que estudava percebi que eu não sabia verdadeiramente nem mesmo a estatística básica. Até então eu fazia análises estatísticas como alguém que segue a receita de um bolo.

Aprender análise de trilha foi uma forma de redenção e superação. Essa não foi uma tarefa simples, porque acabei seguindo um caminho de idas e voltas. Não foi um processo sistematizado, e sim por tentativa e erro. Os conhecimentos que adquiri sobre esse assunto vieram de diferentes fontes. Algumas se revelaram úteis, e outras não. Mas tenho certeza de que o esforço valeu a pena. Os três capítulos da presente tese são a prova disso.

O **Capítulo 1** é a Fundamentação Teórica. Este capítulo é uma breve descrição dos principais parâmetros estudados direta e indiretamente em nossa pesquisa. Primeiramente são abordados os assuntos relacionados ao eritrócito e, em seguida, são discutidos temas relacionados ao uso da estatística, em especial da análise de trilha.

O **Capítulo 2** consiste em um estudo em que se buscou uma maior compreensão sobre as correlações envolvendo parâmetros de estabilidade osmótica, bem como de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Esse estudo envolveu apenas homens saudáveis como forma de eliminar o impacto de fatores hormonais e nutricionais inerentes ao gênero feminino, como a menstruação e o consequente risco de deficiência de ferro. O uso de análise de trilha permitiu entender melhor a sequência de efeitos entre as variáveis e também serviu para mostrar a importância dessa ferramenta estatística nos estudos de fragilidade osmótica.

O **Capítulo 3** descreve um estudo em que também se teve como objetivo obter uma maior compreensão sobre como a estabilidade osmótica de eritrócitos é afetada por parâmetros hematológicos e bioquímicos. O estudo foi constituído

apenas por mulheres com idade superior e inferior ao início presumido da menopausa, que ocorre por volta dos 51 anos. Isso foi feito para testar se o período de idade correspondente à menstruação exerce efeito sobre a estabilidade osmótica, e como isso aconteceria. A análise de trilha foi utilizada não apenas para obter o efeito indireto entre os parâmetros analisados, mas também para analisar o efeito moderador da idade sobre o efeito direto entre os parâmetros de diferentes modelos teóricos.

O cálculo do efeito moderador por meio de análise de trilha abre caminho para um próximo capítulo, que dessa vez envolve a comparação entre o gênero masculino e feminino. Esse trabalho está em andamento e deve ficar pronto em breve. Esperamos que essa seja uma trilogia de sucesso.

Agradecemos a todos pelo interesse no presente trabalho. Boa leitura!

# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1. ERITRÓCITO

### 1.1.1 Estrutura e função

#### 1.1.1.1 *Características gerais dos eritrócitos*

Os eritrócitos são células sanguíneas bicôncavas desprovidas de núcleo e de organelas. A principal função dessas células é transportar oxigênio pelo corpo. Esse transporte é feito por meio da ligação do oxigênio à hemoglobina, que é uma proteína que se encontra em abundância no interior do eritrócito. Essa proteína é responsável pela coloração avermelhada dessa célula (N. Mohandas & Gallagher, 2008).

O formato bicôncavo do eritrócito é devido a uma rede de proteínas que compõem o citoesqueleto dessa célula. Esse formato aumenta a superfície de contato do eritrócito, o que favorece o transporte de oxigênio (N. Mohandas & Gallagher, 2008; Vaya, Simo, Santaolaria, Todoli, & Aznar, 2005).

As proteínas do citoesqueleto também são importantes para que o eritrócito seja flexível, o que permite que essa célula possa se deformar de forma reversível ao passar por capilares de diâmetro inferior ao dessa própria célula. Ao passar por tais capilares, os eritrócitos se alongam e ao término da passagem voltam ao seu formato original. Essa propriedade é denominada deformabilidade (Narla Mohandas, Clark, Jacobs, & Shoehet, 1980; N. Mohandas & Gallagher, 2008; Vaya et al., 2010; Vaya et al., 2005).

A deformabilidade também é importante porque atua no amortecimento da colisão dos eritrócitos entre si e com a parede de vasos sanguíneos. Se não fosse por essa propriedade, o tempo de vida médio do eritrócito, que é de 120 dias, seria bem menor (Narla Mohandas et al., 1980; N. Mohandas & Gallagher, 2008; Vaya et al., 2010; Vaya et al., 2005). Inclusive, doenças como a anemia esferocítica e a anemia falciforme, que resultam em danos nas proteínas do citoesqueleto, aumentam a quantidade de hemólise (Perrotta, Gallagher, & Mohandas, 2008; Vaya et al., 2005).

### 1.1.1.2 Produção de eritrócitos

Os eritrócitos se formam a partir de células precursoras eritropoiéticas situadas na medula óssea. Inicialmente há a proliferação de eritroblastos, o que requer a síntese de DNA. Essa síntese é regulada por folato (vitamina B9) e cobalamina (vitamina B12), pois essas vitaminas estimulam a síntese dos nucleotídeos purínicos e do nucleotídeo pirimidínico da timina. Uma deficiência dessas vitaminas compromete a síntese de DNA, o que resulta em apoptose de eritroblastos e, conseqüentemente, em anemia (Koury & Ponka, 2004).

O eritroblasto também requer ferro para a síntese de heme, que fará parte da estrutura da hemoglobina. O nível de heme regula a captação de ferro e dessa forma também interfere na síntese de hemoglobina (Macdougall, 1968; Vaya et al., 2005).

O heme é fundamental para a continuidade da eritropoiese, pois as células sanguíneas produzidas requerem uma concentração mínima dessa molécula. Em casos extremos, quando há deficiência de ferro, tem-se uma menor produção de eritrócitos. Além disso, os eritrócitos são menores, o que caracteriza a microcitose (Macdougall, 1968; Vaya et al., 2005).

Ao final do processo de maturação tem-se a expulsão do núcleo e de organelas. Isso resulta na formação de reticulócitos, que são eritrócitos ainda imaturos liberados na corrente sanguínea. Esse tipo de eritrócito tem esse nome porque apresenta uma malha de RNA ribossômico que é visível mesmo em microscopia óptica. Além disso, os reticulócitos são maiores do que eritrócitos já completamente maduros (Koury & Ponka, 2004).

A geração de novos eritrócitos ocorre de forma contínua para atender à demanda por oxigênio pelo organismo. Isso requer a reposição de eritrócitos que sofreram lise e também a síntese de mais eritrócitos caso a pessoa esteja em um ambiente com menos oxigênio do que aquele ao qual normalmente está adaptada (Risso, Turello, Biffoni, & Antonutto, 2007).

Uma quantidade insuficiente de eritrócitos é detectada pelos rins a partir dos níveis de oxigênio do sangue. Quando esses níveis diminuem, o rim produz e libera eritropoietina, que é um hormônio que age na medula óssea. A eritropoietina estimula os precursores eritropoiéticos a originarem uma maior

quantidade de eritrócitos até que o nível de oxigenação do sangue seja normalizado (Risso et al., 2007).

#### *1.1.1.3 Desgaste e morte do eritrócito*

Ao transportar oxigênio pelo corpo, o eritrócito sofre desgaste mecânico. Esse desgaste é causado pela ação de forças mecânicas responsáveis pela mudança de forma do eritrócito. Isso é o que acontece quando o eritrócito precisa atravessar capilares mais estreitos do que o seu próprio diâmetro. Nesse caso, o eritrócito adquire momentaneamente um formato elíptico (Bakaltcheva, Odeyale, & Spargo, 1996; Chasis, Agre, & Mohandas, 1988; Narla Mohandas et al., 1980).

O eritrócito também está sujeito à ação de forças mecânicas ao sofrer colisões. Essas colisões ocorrem continuamente e podem envolver outros eritrócitos, assim como a parede de vasos sanguíneos. Durante a colisão há uma alteração no formato do eritrócito, que geralmente volta ao seu formato normal ao final da colisão (Bakaltcheva et al., 1996; Narla Mohandas et al., 1980).

A mudança de forma do eritrócito nem sempre é reversível, pois os danos sofridos pelos eritrócitos são cumulativos. Isso acontece porque diversas estruturas danificadas não podem ser reparadas. Como por exemplo, as proteínas que compõem o citoesqueleto. Mesmo quando danificadas, essas proteínas não podem ser repostas, pois o eritrócito não possui plena capacidade de sintetizar novas proteínas, já que essas células não possuem núcleo e nem organelas (Koury & Ponka, 2004; N. Mohandas & Gallagher, 2008).

Enquanto circula pelo corpo, o eritrócito também sofre desgaste de natureza química. Esse desgaste é causado por moléculas que danificam a membrana do eritrócito, dentre as quais se destacam os radicais livres. Para se proteger dessas moléculas, os eritrócitos possuem um conjunto de enzimas que as neutralizam. Essas enzimas incluem, por exemplo, a glutathione peroxidase, a superóxido desmutase (SOD) e a catalase (Massafra et al., 2002).

Entretanto, essas enzimas tem um tempo de vida limitado e não são substituídas por novas enzimas. Isso faz com que os danos por desgaste químico sejam cumulativos (Minetti, Agati, & Malorni, 2007).

O acúmulo de danos pelos eritrócitos chega a um ponto crítico, quando então essa célula não é mais capaz de lidar com eles, e então se arrebenta. Isso pode acontecer na corrente sanguínea, o que é denominado hemólise intravascular, ou no interior do baço, onde recebe o nome de hemólise extravascular, pois a circulação sanguínea nesse órgão é aberta ([Ganzoni, Oakes, & Hillman, 1971](#); [Robert C Griggs, Weisman, & Harris, 1959](#)).

Um dos sinais de desgaste do eritrócito é a exposição ao meio externo de regiões da membrana que deveriam estar protegidas no meio interno. Uma dessas regiões envolve o complexo de proteínas da Banda 3. Há determinados tipos de imunoglobulinas que reconhecem e se ligam a essas regiões e assim marcam o eritrócito para sofrer lise no baço ([Ganzoni et al., 1971](#); [Robert C Griggs et al., 1959](#)).

Ao sofrer lise, o eritrócito libera hemoglobina no meio, que é então convertida em bilirrubina. Inicialmente, a bilirrubina é produzida no baço, em uma forma pouco solúvel, denominada bilirrubina não conjugada ou bilirrubina indireta. Posteriormente, essa bilirrubina é enviada ao fígado pela albumina, onde se torna mais solúvel pela adição de ácido glicurônico, e por isso é chamada de bilirrubina conjugada ou direta. Por fim, a bilirrubina, predominantemente na forma conjugada, é eliminada pelo organismo pelo sistema biliar ([Brites, Silva, & Brito, 1997](#); [Cassoly, 1982](#)).

Na lise do eritrócito também há grande liberação de lactato desidrogenase 1 (LDH1). Essa enzima existe em abundância no eritrócito, pois o seu metabolismo é anaeróbico, já que essa célula não possui mitocôndria ([N. Mohandas & Gallagher, 2008](#)).

#### *1.1.1.4 Envelhecimento do eritrócito*

O acúmulo de danos sofridos pelos eritrócitos, devido aos desgastes mecânico ou químico, resulta no envelhecimento dessas células. Esse envelhecimento, ao contrário daquele que ocorre em outras células, não envolve um componente genético, já que o eritrócito não apresenta núcleo ([Ganzoni et al., 1971](#); [Koury & Ponka, 2004](#)).

Na medida em que envelhecem, os eritrócitos se tornam menores, mais densos e mais esféricos. A redução do tamanho do eritrócito com o decorrer do tempo ocorre porque essa célula perde membrana na forma de vesículas. Essas vesículas contêm mais colesterol do que fosfolipídios. Isso significa que, devido ao processo de vesiculação, a proporção em colesterol em relação a fosfolipídio na membrana do eritrócito tende a diminuir (Greenwalt, Bryan, & Dumaswala, 1984).

Há também uma perda de proteínas de membrana por meio de vesículas. Entretanto, essa perda diminui na medida em que novas vesículas são formadas. Como as proteínas são mais densas do que os lipídios, isso significa que a vesiculação resulta em um aumento da densidade do eritrócito, já que se tem uma maior perda de lipídios do que de proteínas pela membrana dessa célula (Waugh et al., 1992).

Enquanto envelhecem, os eritrócitos também se tornam mais esféricos. Isso acontece devido aos danos nas proteínas do citoesqueleto, já que essas proteínas são responsáveis pelo típico formato bicôncavo do eritrócito. Os danos a essas proteínas também tornam o eritrócito menos deformável (Conham, 1969).

Além disso, o processo de envelhecimento dos eritrócitos é acelerado quando essas células são armazenadas. Nessa situação, os eritrócitos estão mais sujeitos a danos de natureza química do que mecânica. No corpo, o sangue continuamente recebe substâncias antioxidantes, como a vitamina C, porém, os eritrócitos velhos são substituídos por novos. Em uma bolsa de sangue, no entanto, não há reposição da vitamina C oxidada e nem mesmo dos eritrócitos mais velhos (Frank et al., 2013).

O fato de eritrócitos mais velhos serem menores, mais densos e mais esféricos pode ser usado para que esses eritrócitos sejam separados por meio de gradientes de *percoll*. Nesse caso, os eritrócitos menores e mais densos conseguem ocupar faixas de gradientes mais densas, enquanto que os maiores e menos densos ficam retidos em gradientes menos densos. Essa técnica, apesar de relativamente trabalhosa, é vantajosa por ter um custo reduzido (D'Alessandro, Blasi, D'Amici, Marrocco, & Zolla, 2013).

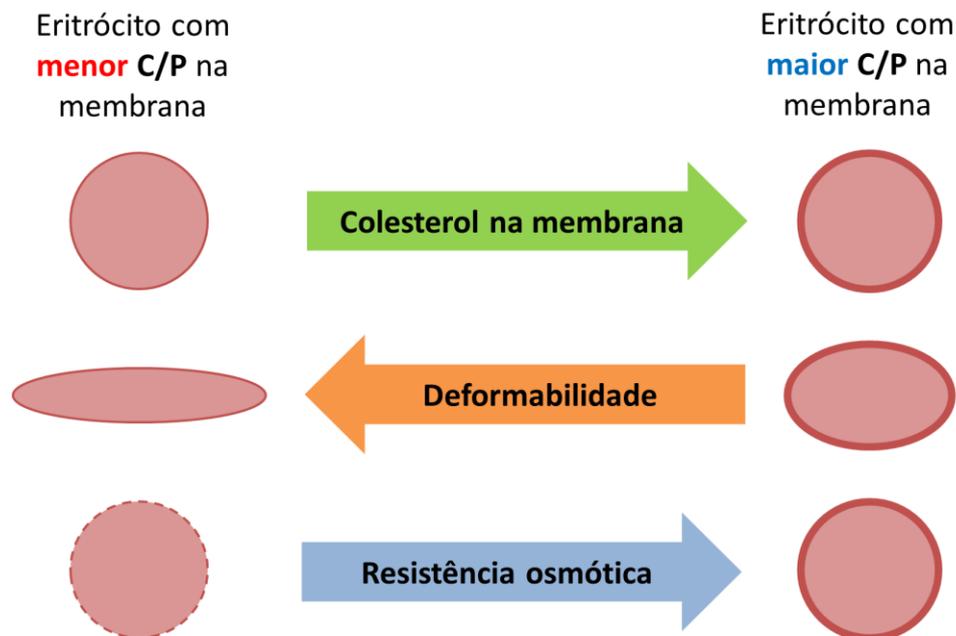
Os eritrócitos também podem ser separados por meio de elutriação em centrifugação de contracorrente. Nesse sistema uma corrente de líquido contendo

eritrócitos é forçada a passar por um rotor em movimento que gera uma força centrífuga em sentido oposto ao do fluxo de eritrócitos. Para que os eritrócitos atravessem o rotor é necessário que vençam a força centrífuga. Eritrócitos menores e mais densos conseguem vencer essa força em velocidades menores. Entretanto, quanto maior o eritrócito, maior é a velocidade do líquido necessária para que os eritrócitos completem o percurso através do rotor ([Condon, Kim, Deitch, Machiedo, & Spolarics, 2003](#)).

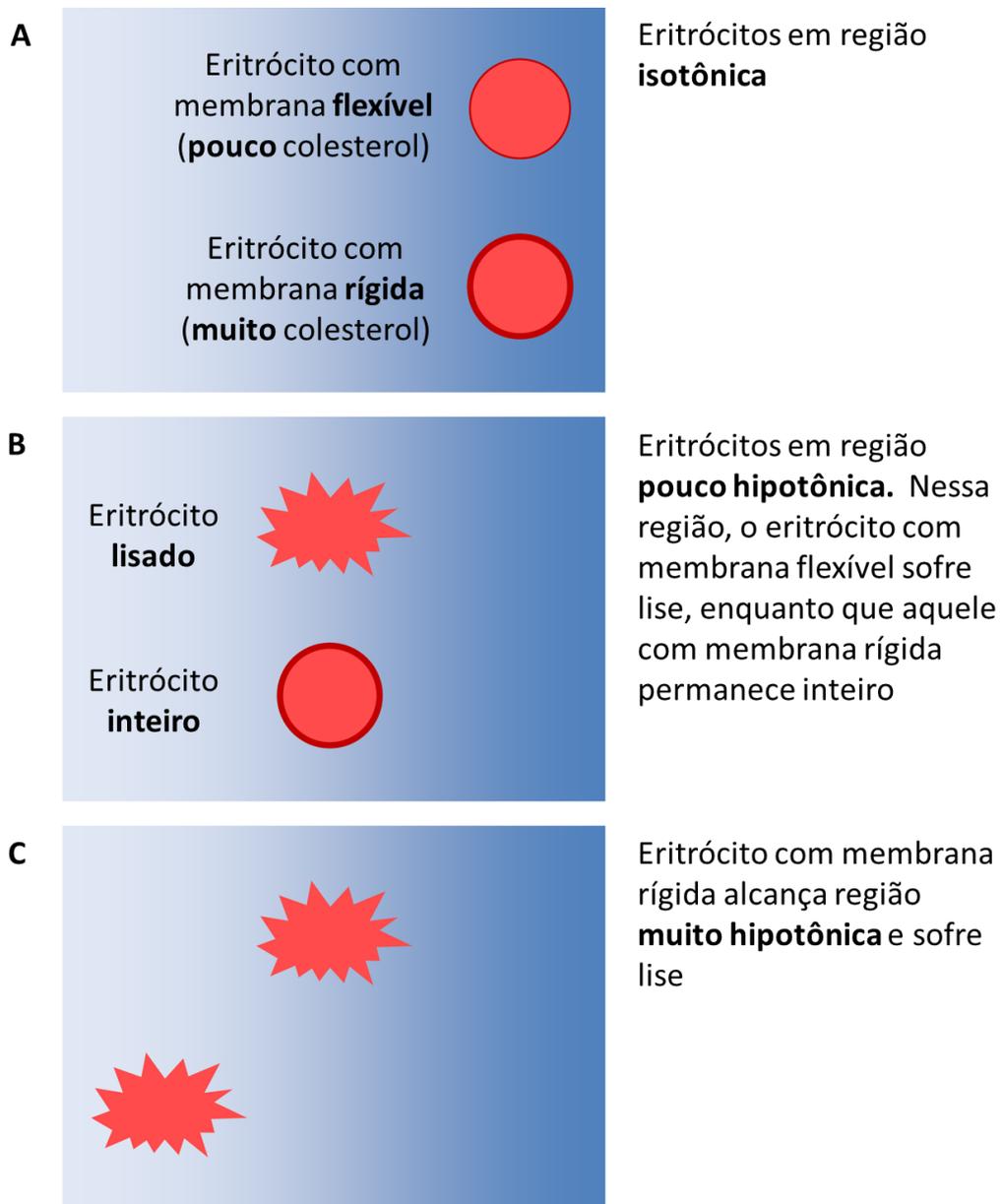
## 1.1.2 Estabilidade

### 1.1.2.1 Estabilidade osmótica

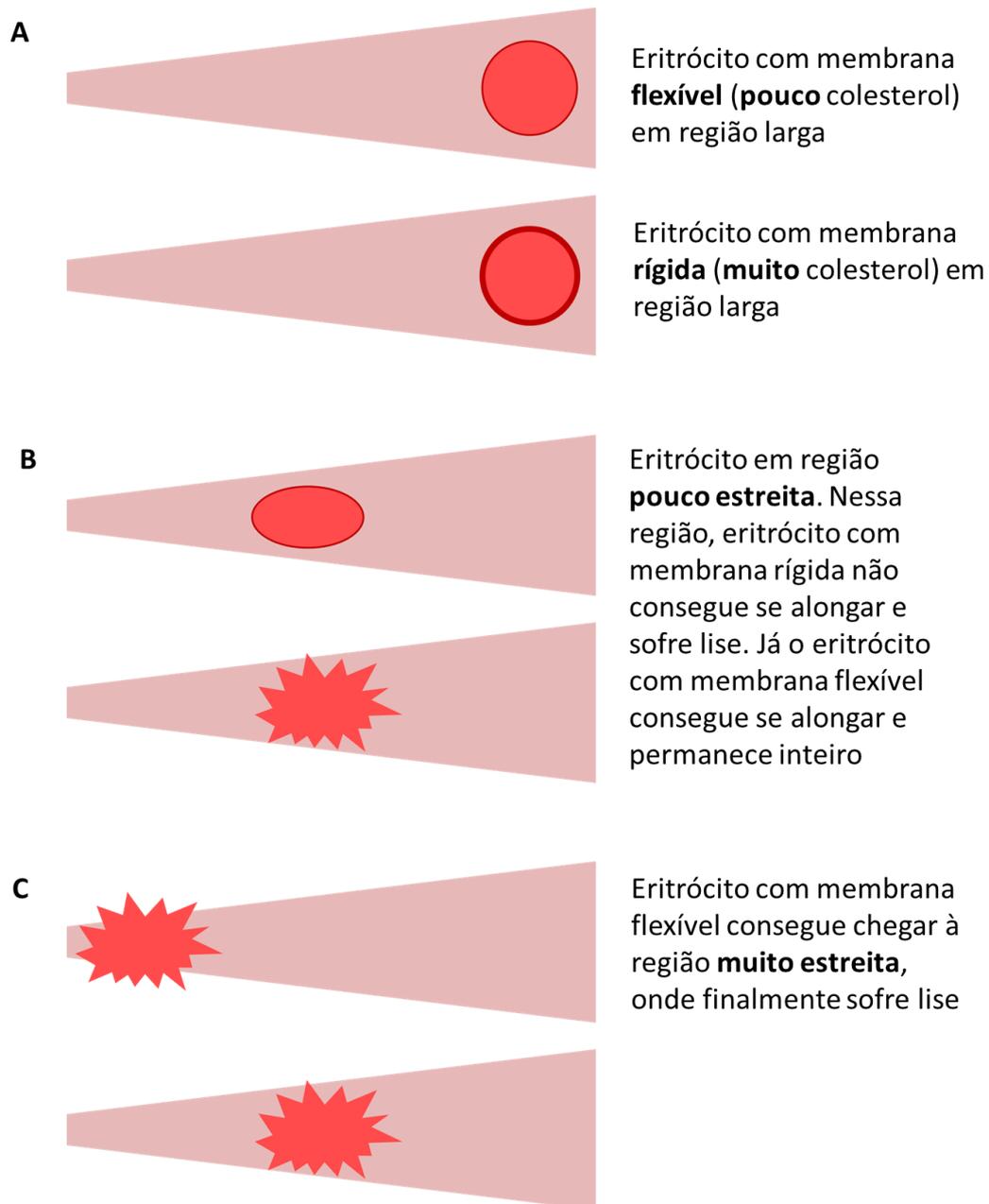
O eritrócito sofre lise quando exposto a um meio hipotônico. Isso acontece porque há entrada de água no interior do eritrócito até que a concentração de sal no interior dessa célula se iguale à concentração do ambiente externo. Nesse processo, o volume do eritrócito aumenta. Se o meio em que o eritrócito se encontra for demasiadamente hipotônico, a entrada de água no interior do eritrócito poderá ser maior do que a capacidade dessa célula em resistir à expansão de volume. Quando isso acontece, o eritrócito sofre lise (Robert C Griggs et al., 1959; Paul A Marks & Anne B. Johnson, 1958; Rifkind, Araki, & Hadley, 1983).



**Figura 1.1.** Efeito do colesterol sobre a estabilidade de eritrócitos.



**Figura 1.2.** Resistência osmótica de eritrócitos com diferente quantidade de colesterol na membrana ao longo de um gradiente salino.



**Figura 1.3.** Resistência mecânica de eritrócitos com diferente quantidade de colesterol na membrana ao longo de um tudo com diâmetro cada vez menor.

A lise de eritrócitos por hipotonicidade não ocorre em condições fisiológicas, pois a diminuição na concentração salina necessária para que isso aconteça é incompatível com a vida. Mesmo assim, esse estudo é muito útil, pois há diversos fatores ligados à saúde que podem aumentar a resistência do eritrócito à lise em meio hipotônico. Um dos principais fatores é a elevação da proporção de colesterol em relação a fosfolipídio (C/P) na membrana do eritrócito (Erro! Fonte de referência não encontrada.) (Cazzola, Rondanelli, Trotti, & Cestaro, 011; Chabanel et al., 1983; Richard A. Cooper, Elizabeth C. Arner, James S. Wiley, & Sanford J. Shattil, 1975)

O colesterol, devido à sua parte hidrofóbica, contribui para o aumento da afinidade entre os fosfolipídios que compõem a membrana plasmática do eritrócito. Isso faz com que essa membrana se torne mais rígida e, portanto, mais resistente à expansão de volume decorrente da hipotonicidade (**Figura 1.2**) (Cazzola et al., 2011; Chabanel et al., 1983; Richard A. Cooper et al., 1975).

Eritrócitos com membrana mais rígida são mais resistentes à hipotonicidade, mas menos resistentes à força mecânica. Isso acontece porque membranas mais rígidas são menos deformáveis (**Figura 1.3**) (Narla Mohandas et al., 1980). Além disso, uma membrana muito rígida dificulta processos que ocorrem por meio dela, como a difusão de oxigênio e o transporte de nutrientes (Menchaca, Michalek, Rohde, O'Dea, & Buchwald, 1998).

A idade do eritrócito também é um fator importante sobre a estabilidade osmótica. Eritrócitos mais jovens acumulam menos danos por desgaste e por isso são menos suscetíveis à lise. Além disso, esses eritrócitos possuem um formato bicôncavo, que além de ser indicativo de um citoesqueleto em boas condições, contribui para retardar o processo de hemólise (Conham, 1969; Ganzoni et al., 1971).

O formato bicôncavo permite que o eritrócito inicialmente aumente de volume sem se arrebentar. Isso pode ser suficiente para diminuir a pressão osmótica no interior do eritrócito, igualando-a a do meio externo. Entretanto, caso isso não aconteça, o eritrócito irá aumentar de volume até se tornar esférico e então se arrebentar (Robert C Griggs et al., 1959; Paul A Marks & Anne B. Johnson, 1958).

A fase da hemólise em que há um aumento do volume do eritrócito é chamada de inchamento. Nessa fase, a membrana ainda está frouxa, pois não está sob muita tensão. Quando o eritrócito atinge o volume máximo tem-se início a fase esférica, que recebe esse nome devido à forma que o eritrócito assume (Jay & Rowlands, 1975; Saari & Beck, 1975).

Na fase esférica, a membrana está sob muita tensão, que pode ser aliviada, até certo ponto, pelo vazamento de íons potássio pela membrana. Entretanto, caso a diferença osmótica entre o eritrócito e o meio ao seu redor persista, a tensão na membrana irá aumentar até romper a interação entre os fosfolipídios que a compõem. Nesse ponto, a membrana perde a sua integridade e o eritrócito finalmente estoura (Jay & Rowlands, 1975; Saari & Beck, 1975).

#### 1.1.2.2 Fragilidade osmótica

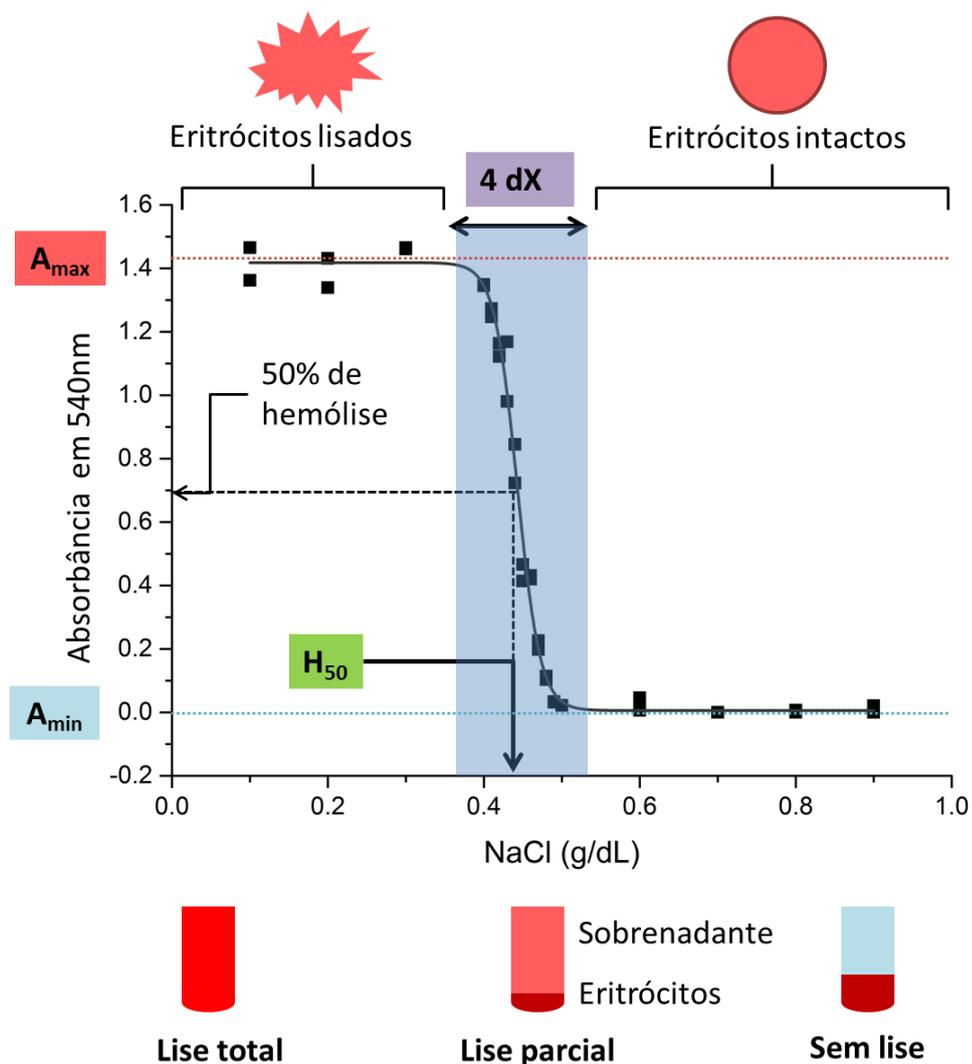
Ao sofrer lise, o eritrócito libera hemoglobina. Essa hemoglobina pode ser medida de forma simples por meio de espectrofotometria, usando um comprimento de onda de 540 nm. Como os eritrócitos não possuem núcleo e nem organelas, essas células são muito úteis no estudo da estabilidade de membrana das células como um todo e não apenas de eritrócitos, já que a composição e estrutura da membrana é praticamente a mesma nos diferentes tipos de células (Cunha, Arvelos, Costa, & Penha-Silva, 2007; Paul A Marks & Anne B. Johnson, 1958).

Uma das formas de promover a lise de eritrócitos *in vitro* é por meio da exposição dessas células a um meio hipotônico, em que a concentração salina (NaCl) seja inferior a 0,9%. Inclusive, esse é o princípio utilizado no chamado teste de fragilidade osmótica (Parpart, Lorenz, Parpart, Gregg, & Chase, 1947).

Tradicionalmente, um teste de fragilidade osmótica consiste em expor uma amostra de sangue a concentrações salinas cada vez menores, que variam de 0,9 a 0,0% de NaCl. Esse teste é utilizado no diagnóstico de diferentes tipos de anemias, que podem resultar em um aumento ou diminuição da fragilidade osmótica (Paul A Marks & Anne B. Johnson, 1958).

A partir dos dados de absorvância obtidos de um teste de fragilidade osmótica é possível construir uma sigmoide, a qual oferece uma maior quantidade

de parâmetros de estabilidade osmótica. Esses parâmetros incluem a absorbância máxima ( $A_{max}$ ), a absorbância mínima ( $A_{min}$ ), o intervalo de concentração salina envolvido no processo de hemólise ( $dX$ ) e a concentração salina em que a hemólise foi de 50% ( $H_{50}$ ) (Figura 1.4) (Bernardino Neto et al., 2013; Cunha et al., 2007; Custodio Afonso Rocha et al., 2012; de Arvelos et al., 2013; de Freitas et al., 2010; de Freitas et al., 2013; Fonseca et al., 2010; Mascarenhas Netto Rde et al., 2014; Penha-Silva et al., 2008; Penha-Silva et al., 2007).



**Figura 1.4.** Parâmetros de estabilidade osmótica.  $A_{max}$ : absorbância máxima;  $A_{min}$ : absorbância mínima;  $dX$ : intervalo de hemólise;  $H_{50}$ : metade da hemólise.

Outras formas de causar a lise osmótica incluem o uso de substâncias que causam dano à membrana do eritrócito, as quais incluem moléculas com ação detergente que dissolvem a membrana do eritrócito, como é o caso do SDS (dodecil sulfato de sódio) (de Freitas et al., 2010; Fonseca et al., 2010; Shalel, Streichman, & Marmur, 2002).

Também há substâncias que se inserem na membrana e desorganizam os seus lipídios, tornando a membrana mais fluida e, assim, mais permeável à água. Entretanto, quando essa permeabilidade aumenta em excesso, resulta na lise do eritrócito. Esse é o caso do etanol (de Arvelos et al., 2013; Goldstein, 1986; Penha-Silva et al., 2008; Sonmez et al., 2013).

Entretanto, em indivíduos etilistas, o etanol faz com que a membrana dos eritrócitos se torne mais rígida. Isso acontece porque o uso crônico do etanol faz com que esses eritrócitos sejam selecionados em detrimento daqueles com a membrana mais fluida (Goldstein, 1986).

### 1.1.2.3 *Estresse mecânico*

A lise de eritrócitos também pode ser induzida por estresse mecânico, por meio do qual se avalia a deformabilidade dessas células. Não há atualmente um equipamento de uso universal destinado especificamente para a avaliação da deformabilidade celular. Já foram realizadas diversas pesquisas envolvendo ectacitômetro, que é um aparelho em que os eritrócitos são submetidos a um fluxo laminar e então avaliados por difração de raio laser (Musielak, 2009). Entretanto, esse aparelho não é mais amplamente comercializado.

Geralmente, a deformabilidade de eritrócitos é estudada por meio de aparelhos construídos pela própria equipe de pesquisadores (Musielak, 2009). Isso dificulta a comparação ou repetição de resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa.

Apesar de o fluxo sanguíneo ser do tipo turbilhonar, os aparelhos que avaliam a deformabilidade do eritrócito submetem essa célula a um estresse similar àquele *in vivo* (Narla Mohandas et al., 1980). O ideal mesmo, no entanto, seria fazer estudos que avaliassem tanto a estabilidade mecânica como a

estabilidade osmótica do eritrócito, pois isso permitiria inferir maior quantidade de informação a respeito da estabilidade da membrana do eritrócito.

### **1.1.3 Fatores que afetam a estabilidade**

#### *1.1.3.1 Gênero*

Homens e mulheres diferem em relação aos parâmetros hematológicos. Essa diferença é observada durante o período reprodutivo, que se estende da puberdade até por volta dos 51 anos, quando tem início a menopausa em mulheres (Kameneva, Garrett, Watach, & Borovetz, 1998; Matyushichev, Shamratova, & Muzafarova, 1999).

Em relação aos homens, as mulheres possuem menor quantidade de eritrócitos e, conseqüentemente, menores concentrações de hemoglobina e valores de hematócrito, além de valores normais mais reduzidos de ferritina. Essas diferenças são devido à perda de sangue durante a menstruação (Ruston, Dover, Sainsbury, Norris, & Gilkes, 2001).

A reposição de eritrócitos perdidos durante a menstruação promove um aumento da taxa de renovação dessas células. Isso faz com que a população de eritrócitos jovens aumente, de tal forma que o sangue das mulheres possui a metade dos eritrócitos velhos e o dobro dos eritrócitos jovens quando comparado ao sangue dos homens (Kameneva et al., 1998; Ruston et al., 2001).

A maior proporção de eritrócitos jovens em mulheres pode ser verificada pelo fato de que os níveis de glutathiona reduzida (GSH) são maiores em mulheres na fase reprodutiva do que na menopausa e mais elevados em mulheres do que em homens de mesma faixa etária (Massafra et al., 2002). Esses resultados são coerentes, pois devido à menopausa o perfil hematológico das mulheres se torna parecido ao dos homens (Kameneva et al., 1998).

A GSH, assim como diversos outros constituintes do eritrócito, não é renovada. Isso se deve ao fato de que os eritrócitos não possuem o aparato necessário para a síntese de novos peptídeos e proteínas, já que são desprovidos de núcleo e organelas. Dessa forma, quanto maiores são os níveis de GSH, mais jovem é o eritrócito, já que os níveis desse peptídeo diminuem ao longo do tempo devido ao desgaste de sua estrutura. Esse desgaste é decorrente das sucessivas

mudanças conformacionais necessárias para a realização de sua função (Massafra et al., 2002).

O sangue das mulheres é menos viscoso do que o dos homens. Em parte, isso acontece porque as mulheres possuem uma menor quantidade de eritrócitos, bem como os eritrócitos das mulheres são proporcionalmente mais jovens e, portanto, menos agregáveis (Kameneva, Watach, & Borovetz, 1999).

A menor viscosidade do sangue feminino faz com que as pessoas desse gênero tenham menor risco de desenvolver doenças cardiovasculares. Inclusive, a doação de sangue por homens teria efeito reológico equivalente ao da menstruação, pois contribuiria para tornar o sangue menos viscoso (Kameneva et al., 1999).

O fato de mulheres terem menores valores de RBC e ferritina do que homens poderia ser sinal de uma condição patológica decorrente da menstruação e não algo característico do gênero feminino. Isso porque a menstruação seria uma condição atípica não apenas na espécie humana, mas no reino animal como um todo (Ruston et al., 2001).

Uma das evidências disso é o fato de que mesmo em espécies de primatas com ciclo menstrual, não há diferença nos parâmetros hematológicos de machos e fêmeas. Além disso, a frequência com que as mulheres menstruam nos dias atuais se tornou mais elevada devido à redução da taxa de fecundidade (Ruston et al., 2001).

As mulheres absorvem a mesma quantidade de ferro que homens. Também possuem a mesma capacidade de síntese de heme, que é uma molécula que contém ferro e que é essencial à geração de novos eritrócitos. Isso apoia a ideia de que a menstruação é o principal fator responsável pela perda de ferro em mulheres (Ruston et al., 2001).

Alguns autores recomendam que os valores de referência de RBC, Hb e ferritina em mulheres sejam corrigidos, já que a menstruação excessiva seria um fator prejudicial à saúde. Dessa forma, mulheres supostamente saudáveis, mas que na verdade apresentariam deficiência de ferro, poderiam ser devidamente diagnosticadas e tratadas (Ruston et al., 2001).

### 1.1.3.2 Idade

Pessoas mais velhas possuem níveis mais elevados de LDL-C, que é a quantidade de colesterol transportada pela LDL, conforme cálculo pela fórmula de Friedewald (Warnick, Knopp, Fitzpatrick, & Branson, 1990). Assim, nessas pessoas, há uma maior quantidade de colesterol na membrana do eritrócito, que então se torna menos deformável. Tais eritrócitos se tornam menos resistentes ao estresse mecânico e por causa disso envelhecem mais depressa (Araki & Rifkind, 1980).

Ao envelhecerem, os eritrócitos expõem regiões da membrana ao meio externo, à quais se ligam imunoglobulinas que marcam esses eritrócitos para serem destruídos no baço. Dessa forma, os eritrócitos que envelhecem mais rápido também duram menos tempo (Shperling & Danon, 1990).

A redução do tempo de vida dos eritrócitos aumenta a taxa de renovação dessas células, o que resulta em aumento da proporção de eritrócitos jovens. Dessa forma, os eritrócitos de pessoas de maior idade são osmoticamente mais resistentes, seja porque possuem membrana mais rica em colesterol ou porque são mais jovens (Ganzoni et al., 1971; Robert C Griggs et al., 1959).

### 1.1.3.3 Lipoproteínas

A principal fonte de colesterol para a membrana do eritrócito é proveniente da interação dessas células com a LDL (Low Dense Lipoprotein). Assim, elevação dos níveis de LDL-C irá aumentar a quantidade de colesterol que é transferida para a membrana do eritrócito (D. Y. Hui & Harmony, 1979; Lange & Slayton, 1982).

Níveis de LDL-C bem acima do normal são encontrados em pacientes não tratados para hipercolesterolemia. Isso faz com que os eritrócitos desses pacientes possuem maior conteúdo de colesterol na membrana do que aqueles de pessoas com níveis normais de LDL-C (Forsyth, Braunmuller, Wan, Franke, & Stone, 2012).

Inversamente, pacientes tratados com estatina apresentam menores níveis de LDL-C e também de colesterol na membrana do eritrócito. Esses eritrócitos se

tornam mais deformáveis, o que aumenta o tempo de vida dessas células (Forsyth et al., 2012).

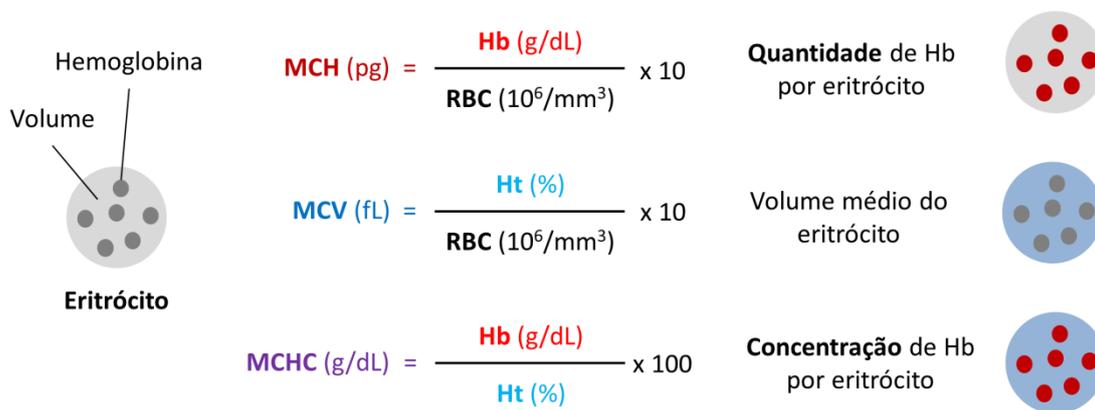
A HDL também tem um importante papel nesse processo, pois contribui para a redução dos níveis de colesterol na membrana do eritrócito, seja por competir com a LDL na interação com o eritrócito ou por efetivamente participar do transporte reverso do colesterol (Ejima et al., 2000; Meurs et al., 2005).

#### *1.1.3.4 Parâmetros hematológicos*

Um hemograma consiste de diversos parâmetros relacionados a características dos eritrócitos. Os parâmetros obtidos diretamente estão relacionados aos eritrócitos como um todo e incluem RBC, Hb e Ht. O RBC se refere à quantidade total de eritrócitos. O Hb é a hemoglobina total desses eritrócitos, enquanto que Ht é o volume total que os eritrócitos ocupam em relação ao sangue como um todo (George-Gay & Parker, 2003).

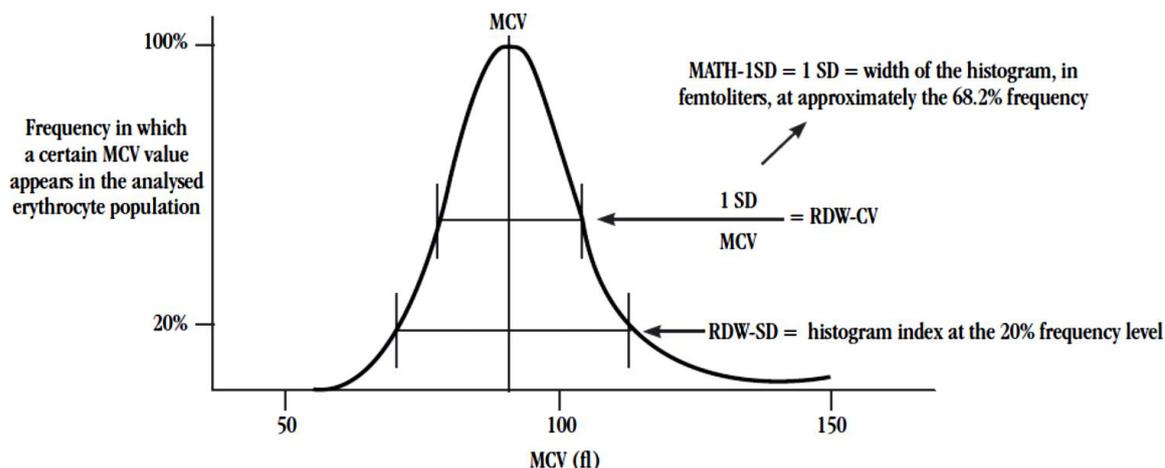
Os parâmetros RBC, Ht e Hb são usados no cálculo dos chamados índices hematimétricos, que em sua maioria estão relacionados às características médias de cada eritrócito, ao qual se referem como corpúsculo. Assim, tem-se a Hemoglobina Corpuscular Média (MCH), o Volume Corpuscular Médio (MCV) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (MCHC) (George-Gay & Parker, 2003).

Basicamente, o MCH consiste na divisão de Hb por RBC, enquanto que o MCV é decorrente do quociente entre Ht e RBC. Já MCHC é proveniente da divisão de Hb por Ht (George-Gay & Parker, 2003). Informações mais detalhadas sobre esses parâmetros, como as unidades de medida envolvidas e fatores de correção, são mostrados na **Figura 1.5**.



**Figura 1.5.** Parâmetros hematimétricos.

Os volumes de todos os eritrócitos podem ser distribuídos em um gráfico de frequência, a partir do qual é obtido o valor de desvio padrão (SD) e de MCV. Esses parâmetros são utilizados no cálculo de RDW, que consiste na divisão de 1SD por MCV (**Figura 1.6**). Por envolver valor de SD como numerador, o RDW está associado à variabilidade de volume entre os eritrócitos (**Caporal & Comar, 2013; Constantino, 2013; George-Gay & Parker, 2003**).



**Figura 1.6.** Obtenção dos valores de *RDW* (Red Cell Distribution Width) e de *MCV* (Mean Corpuscular Volume) a partir da curva de distribuição de volume dos eritrócitos. 1 fl = 10<sup>-15</sup> L. (Fonte: Caporal et al., 2013).

Basicamente, o RDW é o comprimento de uma linha que corta horizontalmente a curva de distribuição das frequências de volume dos eritrócitos,

de forma que, quanto maior o comprimento dessa linha, maior é o valor de RDW. Mesmo sendo um parâmetro calculado, o RDW também é considerado um índice hematimétrico ([Constantino, 2013](#); [George-Gay & Parker, 2003](#)).

#### *1.1.3.5 RDW e doenças*

O RDW é um parâmetro de fácil obtenção, pois está presente no hemograma, que é um exame realizado com grande frequência. Esse parâmetro já vinha sendo utilizado há algum tempo, mas o seu uso geralmente era restrito ao diagnóstico de anemias ([Constantino, 2013](#)).

Nos últimos anos o RDW saiu do ostracismo. Atualmente é cada vez maior a quantidade de trabalhos científicos em que é observada a relação entre valores elevados de RDW e o agravamento das mais diversas doenças. Isso já foi encontrado em várias doenças ([Ephrem, 2013](#); [Hunziker, Celi, Lee, & Howell, 2012](#); [Patel et al., 2010](#); [Perlstein, Weuve, Pfeffer, & Beckman, 2009](#)).

A causa exata para essa relação praticamente universal entre RDW e doenças ainda não foi completamente elucidada. As explicações sobre esse assunto ainda são restritas ao tipo de doença em que o RDW foi estudado.

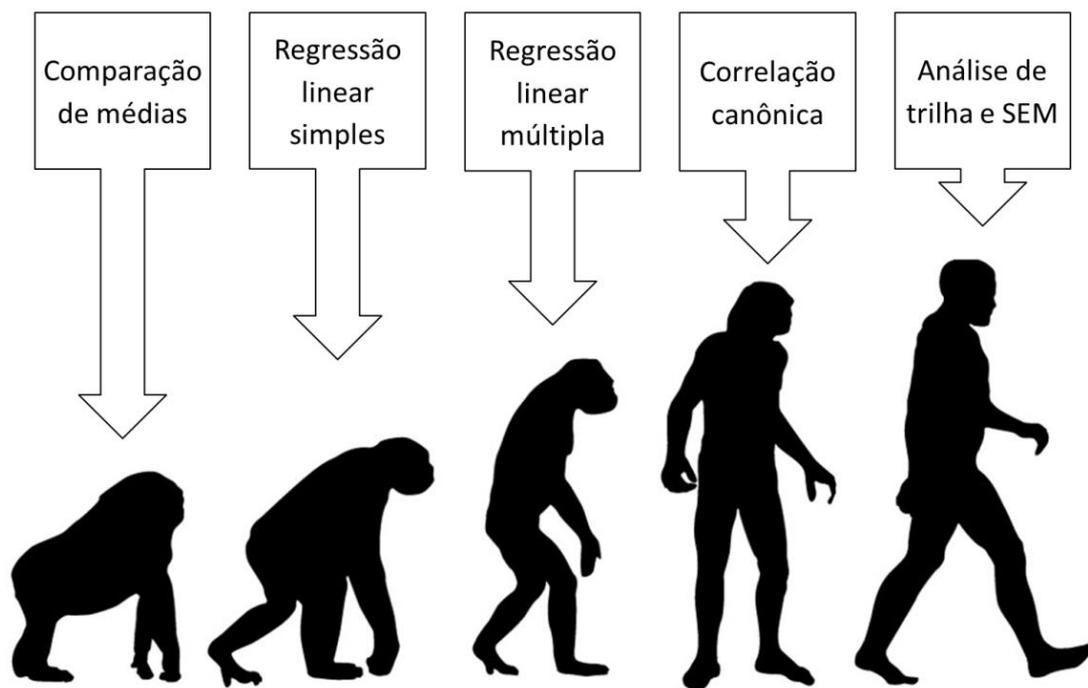
## 1.2. ESTATÍSTICA

### 1.2.1. Modelo Linear Generalizado

#### 1.2.1.1. Visão geral

Os dados foram analisados a partir de quatro ferramentas estatísticas, que incluem regressão linear simples, regressão linear múltipla, correlação canônica e análise de trilha. Todas essas ferramentas estatísticas pertencem a um mesmo grupo, denominado *Generalized Linear Model* (GLM). Esse grupo também é formado pela *Structural Equation Model* (SEM) (Figura 1.7) (Graham, 2008).

Para que as ferramentas estatísticas do GLM sejam utilizadas adequadamente, as variáveis a serem analisadas precisam ter distribuição normal e devem se correlacionar de forma linear entre si (Graham, 2008; Nimon, 2012).



**Figura 1.7.** Comparação entre diferentes ferramentas estatísticas.

Apesar de similares, as ferramentas do GLM diferem entre si em relação a vários aspectos, como a quantidade de variáveis dependentes e independentes que podem ser analisadas ao mesmo tempo. Essas ferramentas também se

distinguem quanto à classificação das variáveis em dependentes ou independentes, que podem ser fixas ou dinâmicas (Graham, 2008).

Na classificação fixa, uma variável de um determinado modelo será sempre dependente ou independente, não importando as variáveis com as quais se correlaciona. Já na classificação dinâmica, a dependência de certa variável muda de acordo com a variável com a qual esteja relacionada. Essa classificação é encontrada em ferramentas estatísticas mais sofisticadas, como a SEM, dentre a qual se inclui a análise de trilha (Ulman, 2006).

#### 1.2.1.2. Normalidade e matriz de correlação

Uma das ferramentas estatísticas mais simples para analisar correlações é a regressão linear simples. Nesse tipo de análise, uma variável dependente se correlaciona com uma única variável independente. Para que as correlações sejam feitas adequadamente, é importante verificar se os dados apresentam distribuição normal ou não. Caso a amostra seja menor do que 50, recomenda-se a utilização do teste de Shapiro-Wilk, e para amostras maiores, o teste indicado é o de Kolmogorov-Smirnov (Razali & Wah, 2011).

Caso apresentem distribuição normal, as variáveis podem ser correlacionadas na forma de uma matriz de correlação de Pearson. Nesse tipo de matriz, todas as correlações significantes obtidas são lineares. Entretanto, se uma ou mais variáveis apresentem distribuição não normal, também é interessante utilizar a matriz de correlação de Spearman, já que nesse tipo de matriz é possível identificar correlações não lineares, além das lineares (Zou, Tuncali, & Silverman, 2003).

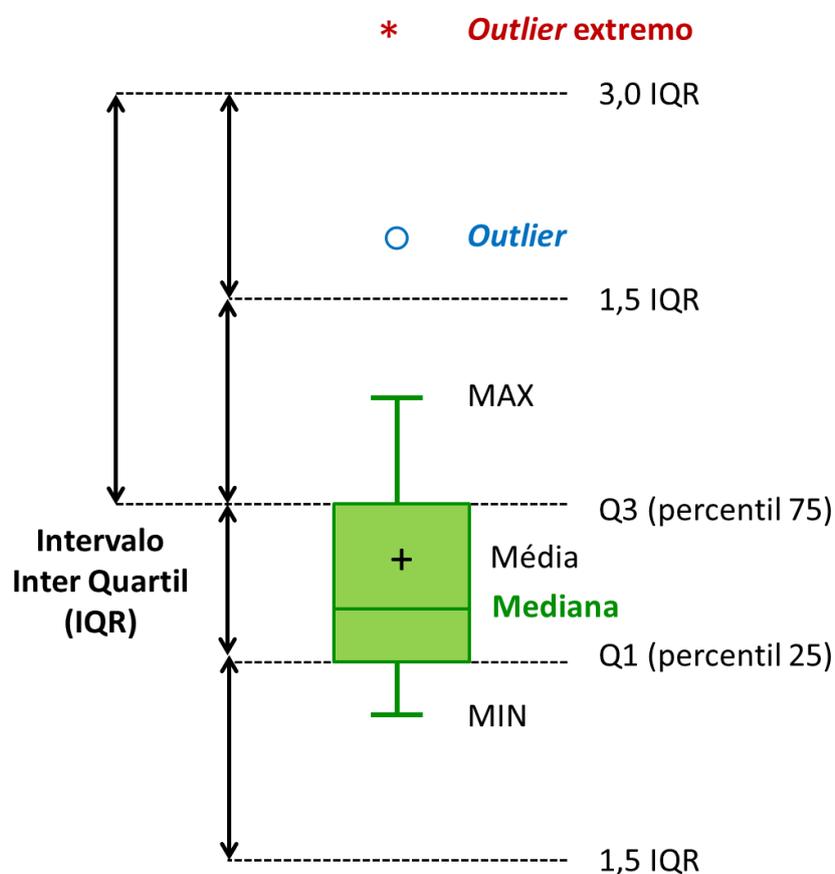
#### 1.2.1.3. Outliers

Antes de escolher o tipo de matriz de correlação que melhor se aplica aos dados, é preciso descobrir se as variáveis a serem analisadas apresentam valores que divergem muito dos demais. Tais valores são chamados de *outliers* (Dawson, 2011).

Pode ser necessário que os *outliers*, pelo menos os mais extremos, devam ser removidos de uma amostra. Isso é útil para evitar que a variável a que pertencem seja erroneamente considerada não normal quando na verdade é normal. Se forem removidos, os *outliers* precisam primeiramente ser identificados. Isso pode ser feito durante a análise exploratória dos dados por meio de quartis, que podem ser representados na forma de boxplot (Figura 1.8) (Dawson, 2011).

Em um quartil, os dados são divididos em quatro grupos, sendo que cada um deles abrange 25% dos dados. O limite que separa um grupo do outro é o quartil propriamente dito, de forma que há quatro quartis. O primeiro quartil abrange 25% dos dados, o segundo abrange 50% e o terceiro, 75%. A distância entre o primeiro e o terceiro quartil, a qual envolve 50% dos dados, consiste no Intervalo Interquartil (IQR, Interquartil Range).

Os pontos experimentais situados a uma distância acima de 1,5 IQR são considerados *outliers* e aqueles acima de 3,0 IQR são *outliers* extremos (Dawson, 2011).



**Figura 1.8.** Detecção de *outliers* por meio de *boxplot* e quartis.

#### 1.2.1.4. *Colinearidade*

Além da existência de variáveis não normais, outro fator que pode prejudicar a realização de análises multivariadas é a existência de correlações com elevada colinearidade. Isso pode acontecer quando uma determinada variável se correlaciona com outra variável a partir da qual os seus valores são calculados (Mela & Kopalle, 2002).

A correlação entre TGC e VLDL-C é um exemplo de colinearidade, pois os valores de VLDL-C são calculados a partir dos valores de TGC. É como se uma determinada variável se correlacionasse consigo mesma.

Outra correlação com elevada colinearidade envolveu as variáveis t-C e LDL-C. Nesse caso, os valores de LDL-C são obtidos a partir de um cálculo que envolve t-C (Warnick et al., 1990).

Colinearidades muito grandes podem resultar em correlações repetitivas. Por exemplo, TGC e VLDL-C se correlacionam praticamente com as mesmas variáveis, e essa correlação, inclusive, apresenta valores muito similares. O mesmo também acontece com as correlações envolvendo variáveis que se correlacionam tanto com t-C quanto LDL-C.

Assim, quando já se tem como objetivo realizar análises multivariadas, o ideal é focar a atenção nas variáveis que apresentaram distribuição normal e que não apresentem forte colinearidade. Por isso, as principais correlações discutidas no presente trabalho foram obtidas a partir de uma matriz de correlação de Pearson e a partir de variáveis sem grande colinearidade.

A colinearidade pode ser identificada por meio de análise fatorial e é útil na criação de modelos teóricos que utilizam SEM propriamente dita, pois pode ser usada na elaboração das chamadas variáveis latentes. Tais variáveis não são observadas diretamente e seus valores dependem de variáveis observadas, as quais geralmente apresentam colinearidade entre si. Portanto, na SEM, a colinearidade é um problema na determinação do efeito entre duas variáveis, mas ao mesmo tempo é um recurso útil na formação de variáveis latentes (Ulman, 2006).

#### 1.2.1.5. Regressão linear múltipla

A regressão linear múltipla representa um avanço em relação à regressão linear simples. Na regressão linear simples é possível correlacionar uma única variável independente com uma variável dependente. Já na regressão linear múltipla, pode-se correlacionar várias variáveis independentes (preditores) a uma variável dependente (*criterion*). Entretanto, ainda persiste a limitação de poder incluir apenas uma variável dependente em cada análise (Courville & Thompson, 2001).

Há varias similaridades entre as regressões lineares simples e múltipla. Na verdade, a regressão linear simples é um caso particular da regressão linear múltipla em que há apenas um único preditor. Os principais parâmetros de uma regressão linear são a significância, o R ao quadrado ( $R^2$ ) e os coeficientes de regressão dos preditores. Esses coeficientes podem estar na forma padronizada, em que possuem variância igual a 1, sendo chamados de coeficientes beta na regressão simples e de beta parcial na regressão múltipla (Courville & Thompson, 2001).

O coeficiente beta é muito importante porque permite saber a importância relativa de um preditor em relação aos demais, assim como a influência de um preditor sobre a variável dependente. Isso é particularmente útil quando os preditores apresentam unidades de medida diferentes. Além disso, o valor de beta ao quadrado indica a contribuição de cada preditor em explicar a variância de Y. O coeficiente beta corresponde ao r de Pearson (Courville & Thompson, 2001).

Na equação de regressão há também a constante **a**, que é o intercepto, ou seja, o valor de Y quando os preditores valem 0. Essa constante não aparece quando os coeficientes de regressão dos preditores estão na forma padronizada. Um exemplo de coeficientes estandardizados e não estandardizados pode ser visualizado na [Tabela 1.1](#).

**Tabela 1.1.** Exemplo de regressão linear múltipla.

Criterion (DV)	Preditores (IV)	Coeficientes		Significância dos coeficientes
		Não estandarizados (B)	Estandarizados (Beta)	
	(Constante)	- 0.023		0.410
dX	RBC	0.002	0.198	0.298
	RDW	0.002	0.337	0.057
	MCV	- 1.552 x 10 <sup>-5</sup>	- 0.025	0.908

DV: Variável dependente. IV: Variável independente. R<sup>2</sup> ajustado = 0.184. Significância do modelo = 0.007. dX: intervalo de hemólise; RBC: contagem de eritrócitos; RDW: Red Cell Distribution Width; MCV: Mean Corpuscular Volume.

Com base na **Tabela 1.1** as equações com coeficientes não estandarizados (1.1) e estandarizados (1.2) são indicadas a seguir.

Forma genérica

$$Y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_n X_n + e \quad (1.1)$$

$$Y = B_1 X_1 + B_2 X_2 + \dots + B_n X_n + e \quad (1.2)$$

Com valores da **Tabela 1.1**.

$$Y = - 0.023 + 0.002 \text{ RBC} + 0.002 \text{ RDW} - 1.552 \times 10^{-5} \text{ MCV} + e \quad (1.3)$$

$$Y = 0.198 \text{ RBC} + 0.337 \text{ RDW} - 0.025 \text{ MCV} + e \quad (1.4)$$

Nessas equações, **e** indica o erro. Observe que na forma não estandarizada há o intercepto (constante), cujo valor é - 0.023.

A regressão linear múltipla possui importantes limitações. Uma delas é o fato de que em cada análise pode haver uma única variável dependente. Para estudar mais de uma variável dependente seria necessário realizar regressões múltiplas sucessivas. Além disso, em uma única análise, não é possível descobrir se os preditores exercem efeito um sobre os outros, o que também exigiria a realização de várias regressões múltiplas. Portanto, cada análise permite saber

apenas o efeito de diferentes preditores sobre uma mesma variável dependente. Essas limitações podem ser superadas, parcial ou totalmente, por ferramentas estatísticas mais avançadas (Courville & Thompson, 2001; Graham, 2008).

#### 1.2.1.6. *Correlação canônica*

A correlação canônica permite avaliar a correlação entre dois grupos de variáveis, sendo que um desses grupos pode ser composto por variáveis dependentes, e o outro por variáveis independentes. Uma grande vantagem oferecida por essa ferramenta estatística é a possibilidade de se analisar mais de uma variável dependente ao mesmo tempo (Sherry, 2005).

Na correlação canônica cada grupo é estatisticamente transformado em uma variável. Assim, os dois grupos de variáveis formam os chamados pares canônicos. É, então, avaliada a correlação linear entre esses pares. As variáveis em cada grupo estão associadas a valores denominados cargas canônicas, que indicam o efeito relativo da variável no grupo a que pertence (Sherry, 2005).

Apesar de suas vantagens, a correlação canônica possui sérias limitações. Uma delas é a dificuldade de se verificar os efeitos de uma variável sobre a outra em um mesmo par canônico ao qual pertença ou não. Outra limitação é que, uma vez realizada a análise, o grupo ao qual uma determinada variável pertence é fixo. Essas limitações são recorrentes em vários tipos de ferramentas estatísticas, mas que podem ser superadas por meio de análises estatísticas mais complexas e esclarecedoras, como é o caso da análise de trilha (Sherry, 2005).

## 1.2.2. Análise de trilha

### 1.2.2.1. Conceito geral

A análise de trilha é uma ferramenta estatística do tipo multivariada que permite criar modelos teóricos envolvendo interações entre mais de duas variáveis. Esse tipo de análise possui várias peculiaridades em relação a outros tipos de análises estatísticas. Uma delas é a possibilidade de representar de forma visual as interações entre um determinado conjunto de variáveis. Essa representação recebe o nome de diagrama de trilha (Graham, 2008; Ulman, 2006).

Descobrir se um modelo teórico é aceitável abre caminho a novas descobertas, seja pela criação de mais hipóteses ou pela realização de mais testes experimentais.

### 1.2.2.2. Elementos de um diagrama de trilha

Para explicar as diversas peculiaridades inerentes à análise de trilha será utilizado um diagrama de trilha formado pelas variáveis **Age**, **MCHC**, **Amin** e **dX** (Figura 1.9).

Nesse diagrama, há uma sequência de efeitos de uma variável sobre a outra, como se fosse um caminho, em que cada variável corresponderia a um passo. Nesse exemplo, a correlação entre cada um dos pares de variáveis também havia sido encontrada por meio de regressão linear simples; entretanto, a análise de trilha permitiu descobrir que **Age** exerce efeito indireto sobre **dX** e **Amin**, que são dois importantes parâmetros de estabilidade osmótica. Essa possibilidade de encontrar efeitos indiretos é uma das grandes vantagens da análise de trilha.

Um diagrama de trilha facilita muito a compreensão das relações entre muitas variáveis, pois permite ilustrar essas relações na forma de esquemas, formado por setas, retângulos e círculos. Cada um desses elementos tem um significado. As setas representam o efeito direto e causal de uma variável sobre outra. O valor mostrado por uma seta é denominado coeficiente de trilha e corresponde ao coeficiente de regressão linear. Os retângulos, por sua vez, são

as variáveis observadas e efetivamente medidas. Já os círculos são as variáveis não observadas, e encontradas por meio de estimativas (Ulman, 2006).

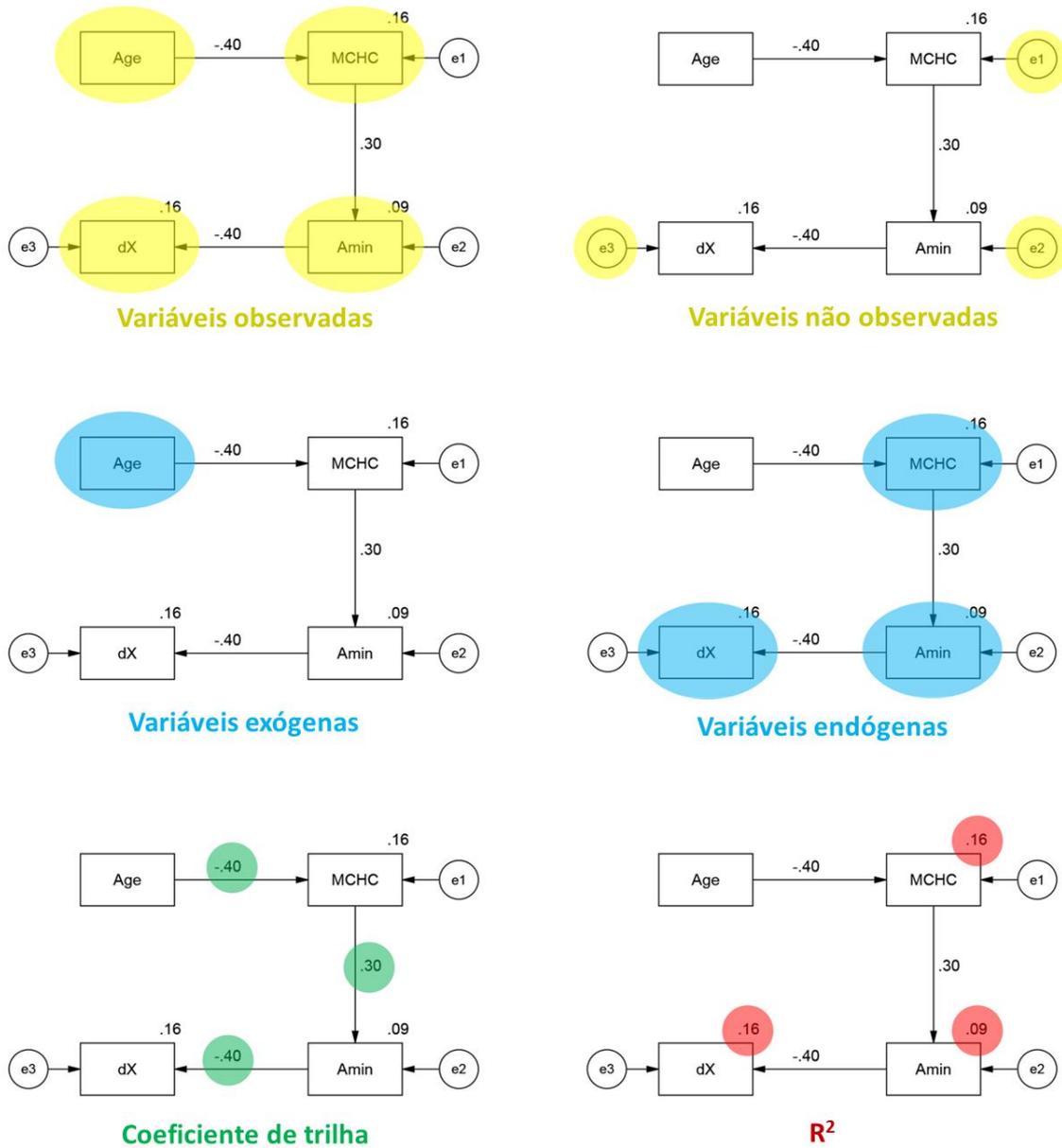


Figura 1.9. Elementos de um diagrama de trilha.

No canto superior direito desses retângulos aparece um número, que é o valor de  $R^2$  da variável a que o retângulo corresponde. O  $R^2$ , também conhecido como coeficiente de determinação, varia de 0 a 1 e indica em termos percentuais o quanto uma determinada variável dependente é explicada por variáveis independentes a ela associadas. Esse parâmetro corresponde ao somatório do valor ao quadrado do coeficiente das trilhas que convergem para uma determinada variável (Graham, 2008; Ullman, 2006).

As variáveis observadas, por sua vez, podem ser classificadas como exógenas ou endógenas (Ullman, 2006). Uma variável que não recebe efeito de nenhuma outra, como é o caso de **Age**, é classificada como exógena. No entanto, uma variável é denominada endógena caso receba efeito de alguma outra variável, independentemente do fato de exercer ou não efeito sobre outra variável (Ullman, 2006). No exemplo, as variáveis endógenas incluem **MCHC**, **Amin** e **dX**.

As variáveis endógenas tem em comum o fato de terem um erro, também chamado de termo residual da regressão, associado a cada uma delas. Esses erros são representados por círculos, que são variáveis não observadas (Graham, 2008; Ullman, 2006).. No exemplo, as variáveis não observadas incluem  $e_1$ ,  $e_2$  e  $e_3$ , que são os erros associados respectivamente a **MCHC**, **Amin** e **dX**.

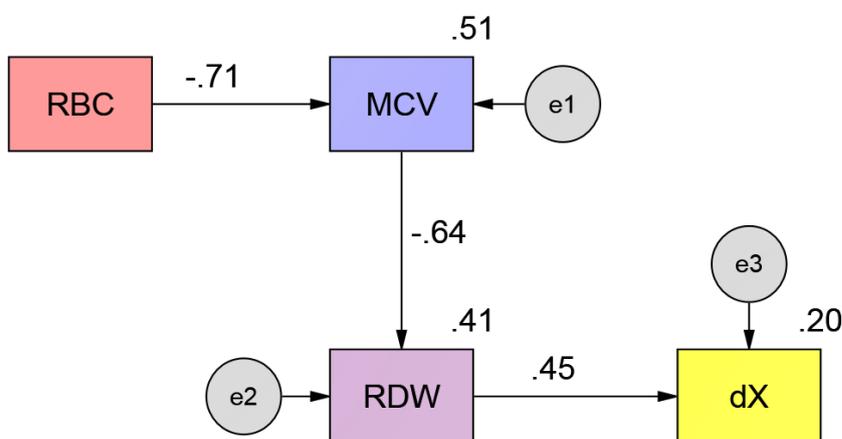
#### 1.2.2.3. *Elaboração de um diagrama de trilha*

A construção de diagramas de trilha é uma atividade que valoriza o trabalho intelectual, pois tais diagramas não são gerados pela simples inserção de dados em um programa estatístico. Ao contrário, são desenhados a partir de hipóteses provenientes de um determinado modelo teórico. Nesse modelo deve ser respeitado o conhecimento já existente sobre a forma como as variáveis que o compõem se relacionem entre si (Graham, 2008; Ullman, 2006). Isso pode ser mais bem exemplificado no diagrama de trilha ilustrado na **Figura 1.10**, que mostra o efeito sucessivo entre as variáveis RBC, MCV, RDW e dX.

Nesse diagrama de trilha há três coeficientes de trilha, que correspondem ao efeito direto entre os seguintes pares de variáveis: RBC-MCV, MCV-RDW e RDW-dX. Matematicamente, o valor do coeficiente de trilha entre RBC e MCV independe do sentido do efeito. Assim, tanto o efeito RBC  $\rightarrow$  MCV ou MCV  $\rightarrow$

RBC teriam o mesmo valor, ou seja, - 0.71. Entretanto, o valor de MCV é calculado a partir de RBC, pois  $MCV = Ht/RBC$ . Seria possível construir um diagrama de trilha com o efeito  $MCV \rightarrow RDW$  que fosse até mesmo aceitável estatisticamente. Entretanto, esse diagrama não corresponderia à realidade.

Outro exemplo é o efeito  $MCV \rightarrow RDW$ , que está correto, já que o RDW é em parte calculado a partir de MCV. E por fim o efeito  $RDW \rightarrow dX$  se justifica pelo fato de que RDW foi obtido antes da realização dos experimentos e, ao contrário de dX, essa variável se refere a condições *in vivo* e não *in vitro*. E as condições *in vitro* são um reflexo das condições *in vivo*, e não o contrário.



**Figura 1.10.** Diagrama de trilha com RBC, MCV, RDW e dX. RBC: Red Blood Cell (quantidade de eritrócitos); MCV: Mean Corpuscular Volume (volume médio dos eritrócitos); RDW: Red Cell Distribution Width; dX: intervalo de hemólise; e1, e2 e e3: erros associados a variáveis endógenas.

Quando a relação entre as variáveis a serem representadas em um diagrama de trilha não é bem conhecida, torna-se necessário fazer suposições. Essas suposições devem ser coerentes (Graham, 2008; Ullman, 2006). Por exemplo, no diagrama de trilha da

**Figura 1.9**, a correlação entre  $A_{min}$  e dX não é muito bem conhecida. Inclusive, um dos objetivos do trabalho para o qual esse diagrama foi elaborado era justamente o de compreender melhor como as variáveis de estabilidade osmótica se relacionam entre si e com outras variáveis. Assim, se supôs que  $A_{min}$  exerceria efeito sobre dX e não o contrário, até porque o valor de  $A_{min}$  não

dependeria tanto da redução da hipotonicidade como dX. Assim, o mais plausível é que os valores de dX dependam dos [valores](#) de  $A_{\min}$ .

#### 1.2.2.4. *Efeitos*

Por meio da análise de trilha também é possível descobrir o efeito direto e indireto de uma variável sobre a outra, assim como o efeito total, que é a soma do efeito direto e indireto; uma vez que o efeito direto é o coeficiente beta da regressão linear múltipla, enquanto que o efeito indireto consiste no produto dos efeitos diretos que o compõem ([Graham, 2008; Ulman, 2006](#)).

O efeito indireto pode ser mediado parcial ou completamente por outra variável. No caso da mediação parcial, tanto o efeito direto como o efeito indireto são significantes. Entretanto, na mediação completa, apenas o efeito indireto é significativo, e o efeito direto só será significativo na ausência da variável mediadora ([Graham, 2008; Ulman, 2006](#)).

Em um diagrama de trilha os efeitos são preferencialmente mostrados na forma padronizada. Nesse caso, as variáveis são transformadas de tal forma que passam a ter média igual a zero e erro igual a um ([Graham, 2008; Ulman, 2006](#)).

#### 1.2.2.5. *Bootstrap*

A obtenção de um efeito indireto que seja significativo requer uma amostra muito grande, constituída por milhares de pontos amostrais. Muitas vezes, não é fácil ou mesmo possível conseguir uma quantidade tão vasta de pontos experimentais. Entretanto, esse problema pode ser contornado por meio do *bootstrap*.

O *bootstrap* é uma ferramenta a partir da qual são formadas novas amostras de mesmo tamanho e a partir dos mesmos elementos que compõem a amostra original. As novas amostras são elaboradas a partir da escolha aleatória com reposição dos elementos que pertencem à amostra original. Isso permite que a amostra total, que inclui a amostra original e as novas amostras, aumente o suficiente para que possam ser calculados efeitos indiretos significantes. Para

esse cálculo não pode haver células com ausência de dados (*missing data*) (Ulman, 2006).

Uma variável que transmita um efeito indireto é denominada mediador. Por exemplo, na **Figura 1.10** temos que MCV exerce efeito indireto sobre dX por meio de RDW. Nesse caso RDW atua como mediador. O efeito indireto pode ser calculado manualmente pela multiplicação do efeito direto de MCV sobre RDW e de RDW sobre dX. Já no caso do efeito indireto de RBC sobre dX, MCV e RDW são mediadores, e o efeito indireto é obtido pelo produto do efeito direto entre essas variáveis.

O efeito indireto não é como um silogismo. O fato dos efeitos  $A \rightarrow B$  e  $B \rightarrow C$  serem significantes não significa, necessariamente, que o efeito indireto  $A \rightarrow C$  também será significativo. Inclusive, por que é possível que os efeitos possam se anular, caso possuam sinais diferentes (+ e -).

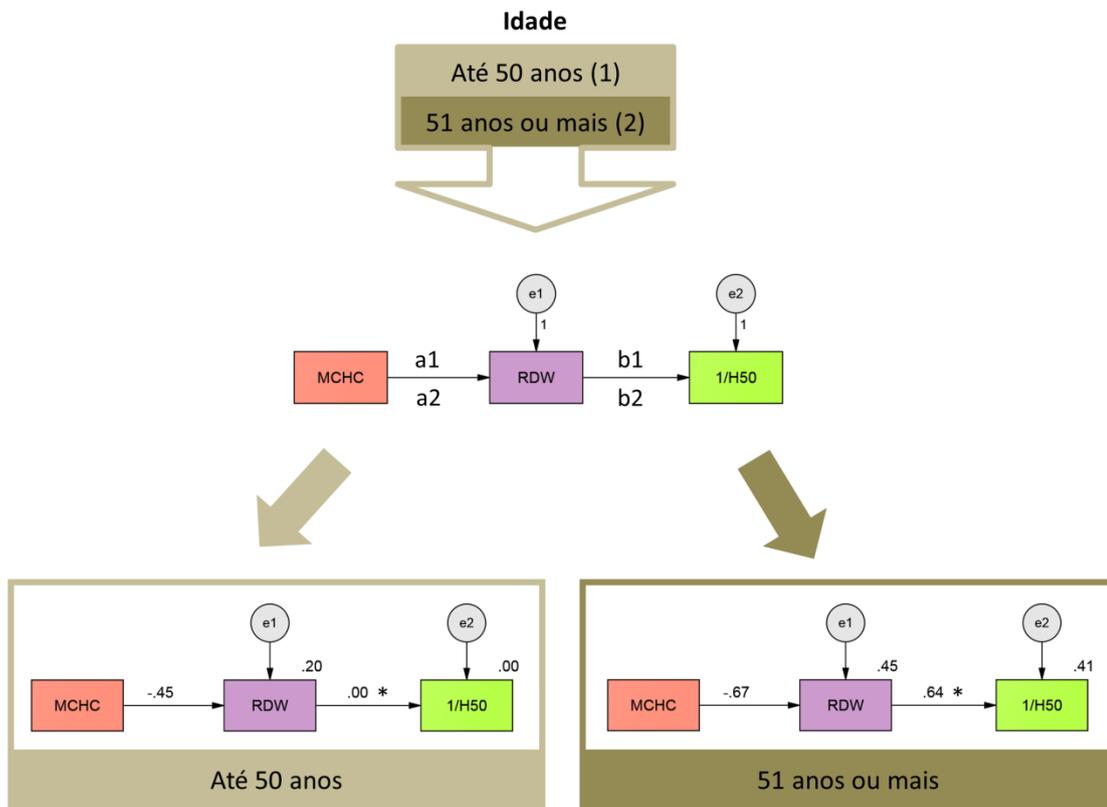
#### 1.2.2.6. Moderação

Um diagrama de trilha pode ser elaborado de modo que se tenha a participação de um moderador, que geralmente é uma variável categórica do tipo binária, como o gênero. O moderador atua sobre o efeito direto das demais variáveis de um determinado modelo, fazendo com que esse efeito aumente ou diminua, podendo até mesmo alterar a significância desse efeito. Isso é chamado de interação. Já a simples mediação do efeito entre duas variáveis por uma terceira variável é chamada de confundimento, sendo que a variável que atua como mediador é chamada de confundidor (Ulman, 2006).

Uma variável que possa atuar como moderadora é composta por níveis. No caso do gênero, há dois níveis ou categorias, um sendo o masculino e outro o feminino. Diversas outras variáveis também podem ter ação moderadora, como a gravidade de uma doença, e essa variável não precisa estar limitada a apenas dois níveis.

Vejam como exemplo a seguinte trilha:  $MCHC \rightarrow RDW \rightarrow 1/H50$  (**Figura 1.11**). Essa trilha foi elaborada a partir de informações coletadas de pacientes do gênero feminino. A idade foi dividida em dois grupos, onde os indivíduos foram

agrupados conforme o fato de terem ou não mais de 50 anos. Nesse caso a idade se comporta como uma variável categórica binária ou dicotômica.



**Figura 1.11.** Efeito moderador da idade em um diagrama de trilha. \*Efeito direto afetado de forma significativa pela idade.

Como o moderador tem duas categorias, isso significa que há dois grupos distintos sobre o qual essa variável exerce efeito. O moderador não aparece explicitamente no diagrama de trilha tal como as demais variáveis.

Para saber se um moderador exerce efeito significativo sobre um determinado efeito direto é preciso definir os grupos, nomear as trilhas em cada um dos grupos e em seguida calcular o *critical ratio for differences*. Essa é uma medida correspondente ao valor de *z*. Por essa razão valores maiores do que 1.96 correspondem a uma significância com valor igual ou inferior a 0.05 (Ulman, 2006).

No exemplo (Figura 1.11) foi constatado que a idade não afeta o efeito de MCHC sobre RDW, apesar de tanto MCHC como RDW serem diferentes nos dois

grupos que haviam sido formados tendo-se como critério a idade. Ou seja, mesmo o MCHC tendo sido significativamente maior no grupo de menor idade e o RDW maior no grupo de maior idade, ainda assim não houve diferença significativa no valor do coeficiente de trilha de MCHC → RDW do grupo com até 50 anos em relação àquele com idade superior.

#### 1.2.2.7. *Model fit*

Na análise de trilha há vários parâmetros que funcionam como *model fit* e que servem para informar se um modelo teórico representado por um determinado diagrama de trilha é plausível ou não (**Tabela 1.2**). Basicamente, esses parâmetros indicam se o diagrama de trilha é estatisticamente significativa.

**Tabela 1.2.** *Parâmetros de model fit.*

Tipos de parâmetro	Abreviação	Nome	Valor de referência
Mais citados	CMIN p	Chi-square p	> 0.05
	GFI	Goodness Fit Index	> 0.95
	NNFI	Non Normal Fit Index	> 0.95
	CFI	Comparative Fit Index	> 0.95
	RMSEA	Root Mean Squared Error of Approx.	< 0.05
Importantes	CMIN/DF	-	< 2.0
	NFI	Normal Fit Index	> 0.95
	PCLOSE	-	> 0.05
	SRMR	Standarized Root Mean Residual	< 0.05

Ferramentas estatísticas mais simples que a análise de trilha requer um único ou poucos parâmetros para que possam indicar se uma determinada análise estatística é realmente significativa. Esse é o caso da regressão linear. Nesse tipo de análise a significância do modelo como um todo e também dos coeficientes beta são suficientes para determinar se uma determinada regressão gerada é estatisticamente aceitável ([Courville & Thompson, 2001](#); [Graham, 2008](#)).

Na análise de trilha, por outro lado, existem dezenas de parâmetros de *model fit*. Dentre eles, destacam-se o  $\chi^2$  do qui-quadrado, CFI, GFI, NNFI e RMSEA (Hooper, Coughlan, & Mullen, 2008; Hua & Bentler, 1999; Ulman, 2006). Para que um diagrama de trilha possa ser considerado plausível, é necessário que todos os parâmetros de *model fit* selecionados apresentem simultaneamente valores condizentes com um bom modelo. É como se fosse um *check list* de um avião. Somente se todos os itens verificados estiverem em condições adequadas é que o avião poderá levantar voo.

De acordo com alguns autores, o primeiro item do *check list* da análise de trilha é a significância do qui-quadrado. Se essa significância for menor do que 0.05 nem adianta seguir com a verificação dos demais parâmetros de *model fit* da lista, pois isso mostraria que os dados observados (medidos) são diferentes dos esperados (estimados). Entretanto, o qui-quadrado sofre muita influência do tamanho da amostra, pois tende a ser significativo em amostras grandes, com mais de 400 pontos amostrais (Hooper et al., 2008; Hua & Bentler, 1999; Ulman, 2006).

A medida de *model fit* mais popular atualmente é o RMSEA (*Root Mean Squared Error of Approximation*). Ela é indicada em praticamente todos os trabalhos que aplicam análise de trilha ou SEM. Seu valor varia de 0 a 1. Entretanto, ao contrário dos demais indicadores de *model fit*, valores mais próximos de 0 indicam melhor *fit* (Hooper et al., 2008; Hua & Bentler, 1999; Ulman, 2006).

Contudo, o RMSEA tende a ser muito grande em amostras pequenas, o que dificulta a obtenção de bons modelos teóricos gerados por análise de trilha quando não se tem uma quantidade suficientemente grande de pontos amostrais (Hooper et al., 2008; Hua & Bentler, 1999; Ulman, 2006).

Outro parâmetro bastante citado é o NNFI (*Non-normed Fit Index*), que é similar ao NFI (*Normed Fit Index*). Entretanto, apesar dos aspectos em comum com o NNFI, o NFI não é muito citado. Para entender essa preferência pelo NNFI em detrimento do NFI é importante conhecer um pouco mais sobre cada um desses parâmetros.

#### 1.2.2.8. NFI e NNFI

O NFI, também conhecido por *Bentler-Bonett Index*, foi um dos primeiros parâmetros de ajuste proposto na literatura científica. Entretanto, esse parâmetro não é afetado pela quantidade de variáveis presentes em um determinado modelo teórico. Portanto, os modelos que são desnecessariamente complexos porque possuem variáveis em excesso não são penalizados com piores valores de NFI (Hooper et al., 2008; Hua & Bentlerb, 1999; Ulman, 2006).

Por outro lado, o NNFI, também chamado de *Tucker Lewis Index*, penaliza a adição de variáveis em um modelo. Isso acontece porque a incorporação de mais variáveis resulta em aumento dos graus de liberdade (Hooper et al., 2008; Hua & Bentlerb, 1999; Ulman, 2006).

Além disso, o NNFI também depende do tamanho médio das correlações entre as variáveis de um modelo. Por exemplo, em um determinado modelo, a adição de uma variável que não se correlaciona com as variáveis já presentes, resulta em valores piores de NNFI (Hooper et al., 2008; Hua & Bentlerb, 1999; Ulman, 2006).

Tanto o NFI quanto o NNFI apresentam valores que variam de 0 a 1, sendo que, quanto mais próximo de 1, melhor é o modelo. O CFI (*Comparative Fit Index*) é uma medida de não centralidade e também apresenta valores nesse mesmo intervalo, sendo interpretado da mesma forma. O mesmo vale para o GFI (*Goodness Fit Index*). Eventualmente o NNFI pode apresentar valores um pouco superiores a 1, especialmente em amostras pequenas. Entretanto, para fins de comparação, admitem-se apenas valores de NNFI de até 1 (Hooper et al., 2008; Hua & Bentlerb, 1999; Ulman, 2006).

Outros parâmetros importantes de *model fit* incluem CMIN/DF, SRMR, PCLOSE e NFI. Esses parâmetros não são citados com tanta frequência, mas são sugeridos por diversos autores (Hooper et al., 2008; Hua & Bentlerb, 1999; Ulman, 2006)

#### 1.2.2.9. Limitações

Há limitações envolvendo a análise de trilha, e uma delas é o fato de que as variáveis estudadas precisam apresentar distribuição normal. Esse também é

um pré-requisito de outros tipos de análise multivariada. Entretanto, essa é mais uma limitação de *software*, no caso o AMOS, do que da ferramenta estatística em si.

Além disso, a proporção da quantidade de variáveis em relação ao tamanho da amostra precisa ser de pelo menos 5 para 1. O valor ideal seria de 20 para 1, mas uma proporção de 10 para 1 já seria adequada (Bentler & Chou, 1987).

Essa proporção restringe a quantidade de variáveis que podem fazer parte de um modelo teórico. Portanto, para testar a validade de modelos teóricos mais complexos é necessário que se tenha uma amostra suficientemente grande. Entretanto, em amostras demasiadamente grandes pode haver uma quantidade indiscriminadamente elevada de resultados significantes, de modo que não fica claro o que realmente é importante (Bentler & Chou, 1987).

A inclusão de muitas variáveis em um modelo teórico prejudica o valor de diversos índices de *model fit*. No entanto, um modelo teórico com uma quantidade muito pequena de variáveis pode se tornar demasiadamente pouco explicativo e com isso deixar de ser útil, pois não revelaria informações que complementaríamos aquelas que já teriam sido obtidas por ferramentas estatísticas mais simples. Assim, um bom diagrama de trilha é obtido quando o máximo de explicação é conseguido com o mínimo de variáveis (Kenny & McCoach, 2003).

#### 1.2.2.10. Comparação com outras ferramentas estatísticas

Os mesmos efeitos identificados por meio da análise de trilha também poderiam ser encontrados a partir da realização de várias regressões múltiplas sucessivas. Entretanto, esse processo, além de muito trabalhoso, seria limitado, pois não permitiria obter informações adicionais a respeito do efeito, como o erro e a significância (Tabela 1.1).

Na análise de trilha não há restrição quanto à quantidade de variáveis dependentes, o que também acontece na correlação canônica. Entretanto, na análise de trilha, a classificação de uma variável em dependente ou independente é dinâmica, pois esta pode ser uma ou outra ao mesmo tempo, sendo determinado pelas demais variáveis com as quais esteja associada (Tabela 1.3).

**Tabela 1.3.** Comparação das principais ferramentas estatísticas usadas nesta tese

Tipo de correlação	Variáveis dependentes	Variáveis independentes	Classificação
Bivariada	Apenas uma	Apenas uma	Fixo
Regressão múltipla	Apenas uma	Várias	Fixo
Canônica	Várias	Várias	Fixo
Análise de trilha	Várias	Várias	Dinâmico

Por exemplo, na [Figura 1.10](#), o MCV é uma variável dependente em relação ao RBC, mas independente quando correlacionado com RDW. Assim, em uma mesma análise, o MCV se comporta como uma variável dependente e independente, conforme o fato de estar recebendo ou gerando algum efeito, respectivamente.

Na correlação canônica, por outro lado, a classificação de uma variável em dependente ou independente é fixa, pois ocorre de acordo com o grupo em que a variável se encontra. Assim, para que a classificação de uma determinada variável mude, essa variável precisa passar de um grupo para outro, e isso requer a realização de uma nova análise.

#### 1.2.2.11. *Origem e crescimento*

A análise de trilha foi desenvolvida pelo geneticista Sewall Wright em 1917 ([Wright, 1917](#)). Desde então esta ferramenta estatística tem sido aplicada em diferentes áreas, principalmente nas ciências sociais. Entretanto, ultimamente tem sido cada vez maior a utilização dessa ferramenta na área da saúde ([Kuntsche, Knibbe, & Gmel, 2010](#); [Qiu et al., 2007](#); [Reyes et al., 2011](#)).

O crescimento do uso da análise de trilha na área da saúde se justifica pelo fato de que o uso de ferramentas estatísticas tradicionais, nas quais o efeito de uma variável é analisado isoladamente, é um fator limitante para um maior entendimento de processos biológicos. Afinal, tais processos geralmente se caracterizam pela relação simultânea entre diferentes variáveis.

#### 1.2.2.12. Softwares

Diversos *softwares* podem ser utilizados na realização de análise de trilha. Um dos pioneiros foi o LISREL (*Linear Structural Relations*), desenvolvido na década de 1970. Outros *softwares* incluem o SAS (*Statistical Software Analysis*), o Mplus e o AMOS (*Analysis of Momentum Structure*). Todos esses *softwares* tem em comum o fato de serem pagos. Mas há também *softwares* livres, como é o caso do R (Narayanan, 2012).

Um dos *softwares* mais utilizados na análise de trilha é o AMOS. Isso se deve provavelmente a sua facilidade de uso e quantidade de tutoriais disponíveis na internet. Inclusive, esses foram os principais motivos pelos quais adotamos esse *software* nas análises de trilha que realizamos atualmente. Também pesou em nossa escolha o fato desse *software* pertencer à IBM, já que essa é uma empresa bem conceituada.

Há *softwares* gratuitos que podem ser usados para a análise de trilha, como o *smartPLS*. Outro *software* gratuito de destaque é o *GENES*, que foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa. Pelo nome, percebe-se que esse programa foi idealizado para ser utilizado na área de genética. Entretanto, o seu uso não é restrito a essa área. Inclusive, esse foi o *software* que inicialmente utilizamos em nossos primeiros trabalhos.

O *GENES* já não recebe novas atualizações há bastante tempo e acabou se tornando incompatível com o Windows a partir da versão 7 desse sistema operacional. Além disso, o *GENES* exibia diversos *bugs* que, para serem evitados, exigiam a realização de atividades redundantes o que implicava em perda de tempo. Um desses *bugs* era a dificuldade de se inserir dados no programa, que só eram aceitos se estivessem na forma de matriz de correlação em texto MS-DOS, além da ausência de uma interface gráfica que permitisse elaborar diagramas de trilha.

### 1.3. REFERÊNCIAS

- Araki, K., & Rifkind, J. M. (1980). Erythrocyte membrane cholesterol. *Life Science*, 26, 2223-2230.
- Bakaltcheva, I. B., Odeyale, C. O., & Spargo, B. J. (1996). Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochim Biophys Acta*, 1280(1), 73-80.
- Bentler, P. M., & Chou, C. P. (1987). Practical Issues in Structural Modeling. *Sociological Methods & Research*, 16(1), 78-117. doi: 10.1177/0049124187016001004
- Brites, D., Silva, R., & Brito, A. (1997). Effect of bilirubin on erythrocyte shape and haemolysis, under hypotonic, aggregating or non-aggregating conditions, and correlation with cell age. *Scand J Clin Lab Invest*, 57(4), 337-349.
- Caporal, F. A., & Comar, S. R. (2013). Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. *Journal of Brazilian Patology and Medical Laboratory*, 49(5), 324-331.
- Cassoly, R. (1982). Interaction of hemoglobin with the red blood cell membrana a saturation transfer electron paramagnetic resonance study. *Biochim Biophys Acta*, 689, 203-209.
- Cazzola, R., Rondanelli, M., Trotti, R., & Cestaro, B. (2011). Effects of weight loss on erythrocyte membrane composition and fluidity in overweight and moderately obese women. *J Nutr Biochem*, 22(4), 388-392. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.03.007
- Chabanel, A., Flamm, M., Sung, K. L., Lee, M. M., Schachter, D., & Chien, S. (1983). Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys J*, 44(2), 171-176. doi: 10.1016/S0006-3495(83)84288-X
- Chasis, J. A., Agre, P., & Mohandas, N. (1988). Decreased membrane mechanical stability and in vivo loss of surface area reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. *J Clin Invest*, 82(2), 617-623. doi: 10.1172/JCI1113640
- Condon, M. R., Kim, J. E., Deitch, E. A., Machiedo, G. W., & Spolarics, Z. (2003). Appearance of an erythrocyte population with decreased deformability and

- hemoglobin content following sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(6), H2177-2184. doi: 10.1152/ajpheart.01069.2003
- Conham, P. B. (1969). Difference in Geometry of Young and Old Human Erythrocytes Explained by a Filtering Mechanism. *Circulation Research*, 25(1), 39-45. doi: 10.1161/01.res.25.1.39
- Constantino, B. T. (2013). Red Cell Distribution Width, Revisited. *Lab Medicine*, 44(2). doi: 10.1309/LMZ1GKY9LQTVFBL7
- Cooper, R. (1975). Modification of red cell membrane structure by cholesterol-Rich lipid dispersion. *Journal of Clinical Investigation*, 55, 115-196.
- Courville, T., & Thompson, B. (2001). Use of Structure Coefficients in Published Multiple Regression Articles. *Educational and Psychological Measurement*, 61, 229-248. doi: 10.1177/0013164401612006
- Cunha, C. C., Arvelos, L. R., Costa, J. O., & Penha-Silva, N. (2007). Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr*, 39(4), 341-347. doi: 10.1007/s10863-007-9092-z
- Custodio Afonso Rocha, V., Ramos de Arvelos, L., Pereira Felix, G., Nogueira Prado de Souza, D., Bernardino Neto, M., Santos Resende, E., & Penha-Silva, N. (2012). Evolution of nutritional, hematologic and biochemical changes in obese women during 8 weeks after Roux-en-Y gastric bypass. *Nutr Hosp*, 27(4), 1134-1140. doi: 10.3305/nh.2012.27.4.5812
- D'Alessandro, A., Blasi, B., D'Amici, G. M., Marrocco, C., & Zolla, L. (2013). Red blood cell subpopulations in freshly drawn blood: application of proteomics and metabolomics to a decades-long biological issue. *Blood Transfus*, 11(1), 75-87. doi: 10.2450/2012.0164-11
- Dawson, R. (2011). How Significant is a Boxplot Outlier? *Journal of Statistics Education*, 19(2), 1-13.
- de Arvelos, L. R., Rocha, V. C., Felix, G. P., da Cunha, C. C., Bernardino Neto, M., da Silva Garrote Filho, M., . . . Penha-Silva, N. (2013). Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. *J Membr Biol*, 246(3), 231-242. doi: 10.1007/s00232-013-9524-0

- de Freitas, M. V., de Oliveira, M. R., dos Santos, D. F., de Cassia Mascarenhas Netto, R., Fenelon, S. B., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *J Membr Biol*, 233(1-3), 127-134. doi: 10.1007/s00232-010-9232-y
- de Freitas, M. V., Marquez-Bernardes, L. F., de Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., Goncalves, E. O. A. F., Mascarenhas Netto, R. D., . . . Penha-Silva, N. (2013). Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*. doi: 10.1179/1607845413Y.0000000145
- Ejima, J., Ijichi, T., Ohnishi, Y., Maruyama, T., Kaji, Y., Kanaya, S., . . . Ohmura, T. (2000). Relationship of high-density lipoprotein cholesterol and red blood cell filterability: cross-sectional study of healthy subjects. *Clin Hemorheol Microcirc*, 22(1), 1-7.
- Fonseca, L. C., Arvelos, L. R., Netto, R. C., Lins, A. B., Garrote-Filho, M. S., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. *J Bioenerg Biomembr*, 42(5), 413-418. doi: 10.1007/s10863-010-9310-y
- Forsyth, A. M., Braunmuller, S., Wan, J., Franke, T., & Stone, H. A. (2012). The effects of membrane cholesterol and simvastatin on red blood cell deformability and ATP release. *Microvasc Res*, 83(3), 347-351. doi: 10.1016/j.mvr.2012.02.004
- Frank, S. M., Abazyan, B., Ono, M., Hogue, C. W., Cohen, D. B., Berkowitz, D. E., . . . Barodka, V. M. (2013). Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration. *Anesth Analg*, 116(5), 975-981. doi: 10.1213/ANE.0b013e31828843e6
- Ganzoni, A. M., Oakes, R., & Hillman, R. S. (1971). Red cell aging in vivo. *J Clin Invest*, 50(7), 1373-1378. doi: 10.1172/JCI106619
- George-Gay, B., & Parker, K. (2003). Understanding the complete blood count with differential. *J Perianesth Nurs*, 18(2), 96-114; quiz 115-117. doi: 10.1053/jpan.2003.50013
- Goldstein, D. B. (1986). Effect of alcohol on cellular membranes. *Ann Emerg Med*, 15(9), 1013-1018.

- Graham, J. M. (2008). The General Linear Model as Structural Equation Modeling. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 33(485-506). doi: 10.3102/1076998607306151
- Greenwalt, T. J., Bryan, D. J., & Dumaswala, U. J. (1984). Erythrocyte membrane vesiculation and changes in membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1. *Vox Sang*, 47(4), 261-270.
- Griggs, R. C., Weisman, R., & Harris, J. W. (1959). Alteration in osmotic and mechanical fragility related to in vivo erythrocyte aging and splenic sequestration in hereditary spherocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 39(1), 89-101.
- Gromadzinski, L., Januszko-Giergielewicz, B., & Pruszczyk, P. (2014). Red cell distribution width is an independent factor for left ventricular diastolic dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. doi: 10.1007/s10157-014-1033-7
- Hooper, D., Coughlan, J., & Mullen, M. R. (2008). Structural Equation Modelling: Guidelines for Determining Model Fit. *Electronic Journal of Business Research Methods*, 6(1), 53-60.
- Hua, L. t., & Bentlerb, P. M. (1999). Cutoff criteria for fit indexes in covariance structure analysis: Conventional criteria versus new alternatives. *Structural Equation Modeling*, 6(1), 1-55. doi: 10.1080/10705519909540118
- Hui, D. Y., & Harmony, J. A. K. (1979). Interaction of plasma lipoproteins with erythrocytes
- i. Alteration of erythrocyte morphology. *Biochim Biophys Acta*, 550, 407-424.
- Jay, A. W., & Rowlands, S. (1975). The stages of osmotic haemolysis. *J Physiol*, 252(3), 817-832.
- Kameneva, M. V., Garrett, K. O., Watach, M. J., & Borovetz, H. S. (1998). Red blood cell aging and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc*, 18(1), 67-74.
- Kameneva, M. V., Watach, M. J., & Borovetz, H. S. (1999). Gender difference in rheologic properties of blood and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc*, 21(3-4), 357-363.

- Kenny, D. A., & McCoach, B. D. (2003). Effect of the number of variables on measures of fit in structural equation modeling. *Structural Equation Modeling, 10*, 333-351.
- Koury, M. J., & Ponka, P. (2004). New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu Rev Nutr, 24*, 105-131. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306
- Kuntsche, S., Knibbe, R. A., & Gmel, G. (2010). A step beyond--the relevance of depressed mood and mastery in the interplay between the number of social roles and alcohol use. *Addict Behav, 35*(11), 1013-1020. doi: 10.1016/j.addbeh.2010.06.020
- Lange, Y., & Slayton, J. M. (1982). Interaction of cholesterol and lysophosphatidylcholine in determining red cell shape. *J Lipid Res, 23*(8), 1121-1127.
- Macdougall, L. G. (1968). Red cell metabolism in iron-deficiency anemia. *J Pediatr, 72*(3), 303-318.
- Marks, P. A., & Johnson, A. B. (1958). Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance. *Journal of Clinical Investigation, 11*(37), 1542-1548.
- Mascarenhas Netto Rde, C., Fabbri, C., de Freitas, M. V., Bernardino Neto, M., Garrote-Filho, M. S., Lacerda, M. V., . . . Penha-Silva, N. (2014). Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res, 113*(3), 863-874. doi: 10.1007/s00436-013-3717-4
- Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Muscettola, M., Longini, M., & Buonocore, G. (2002). Gender-related differences in erythrocyte glutathione peroxidase activity in healthy subjects. *Clin Endocrinol (Oxf), 57*(5), 663-667.
- Matyushichev, V. B., Shamratova, V. G., & Muzafarova, D. A. (1999). Qualitative difference between Male and Female Erythrocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 128*(10), 978-980.
- Mela, C. F., & Kopalle, P. K. (2002). The impact of collinearity on regression analysis: the asymmetric effect of negative and positive correlations. *Applied Economics, 34*, 667-677. doi: 10.1080/0003684011005848

- Menchaca, H. J., Michalek, V. N., Rohde, T. D., O'Dea, T. J., & Buchwald, H. (1998). Decreased blood oxygen diffusion in hypercholesterolemia. *Surgery*, *124*(4), 692-698. doi: 10.1067/msy.1998.90944
- Meurs, I., Hoekstra, M., van Wanrooij, E. J., Hildebrand, R. B., Kuiper, J., Kuipers, F., . . . Van Eck, M. (2005). HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Exp Hematol*, *33*(11), 1309-1319. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.004
- Minetti, M., Agati, L., & Malorni, W. (2007). The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases. *Cardiovasc Res*, *75*(1), 21-28. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.007
- Mohandas, N., Clark, M. R., Jacobs, M. S., & Shoehet, S. (1980). Analysis of Factors Regulating Erythrocytes Deformability. *Journal of Clinical Investigation*, *66*, 563-573.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, *112*(10), 3939-3948. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166
- Musielak, M. (2009). Red blood cell-deformability measurement: review of techniques. *Clin Hemorheol Microcirc*, *42*(1), 47-64. doi: 10.3233/CH-2009-1187
- Narayanan, A. (2012). A Review of Eight Software Packages for Structural Equation Modeling. *The American Statistician*, *66*(2), 129-138. doi: 10.1080/00031305.2012.708641
- Nimon, K. F. (2012). Statistical assumptions of substantive analyses across the general linear model: a mini-review. *Front Psychol*, *3*, 322. doi: 10.3389/fpsyg.2012.00322
- Parpart, A. K., Lorenz, P. B., Parpart, E. R., Gregg, J. R., & Chase, A. M. (1947). The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *Journal of Clinical Investigation*, *26*(4), 636-640.
- Penha-Silva, N., Arvelos, L. R., Cunha, C. C., Aversi-Ferreira, T. A., Gouvea-e-Silva, L. F., Garrote-Filho, M. S., . . . de Freitas Reis, F. G. (2008). Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry*, *73*(1), 23-29. doi: 10.1016/j.bioelechem.2008.04.002

- Penha-Silva, N., Firmino, C. B., de Freitas Reis, F. G., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., de Freitas, M. V., & Netto, R. C. (2007). Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*, 128(7-8), 444-449. doi: 10.1016/j.mad.2007.06.007
- Perrotta, S., Gallagher, P. G., & Mohandas, N. (2008). Hereditary spherocytosis. *Lancet*, 372(9647), 1411-1426. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61588-3
- Qiu, L., Leng, S., Wang, Z., Dai, Y., Zheng, Y., & Wang, Z. (2007). Path analysis of biomarkers of exposure and early biological effects among coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(6), 1193-1199. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0001
- Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21-33.
- Reyes, M., Gahagan, S., Diaz, E., Blanco, E., Leiva, L., Lera, L., & Burrows, R. (2011). Relationship of adiposity and insulin resistance mediated by inflammation in a group of overweight and obese Chilean adolescents. *Nutr J*, 10, 4. doi: 10.1186/1475-2891-10-4
- Rifkind, J. M., Araki, K., & Hadley, E. C. (1983). The Relationship between the Osmotic Fragility of Human-Erythrocytes and Cell Age. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 222(2), 582-589. doi: Doi 10.1016/0003-9861(83)90556-8
- Risso, A., Turello, M., Biffoni, F., & Antonutto, G. (2007). Red blood cell senescence and neocytolysis in humans after high altitude acclimatization. *Blood Cells Mol Dis*, 38(2), 83-92. doi: 10.1016/j.bcmed.2006.10.161
- Rodriguez-Carrio, J., Alperi-Lopez, M., Lopez, P., Alonso-Castro, S., Ballina-Garcia, F. J., & Suarez, A. (2014). Red cell distribution width is associated with cardiovascular risk and disease parameters in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. doi: 10.1093/rheumatology/keu345
- Ruston, D. H., Dover, R., Sainsbury, A. W., Norris, M. J., & Gilkes, J. J. H. (2001). Why should women have lower reference limits for haemoglobin and ferritin concentrations than men? , 322(BMJ), 1355-1357.
- Saari, J. T., & Beck, J. S. (1975). Hypotonic hemolysis of human red blood cells: a two-phase process. *J Membr Biol*, 23(3-4), 213-226.

- Shalel, S., Streichman, S., & Marmur, A. (2002). Monitoring surfactant-induced hemolysis by surface tension measurement. *J Colloid Interface Sci*, *255*(2), 265-269. doi: 10.1006/jcis.2002.8621
- Sherry, A. (2005). Conducting and Interpreting Canonical Correlation Analysis in Personality Research. *Journal of Personality Assessment*, *84*(1), 37-48.
- Shperling, T., & Danon, D. (1990). Age population distribution of erythrocytes in young and old healthy donors. *Exp Gerontol*, *25*(5), 413-422.
- Sonmez, M., Ince, H. Y., Yalcin, O., Ajdzanovic, V., Spasojevic, I., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2013). The effect of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size. *PLoS One*, *8*(9), e76579. doi: 10.1371/journal.pone.0076579
- Ulman, J. B. (2006). Structural Equation Modeling: Rreviewing the Basic and Moving Forward. *Journal of Personality Assessment*, *87*(1), 35-50.
- Vaya, A., Camara, R., Hernadez-Mijares, A., Romagnoli, M., Sola, E., Corella, D., & Laiz, B. (2010). Erythrocyte deformability in morbid obesity before bariatric surgery. Influence of abdominal obesity. *Clin Hemorheol Microcirc*, *46*(4), 313-320. doi: 10.3233/CH-2010-1357
- Vaya, A., Simo, M., Santaolaria, M., Todoli, J., & Aznar, J. (2005). Red blood cell deformability in iron deficiency anaemia. *Clin Hemorheol Microcirc*, *33*(1), 75-80.
- Warnick, R., Knopp, R. H., Fitzpatrick, V., & Branson, L. (1990). Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol by the Friedewald Equation is Adequate for Classifying Patients on the Basis of Nationally Recommended Cutpoints. *Clinical Chemistry*, *36*, 15-19.
- Waugh, R. E., Narla, M., Jackson, C. W., Mueller, T. J., Suzuki, T., & Dale, G. L. (1992). Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood*, *79*(5), 1351-1358.
- Wright, S. (1917). On the nature of size factors. *Genetics*, *3*, 367-374.
- Zou, K. H., Tuncali, K., & Silverman, S. G. (2003). Correlation and simple linear regression. *Radiology*, *227*(3), 617-622. doi: 10.1148/radiol.2273011499

## CAPÍTULO 2

### **ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS EXPLICADA PELOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE COLESTEROL E PELA DISTRIBUIÇÃO DE VOLUME DAS CÉLULAS VERMELHAS (RDW)**

---

Artigo de acordo com as normas da revista *Biomed Research International*.

## 2. ERYTHROCYTE STABILITY EXPLAINED BY THE BLOOD LEVELS OF CHOLESTEROL AND THE RED CELL DISTRIBUTION WIDTH

Mario da Silva Garrote-Filho<sup>1</sup>, Lúbia Cristina Fonseca<sup>1</sup>, Lara Ferreira Paraiso<sup>1</sup>, Morun Bernardino-Neto<sup>1</sup>, Liandra de Freitas Marquez-Bernardes<sup>1</sup>, Simone Cristina da Silva<sup>1</sup>, Paulo César Alves de Souza<sup>1</sup> e Nilson Penha-Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil

\* Corresponding author: e-mail: nspenha@ufu.br

**ABBREVIATIONS:** Glu: glucose; Hb: hemoglobin; HDL-C: HDL cholesterol; Ht: hematocrit; LDL-C: LDL cholesterol; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume; RBC: red blood cell; RDW: red cell distribution width; t-C: total cholesterol; TGC: triglycerides.

## RESUMO

### **ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS EXPLICADA PELOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE COLESTEROL E PELA DISTRIBUIÇÃO DE VOLUME DAS CÉLULAS VERMELHAS**

A estabilidade de eritrócitos é o resultado de interações entre vários fatores. Alguns deles são inerentes às células vermelhas (como os índices hematimétricos), enquanto outros advêm de influências do meio externo (como os índices bioquímicos). O presente estudo usou análise de trilha para avaliar como os índices hematológicos e bioquímicos afetam a estabilidade de eritrócitos sob estresse hipotônico. A estabilidade de eritrócitos foi avaliada pelo teste da fragilidade osmótica, que forneceu os parâmetros de estabilidade  $dX$  e  $1/H_{50}$ . O parâmetro  $dX$  representa a faixa de concentração de NaCl necessária para promover 100% de hemólise e  $1/H_{50}$  corresponde ao inverso da concentração de sal na qual ocorre 50% de hemólise. Ambos os parâmetros de estabilidade se correlacionaram mais significativamente com os índices hematológicos, destacadamente com a distribuição de volume das células vermelhas (RDW). Correlações positivas foram observadas para  $dX$  e  $1/H_{50}$  com RDW e correlações negativas foram observadas entre  $dX$  e os valores da hemoglobina corpuscular média (MCH) e o volume corpuscular médio (MCV) dos eritrócitos. Estes resultados estão provavelmente relacionados com o ciclo de vida dos eritrócitos e podem ajudar a esclarecer os mecanismos pelos quais valores elevados de RDW têm em relação ao prognóstico de muitas condições patológicas.

Palavras-chave: Fragilidade osmótica, análise multivariada, correlação canônica, análise de trilha

## 2.1. ABSTRACT

### ERYTHROCYTE STABILITY EXPLAINED BY THE BLOOD LEVELS OF CHOLESTEROL AND THE RED CELL DISTRIBUTION WIDTH

The erythrocyte stability is the result of interactions among several factors. Some of them are inherent to the red cell (e.g., the hematimetric indices), whereas others arise from the external environment (e.g., biochemical indices). The present study used path analysis to evaluate how hematological and biochemical indices affect erythrocyte stability under hypotonic stress. The erythrocyte stability was evaluated by the osmotic fragility test, which provided the stability parameters  $dX$  and  $1/H_{50}$ . The parameter  $dX$  represents the range of NaCl concentration necessary to promote 100% hemolysis and  $1/H_{50}$  correspond to the inverse of the salt concentration in which there was 50% hemolysis. Both these stability parameters correlated more significantly with the hematological variables, markedly with the Red Cell Distribution width (RDW). Positive correlations were observed for  $dX$  and  $1/H_{50}$  with the RDW and negative correlations were observed between  $dX$  and the values of mean corpuscular hemoglobin (MCH) and volume (MCV) of erythrocytes. These results are probably related to the erythrocytes life cycle and may help to shed some light on the mechanisms underlying the ability that elevated values of RDW have regarding the prognosis of many pathological conditions.

Key words: Osmotic fragility, multivariate analysis, canonical correlation, path analysis

## 2.2. INTRODUCTION

Human erythrocytes undergo biophysical and biochemical changes during their life cycle in the blood. As they age, erythrocytes become smaller and spherical (Girasole et al., 2010; Huang et al., 2011; Waugh et al., 1992). Such modifications favor erythrocyte lysis associated with the macrophages activity or mechanical stress (Ganzoni et al., 1971; R. C. Griggs, Weisman, & Harris, 1960).

The properties of the red blood cells (RBC) can be affected in several conditions, such as iron deficiency anemia and the anemia by deficiency of folate and/or cobalamin. In the iron deficiency anemia, erythrocytes are osmotically more stable when analyzed *in vitro* because they are smaller, but with normal shapes (Macedougall, 1968; Yip et al., 1983). This means that the most stable erythrocytes are not necessarily more numerous and vice versa (Sanghani & Haldankar, 2006). Moreover, a greater stability does not necessarily mean an advantage. More stable erythrocytes can be less functional, as those which an excessively high content of cholesterol in their membranes (R. A. Cooper, E. C. Arner, J. S. Wiley, & S. J. Shattil, 1975; S. W. Hui, Stewart, Carpenter, & Stewart, 1980; Meurs et al., 2005; Mouritsen OG, 2004).

Because erythrocytes are devoid of nucleus and organelles, these cells are commonly used in the study of membrane stability. Furthermore, the lysis of these cells can be easily detected, using absorbance reading of the hemoglobin released into the medium by disruption of the erythrocyte membrane (Bakaltcheva et al., 1996; Cunha et al., 2007; Custodio Afonso Rocha et al., 2012; de Freitas et al., 2008; Fonseca et al., 2010; Lemos, Marquez-Bernardes, Arvelos, Paraiso, & Penha-Silva, 2011; Penha-Silva et al., 2008; Penha-Silva et al., 2007).

The apparent simplicity of the erythrocyte hides a number of factors that act in favor or against the maintenance of the stability of these cells. These factors include hematological and blood biochemical indices.

Among the hematimetric indices, the red cell distribution width (RDW) has been considered the variable that is most strongly associated with the stability of the red blood cells. This association seems to be very relevant, since increased RDW values were associated with bad health prognosis in many pathological conditions (Cavusoglu et al., 2010; Malandrino, Wu, Taveira, Whitlatch, & Smith, 2011, 2012; Perlstein et al., 2009). The link between the stability of erythrocytes

and RDW seems to be the membrane cholesterol content, which in turn reflects the level of cholesterol in plasma, since the erythrocyte can obtain cholesterol directly from its interaction with LDL (Cooper, 1974; Lange & Slayton, 1982; Meurs et al., 2005). The amount of cholesterol transferred to the erythrocyte depends on the levels of LDL cholesterol. The transfer of cholesterol for the erythrocyte membrane makes it more rigid (Chabanel et al., 1983; S. W. Hui et al., 1980), which would be the reason for the change of some of its properties, such as RDW.

Although it is well known the existing connection between high cholesterol levels and the etiology and prognosis of the cerebrocardiovascular diseases, it is unlikely that the formation of the atherosclerotic plaques is the only mechanism involved. Indeed, elevated levels of cholesterol in the erythrocyte membrane were associated with elevated values of the hematimetric index RDW (Tziakas et al., 2008) and a poor prognosis in cardiovascular disease (Tziakas et al., 2012; Tziakas, Chalikias, Stakos, & Boudoulas, 2010; Tziakas et al., 2011). This means that changes in membrane composition and properties of the erythrocyte are important factors in the prognosis of this disease.

Since an important property of the erythrocyte that is affected by blood cholesterol levels is the membrane stability, it would be interesting to investigate the origin of the associations between blood levels of cholesterol, membrane stability and hematimetric indices, specially the RDW, using more advanced statistical methods, such as Path Analysis, which it is a kind of Structural Equation Modelling. There are many and well established parameters of erythrocyte stability (Chasis et al., 1988; Cunha et al., 2007; de Arvelos et al., 2013; de Freitas et al., 2008; Lemos et al., 2011; Penha-Silva et al., 2007) that can shed more light over this question.

### **2.3. MATERIAL AND METHODS**

### **2.3.1. Ethics Committee approval**

All work was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). This study was previously approved by the Ethics Committee in Research with Humans of the Federal University of Uberlândia.

### **2.3.2. Collection and analysis of blood samples**

Blood samples were collected by venipuncture from 48 male subjects (47.6 ± 14 years), after fasting for 8 to 12 h, in evacuated tubes containing 1.8 g/dL K<sub>3</sub>EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brazil) as anticoagulant, for determination of hemogram and evaluation of the stability of the erythrocyte membrane, and in tubes without anticoagulant, for determination of the biochemical indices.

The hematological parameters evaluated were: RBC (erythrocyte count), Hb (total hemoglobin), Ht (total erythrocyte volume), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), MCV (Mean Corpuscular Volume), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), and RDW (Red cell Distribution Width). The biochemical indices analyzed were: t-C (total cholesterol), TGC (total triglycerides), LDL-C (Low Density Lipoprotein Cholesterol), VLDL-C (Very Low Lipoprotein Cholesterol), HDL-C (High Density Lipoprotein Cholesterol), and Glu (glucose).

The tubes were kept in refrigerator at temperatures between 0 and 4 °C for no more than 24 h before the assays.

### **2.3.3. Reagents and equipments**

All reagents used had high purity and their concentrations were appropriately corrected for the preparation of solutions.

The mass measurements were performed in a precision digital balance (Shimadzu™, model AW220). Incubations at 37 °C were performed in thermostated water bath (Marconi™, model MA 184, Piracicaba, SP, Brazil). The centrifugation process was carried out in a refrigerated centrifuge (Hitachi Koki™

model CF15RXII, Hitachinaka, Japan) and absorbance readings were made in a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu™, model UV1650TC, Japan) under control by the software UV Probe 2.21.

Hemogram was performed with the use of an automated system (Sysmex™ K4500, Sysmex Corporation, Mundelein, IL, USA). The determinations of biochemical indices were made in an automatic analyzer (Hitachi™ 917, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

#### **2.3.4. Evaluation of the osmotic stability of erythrocytes**

Analyses were performed in duplicate, using 24 microtubes (Eppendorf™), containing 2 mL of NaCl at concentrations between 0 and 1.5 g/dL. The microtubes were preincubated at 37 °C for 15 min. After addition of 20 µL of whole blood, the tubes were closed, gently mixed, and incubated for 30 min at 37 °C. After centrifugation for 10 min at 1600 x g, the supernatants were carefully removed using an automatic pipette and subjected to absorbance reading at 540 nm.

The relations between the values of absorbance at 540 nm ( $A_{540}$ ) and the NaCl concentrations (X) were adjusted to sigmoidal regression lines according to the Boltzmann equation:

$$A_{540} = \frac{A_{\min} - A_{\max}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\max} \quad (1.1)$$

in which  $A_{\min}$  and  $A_{\max}$  represent the average values of  $A_{540}$  at the minimum and maximum plateaus of the sigmoid,  $H_{50}$  is the salt concentration capable of promoting 50% hemolysis and  $dX$  is the change in salt concentration responsible for the complete transition of hemolysis (Penha-Silva et al., 2007).

#### **2.3.5. Statistical analyses**

Bivariate analyses were done using Origin 9.0 (Microcal, Northampton, MA), whereas path analyses were performed using AMOS (IBM Corp., Armonk, NY) version 21 (path analysis).

## 2.4. RESULTS

**Figure 2.1** represents a typical curve of osmotic fragility of a study volunteer. Each point on this curve represents the independent behavior of an aliquot of blood at a given salt concentration. The hypotonic lysis of erythrocytes occurs with decreasing salt concentration from an isotonic salt concentration with blood (0.9 g/dL). That is because the parameter  $H_{50}$  has a direct relation with the osmotic fragility, but an inverse relation with the osmotic stability of erythrocytes. The same data set can also be represented in the way shown in **Figure 2.2**, using the inverse values of salt concentration. This curve, with the mid-point transition given by the inverse of  $H_{50}$  ( $1/H_{50}$ ), represents more properly the osmotic stability of erythrocytes.

### 2.4.1. Correlations

The most important and statistically significant bivariate correlations observed between the stability parameters  $dX$  and  $1/H_{50}$ , here considered as dependent variables, and the hematimetric and blood biochemical indices, are shown in **Table 2.1**. The stability parameter  $1/H_{50}$  presented a significant positive correlation with the blood levels of HDL-C and a significant negative correlation with the blood levels of TGC. The opposite signs observed in these correlations certainly reflect the fact that HDL and TGC are inversely related with each other.

While  $1/H_{50}$  showed significant correlations with biochemical variables, the parameter  $dX$ , by its turn, presented significant correlations with hematological indices. There have been positive correlations with RBC and RDW, but negative correlations with MCH and MCV. The opposite signs observed in these correlations make sense in the light of the fact that both MCH and MCV were negatively correlated with RBC and RDW. The sign of those correlations also is coherent with the fact that RBC correlated positively with RDW. Furthermore, RBC correlated positively with both Hb and Ht.

Stepwise multiple regressions involving  $dX$  as a dependent variable were performed using as predictor variables the hematological indices that correlated with this stability parameter (**Table 2.1**). The results were unexpected. Just one model, composed only by RDW was generated. Besides having a significance of

0.01, this model had a standardized R squared of just 0.185. The beta coefficient of RDW was 0.449, with a significance of 0.01.

#### **2.4.2. Path analysis**

The bivariate correlations presented in [Table 2.1](#) were used as a base to create theoretical models that were tested using path analysis. The best model found is presented as a path diagram in [Figure 2.3](#).

A path diagram has several peculiarities that differentiate it from a multiple linear regression. One is the classification of variables, which in addition to dependent and independent, can also be classified as endogenous and exogenous. An endogenous variable is one that receives effect from one or more variables, whether or not these variables exert effect on some other variable. An exogenous variable is one that has an effect on other variables, without receiving effect of any other. In the proposed model, only RBC was an exogenous variable. The other variables, MCV, RDW and dX, were endogenous variables.

The variables represented in a path diagram can also be classified as observed or unobserved. Observed variables, represented as rectangles, include RBC, MCV, RDW and dX. These variables are connected by means of arrows, which are estimates derived from multiple regression coefficient. The unobserved variables, shown as circles, are errors associated with each of the endogenous variables.

Another important feature of a path diagram is the insertion of the R squared value in the upper right corner of the rectangle in which the endogenous variables are represented.

The proposed model contains dX and all hematimetric indices that presented significant bivariate correlation with this stability parameter, except MCH. This index was excluded with basis in the elevated collinearity that it presents with MCV. Furthermore, MCV are better correlated with other parameters of the model, as RDW.

In the path analysis, there is a large amount and variety of indicators to evaluate the model fitting. This study used only the most cited indicators and those considered most important ([Hua & Bentlerb, 1999](#)). The model fitting values are

shown in [Table 2.2](#). As seen in this table, all the main indicators of model fitting were satisfied. Furthermore, all total, direct and indirect effects of the path diagram were significant.

## 2.5. DISCUSSION

### 2.5.1. Statistical tools and sample size

Multiple linear regression is a very important statistical method, but has many limitations. The most severe is the impossibility to include more than one dependent variable. This restriction can be surpassed by canonical correlation, since this statistical tool allows set a group of dependent variables. Another important limitation of multiple regression is the difficulty to discover the inter-relations among predictors (independent variables), since it would require successive multiple regression analyses. Fortunately, the limitations of multiple linear regression can be overcome by path analysis, a statistical tool that allows discover correlations that could do not be demonstrated by multiple regression, since the multiple regression do not include the effect among predictors.

In this study, a multiple correlation analysis involving dX and the hematimetric indices that presented significant bivariate correlations with it ([Table 2.1](#)) revealed that RDW was the only significant predictor among the hematimetric indices. This information is correct, but not very useful, since it had already been provided by bivariate correlations.

In the path diagram of the proposed theoretical model ([Figure 2.3](#)), only RDW presented direct effect on dX. The other parameters have an effect on dX, as already verified by the bivariate analyses, but these effects are indirect.

As multiple regression does not consider the correlations between the predictors, this explains why the theoretical model generated by stepwise multiple regression was composed only by RDW. Thus, the path analysis done here, instead of contradict the results found by multiple regression, was a complement for them.

Probably, there is a more complex network of effects among the variables evaluated in our study. However, the proposed model used only variables that showed significant correlations with dX. Small populations do not permitted the

inclusion of a very large amount of variables. It is recommended to have at least five measures for each variable (Hua & Bentlerb, 1999). According to this rule, the size of the population considered in this study would allow the inclusion of no more than nine variables, and our model has seven of them, of which four are observed and three are unobserved variables.

The study population consists of people of the same gender (male) and without health problem. These features make the sample more homogeneous and help minimize the fact that it can be considered small to support the statistical analyses that have been made.

### **2.5.2. Stability source**

The stability parameter  $1/H_{50}$  presented significant correlations just with HDL-C and TGC, which are extrinsic variables, which means that the stability (or at least the source of stability) represented by  $1/H_{50}$  may be considered extrinsic.

By the other hand, dX presented correlation just with hematimetric indices. Thus, the stability indicated by dX can be considered intrinsic. The classification of stability as intrinsic and extrinsic was previously applied to proteins ([Fields, Wahlstrand, & Somero, 2001](#)).

### **2.5.3. RDW and dX**

According both multiple linear regression and also path analysis, dX and RDW are significantly and directly correlated. It is not surprising at all, since dX and RDW are very similar conceptually, since both of them are related to erythrocyte diversity.

The diversity indicated by RDW came from volume variation among erythrocytes, whereas that one expressed by dX is broader, because it includes differences in shape, size and hemoglobin content.

Since dX and RDW are positively correlated, it means that an elevation in the erythrocyte heterogeneity, at least until a certain point, can increase erythrocyte stability. It is certainly related to MCH and MCV, because both dX and RDW, as well RBC, are negatively correlated with them.

#### 2.5.4. RDW and erythrocyte aging

During cell aging, erythrocyte loss hemoglobin and membrane, and become smaller and more dense. Furthermore, these cells change the shape from biconcave to spherical. Such modifications occur during the erythrocyte lifespan, and will be greater if its lifespan increases, which would reflect in a decrease of both MCH and MCV.

If the erythrocyte lifespan increases and the production of new erythrocytes remains the same, the net result will be an increase in RBC. It would also happen if the removal of old erythrocyte decreases. In both cases, it means that erythrocytes become more stable, according to dX values. This is consistent with the positive correlation of dX with RBC, but negative with MCH and MCV.

As a result of natural erythrocyte aging will have an increase of small erythrocytes, and it will increase the volume differences among erythrocytes, resulting in an increase in RDW. Since RDW also is positively correlated with dX, this reinforces the hypothesis that the correlations involving dX are largely caused by erythrocyte aging.

If an erythrocyte gets older, it means that it is stable *in vivo*, since unstable erythrocytes have a short lifespan. Thus, the aging of the erythrocytes explains the simultaneous increase in RBC, decrease in both MCH and MCV, and also the increase in stability, as indicated by the positive correlation of dX with RBC and RDW.

Since the study population consists of healthy individuals, they are supposed to present a significant amount of old erythrocytes in the blood. Because these erythrocytes are spherical instead of biconcave, they will not be so resistant to hypotonicity as the younger ones *in vitro* (P. A. Marks & A. B. Johnson, 1958). According to **Figure 2.4**, it would result in a shift in dX to the right. This shift must increase with an increase in the RBC count, which explains the positive correlation between RBC and dX.

It is also possible that the increase in dX is being caused by a left shift **Figure 2.4**, in direction to more stable erythrocytes. The *in vitro* lysis of old erythrocytes releases large amounts of hemoglobin and other cellular elements.

This hemolysate acts against hypotonicity, protecting unlysed erythrocytes, with base in an osmoprotective mechanism, which shift the osmotic fragility curve to the left. This osmoprotective effect of hemoglobin must compete with the deleterious effects of free radical formation by the free hemoglobin itself and certainly wins this competition in the fixed time conditions (30 min) used in this study (data not shown).

The aging of the red blood cells does not seem to occur due to a genetic programming, since these cells do not have nucleus. This aging shall be due to general wear and tear, but would be enhanced by factors that, somehow, may be related to the manifestation of diseases for which it has been found high values of RDW ([Cavusoglu et al., 2010](#); [Malandrino et al., 2012](#); [Patel et al., 2010](#); [Perlstein et al., 2009](#)). Thus, the relation between many diseases and high RDW values may be related to an increased population of the old red blood cells.

#### **2.5.5. Limitations**

This study presented some apparent limitations. One of them is the lack of parameters that may be responsible for increased values of RDW, such as the plasmatic levels of iron, folate and vitamin B12. Apparently, the lack of such information has not interfered in this study, since the blood samples were taken from normal individuals. Furthermore, the results here reported are not consistent with a clinical picture of anemia.

Furthermore, in anemia, the increase in RDW it is associated to a decrease in RBC. In our study, however, it was observed a positive correlation between RBC and RDW. Thus, the lack of information about levels of iron, folate and vitamin B12 does not seem to be compromising this study.

Another supposed limitation is that erythrocyte was not fractioned according to density and volume. However, there are several studies where erythrocytes were fractioned, including with use of osmotic fragility in some of them ([Condon et al., 2003](#); [P. A. Marks & A. B. Johnson, 1958](#)).

## 2.6. CONCLUSIONS

The parameters  $1/H_{50}$  and  $dX$  were shown to be very useful to explain osmotic erythrocyte stability under hypotonic conditions. The parameter  $1/H_{50}$  is under influence of the lipids levels, precisely TGC e HDL-C. By the other hand,  $dX$  is affected mainly by variations in the population of erythrocytes, since this parameter is closely correlated with RDW.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported with funds from FAPEMIG (CDS-APQ-02025-10 and PPM-00485-12), CAPES (PE-PNPD AUX 2718/2011) and CNPq (307705/2012-9).

## 2.7. REFERENCES

1. Y. X. Huang, Z. J. Wu, J. Mehrishi, B. T. Huang, X. Y. Chen, X. J. Zheng, W. J. Liu, and M. Luo, "Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties," *J Cell Mol Med*, vol. 15, no. 12, pp. 2634-42, 2011.
2. M. Girasole, G. Pompeo, A. Cricenti, G. Longo, G. Boumis, A. Bellelli, and S. Amiconi, "The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 6, pp. 760-8, 2010.
3. R. E. Waugh, M. Narla, C. W. Jackson, T. J. Mueller, T. Suzuki, and G. L. Dale, "Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age," *Blood*, vol. 79, no. 5, pp. 1351-8, 1992.
4. A. M. Ganzoni, R. Oakes, and R. S. Hillman, "Red cell aging in vivo," *J Clin Invest*, vol. 50, no. 7, pp. 1373-8, 1971.
5. R. C. Griggs, R. Weisman, Jr., and J. W. Harris, "Alterations in osmotic and mechanical fragility related to in vivo erythrocyte aging and splenic sequestration in hereditary spherocytosis," *J Clin Invest*, vol. 39, pp. 89-101, 1960.

6. R. Yip, N. Mohandas, M. R. Clark, S. Jain, S. B. Shoheit, and P. R. Dallman, "Red cell membrane stiffness in iron deficiency," *Blood*, vol. 62, no. 1, pp. 99-106, 1983.
7. L. G. Macdougall, "Red cell metabolism in iron-deficiency anemia," *J Pediatr*, vol. 72, no. 3, pp. 303-18, 1968.
8. S. P. Sanghani, and V. A. Haldankar, "Comparative analysis of RBC membrane fatty acids, proteins and glycophorin in patients with heterozygous beta thalassemia and iron deficiency anemia," *Indian J Clin Biochem*, vol. 21, no. 2, pp. 28-33, 2006.
9. I. Meurs, M. Hoekstra, E. J. van Wanrooij, R. B. Hildebrand, J. Kuiper, F. Kuipers, M. R. Hardeman, T. J. Van Berkel, and M. Van Eck, "HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes," *Exp Hematol*, vol. 33, no. 11, pp. 1309-19, 2005.
10. Z. M. Mouritsen OG, "What's so special about cholesterol?," *Lipids*, vol. 39, pp. 1101-1113, 2004.
11. S. W. Hui, C. M. Stewart, M. P. Carpenter, and T. P. Stewart, "Effects of cholesterol on lipid organization in human erythrocyte membrane," *J Cell Biol*, vol. 85, no. 2, pp. 283-91, 1980.
12. R. A. Cooper, E. C. Arner, J. S. Wiley, and S. J. Shattil, "Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect," *J Clin Invest*, vol. 55, no. 1, pp. 115-26, 1975.
13. V. Custodio Afonso Rocha, L. Ramos de Arvelos, G. Pereira Felix, D. Nogueira Prado de Souza, M. Bernardino Neto, E. Santos Resende, and N. Penha-Silva, "Evolution of nutritional, hematologic and biochemical changes in obese women during 8 weeks after Roux-en-Y gastric bypasss," *Nutr Hosp*, vol. 27, no. 4, pp. 1134-40, 2012.
14. G. S. Lemos, L. F. Marquez-Bernardes, L. R. Arvelos, L. F. Paraiso, and N. Penha-Silva, "Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes," *Cell Biochem Biophys*, vol. 61, no. 3, pp. 531-7, 2011.
15. L. C. Fonseca, L. R. Arvelos, R. C. Netto, A. B. Lins, M. S. Garrote-Filho, and N. Penha-Silva, "Influence of the albumin concentration and

- temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate," *J Bioenerg Biomembr*, vol. 42, no. 5, pp. 413-8, 2010.
16. M. V. de Freitas, C. Netto Rde, J. C. da Costa Huss, T. M. de Souza, J. O. Costa, C. B. Firmino, and N. Penha-Silva, "Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes," *Toxicol In Vitro*, vol. 22, no. 1, pp. 219-24, 2008.
  17. N. Penha-Silva, L. R. Arvelos, C. C. Cunha, T. A. Aversi-Ferreira, L. F. Gouvea-e-Silva, M. S. Garrote-Filho, C. J. Finotti, M. Bernardino-Neto, and F. G. de Freitas Reis, "Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol," *Bioelectrochemistry*, vol. 73, no. 1, pp. 23-9, 2008.
  18. N. Penha-Silva, C. B. Firmino, F. G. de Freitas Reis, J. C. da Costa Huss, T. M. de Souza, M. V. de Freitas, and R. C. Netto, "Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes," *Mech Ageing Dev*, vol. 128, no. 7-8, pp. 444-9, 2007.
  19. C. C. Cunha, L. R. Arvelos, J. O. Costa, and N. Penha-Silva, "Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes," *J Bioenerg Biomembr*, vol. 39, no. 4, pp. 341-7, 2007.
  20. I. B. Bakaltcheva, C. O. Odeyale, and B. J. Spargo, "Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1280, no. 1, pp. 73-80, 1996.
  21. E. Cavusoglu, V. Chopra, A. Gupta, V. R. Battala, S. Poludasu, C. Eng, and J. D. Marmur, "Relation between red blood cell distribution width (RDW) and all-cause mortality at two years in an unselected population referred for coronary angiography," *Int J Cardiol*, vol. 141, no. 2, pp. 141-6, 2010.
  22. N. Malandrino, W. C. Wu, T. H. Taveira, H. B. Whitlatch, and R. J. Smith, "Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes," *Diabetologia*, vol. 55, no. 1, pp. 226-235, 2011.
  23. N. Malandrino, W. C. Wu, T. H. Taveira, H. B. Whitlatch, and R. J. Smith, "Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes," *Diabetologia*, vol. 55, no. 1, pp. 226-35, 2012.

24. T. S. Perlstein, J. Weuve, M. A. Pfeffer, and J. A. Beckman, "Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort," *Arch Intern Med*, vol. 169, no. 6, pp. 588-94, 2009.
25. R. Cooper, "Modification of red cell membrane structure by cholesterol-Rich lipid dispersion," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 55, pp. 115-196, 1974.
26. Y. Lange, and J. M. Slayton, "Interaction of cholesterol and lysophosphatidylcholine in determining red cell shape," *J Lipid Res*, vol. 23, no. 8, pp. 1121-7, 1982.
27. A. Chabanel, M. Flamm, K. L. Sung, M. M. Lee, D. Schachter, and S. Chien, "Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity," *Biophys J*, vol. 44, no. 2, pp. 171-6, 1983.
28. D. N. Tziakas, G. K. Chalikias, D. Stakos, I. K. Tentes, S. V. Chatzikiyiakou, K. Mitrousi, A. X. Kortsaris, H. Boudoulas, and J. C. Kaski, "Cholesterol composition of erythrocyte membranes and its association with clinical presentation of coronary artery disease," *Coronary Artery Disease*, vol. 19, no. 8, pp. 583-590, 2008.
29. D. N. Tziakas, G. Chalikias, A. Grapsa, T. Gioka, I. Tentes, and S. Konstantinides, "Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 51, no. 4, pp. 243-54, 2012.
30. D. N. Tziakas, G. K. Chalikias, D. Stakos, and H. Boudoulas, "The role of red blood cells in the progression and instability of atherosclerotic plaque," *Int J Cardiol*, vol. 142, no. 1, pp. 2-7, 2010.
31. D. N. Tziakas, G. K. Chalikias, D. Stakos, I. K. Tentes, D. Papazoglou, A. Thomaidi, A. Grapsa, G. Gioka, J. C. Kaski, and H. Boudoulas, "Independent and additive predictive value of total cholesterol content of erythrocyte membranes with regard to coronary artery disease clinical presentation," *International Journal of Cardiology*, vol. 150, no. 1, pp. 22-27, 2011.
32. J. A. Chasis, P. Agre, and N. Mohandas, "Decreased membrane mechanical stability and in vivo loss of surface area reflect spectrin

- deficiencies in hereditary spherocytosis," *J Clin Invest*, vol. 82, no. 2, pp. 617-23, 1988.
33. L. R. de Arvelos, V. C. Rocha, G. P. Felix, C. C. da Cunha, M. Bernardino Neto, M. da Silva Garrote Filho, C. de Fatima Pinheiro, E. S. Resende, and N. Penha-Silva, "Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol," *J Membr Biol*, vol. 246, no. 3, pp. 231-42, 2013.
  34. P. M. B. Li-tze Hua, "Cutoff criteria for fit indexes in covariance structure analysis: Conventional criteria versus new alternatives," *Structural Equation Modeling*, vol. 6, no. 1, pp. 1-55, 1999.
  35. P. A. Fields, B. D. Wahlstrand, and G. N. Somero, "Intrinsic versus extrinsic stabilization of enzymes: the interaction of solutes and temperature on A4-lactate dehydrogenase orthologs from warm-adapted and cold-adapted marine fishes," *Eur J Biochem*, vol. 268, no. 16, pp. 4497-505, 2001.
  36. P. A. Marks, and A. B. Johnson, "Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes," *J Clin Invest*, vol. 37, no. 11, pp. 1542-8, 1958.
  37. K. V. Patel, R. D. Semba, L. Ferrucci, A. B. Newman, L. P. Fried, R. B. Wallace, S. Bandinelli, C. S. Phillips, B. Yu, S. Connelly, M. G. Shlipak, P. H. Chaves, L. J. Launer, W. B. Ershler, T. B. Harris, D. L. Longo, and J. M. Guralnik, "Red cell distribution width and mortality in older adults: a meta-analysis," *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, vol. 65, no. 3, pp. 258-65, 2010.
  38. M. R. Condon, J. E. Kim, E. A. Deitch, G. W. Machiedo, and Z. Spolarics, "Appearance of an erythrocyte population with decreased deformability and hemoglobin content following sepsis," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 284, no. 6, pp. H2177-84, 2003.

**Table 2.1.** Pearson's correlation coefficients and p-values

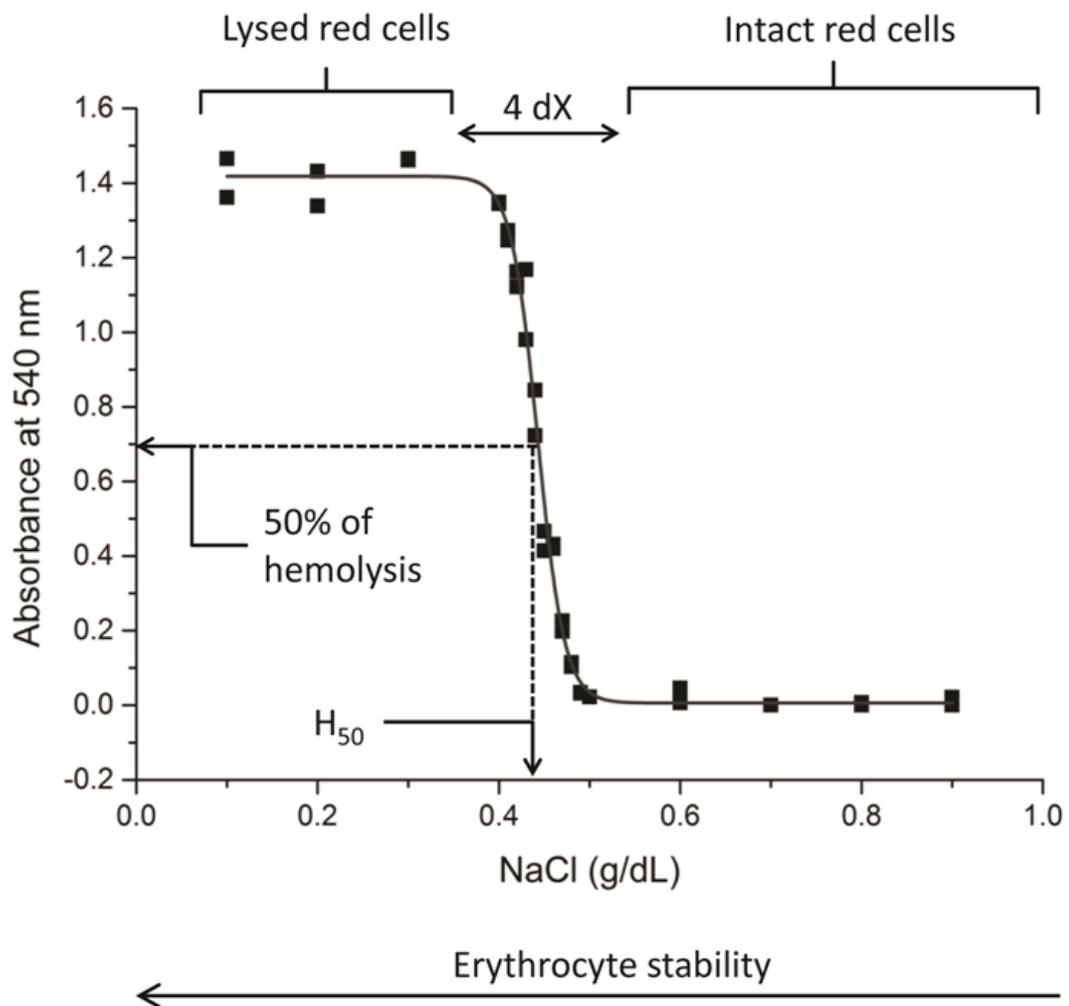
Main variable	Related variables	r	p
1/H <sub>50</sub>	HDL-C	0.333	0.021
	TGC	- 0.312	0.031
dX	RBC	0.380	0.008
	RDW	0.449	0.001
	MCH	- 0.416	0.003
	MCV	- 0.382	0.007
	RDW	0.488	< 0.001
RBC	Hb	0.582	< 0.001
	Ht	0.584	< 0.001
	MCH	- 0.718	< 0.001
	MCV	- 0.711	< 0.001
	RDW	MCH	- 0.659
RDW	MCV	- 0.642	< 0.001

dX: hemolysis range; 1/H<sub>50</sub>: half hemolysis constant; RBC (erythrocyte count); Hb (total hemoglobin); Ht (total erythrocyte volume); MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin); MCV (Mean Corpuscular Volume); MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration); RDW (Red cell Distribution Width); TGC (total triglycerides); LDL-C (Low Density Lipoprotein Cholesterol); HDL-C (High Density Lipoprotein Cholesterol).

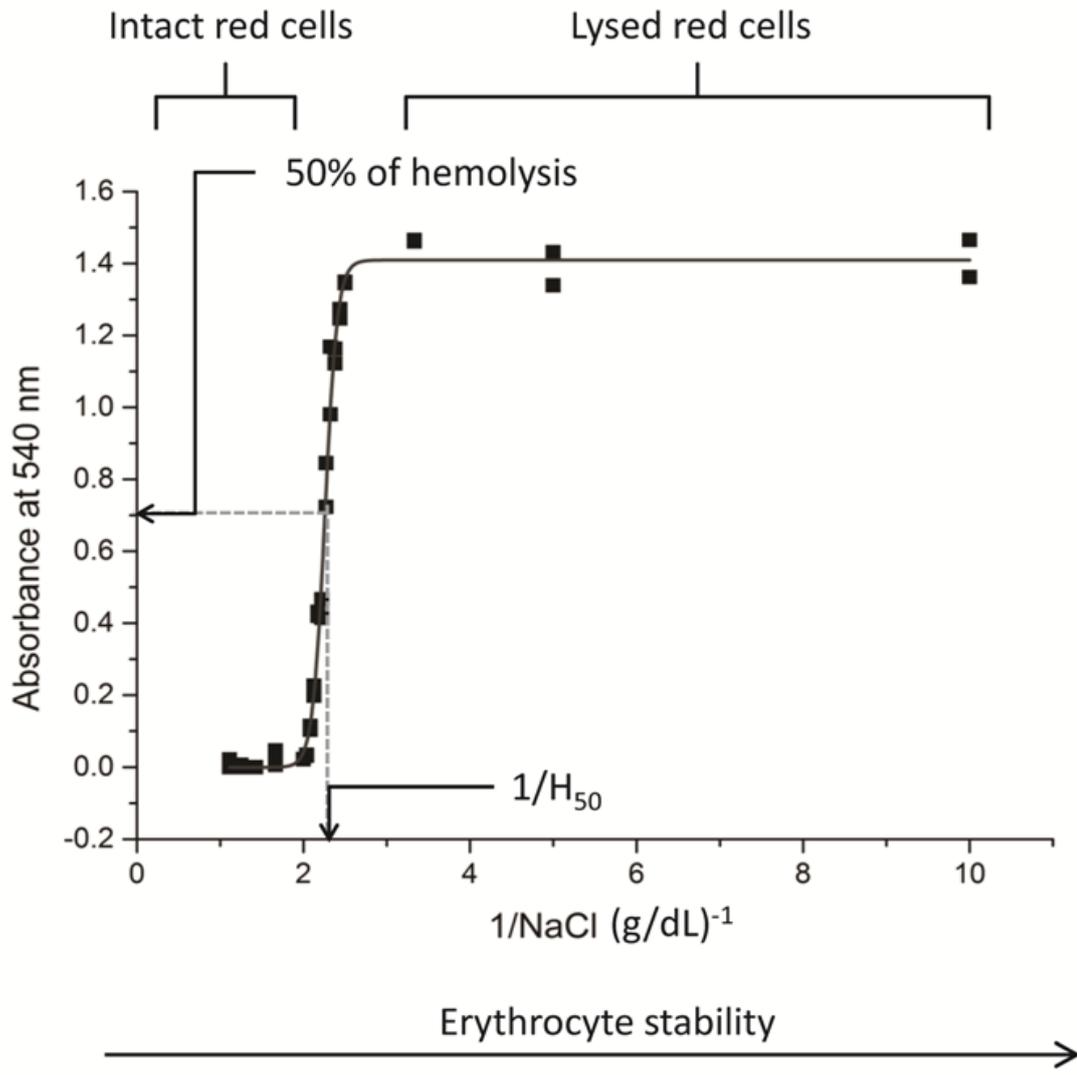
**Table 2.2.** Path fitting obtained for the path models A and B

Type of parameter	Abbreviation	Reference value	Model value
Most cited	CMIN p	> 0.05	0.529
	GFI	> 0.95	0.978
	NNFI	> 0.95	1.024
	CFI	> 0.95	1.00
	RMSEA	< 0.05	0.00
Important	CMIN/DF	< 2.0	0.738
	NFI	> 0.95	0.969
	PCLOSE	> 0.05	0.578
	SRMR	< 0.05	0.063

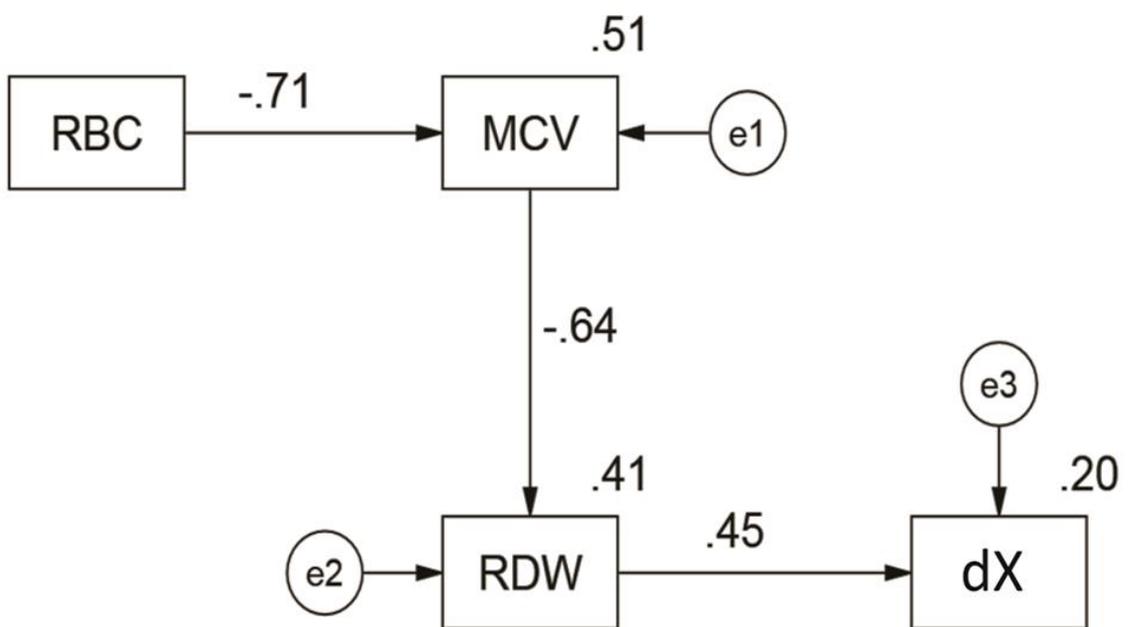
CMIN p: Chi-square p; GFI: Goodness Fit Index; NNFI: Non Normal Fit Index; CFI: Comparative Fit Index; RMSEA: Root Mean Squared Error of Approximation; NFI: Normal Fit Index; SRMR: Standardized Root Mean Residual



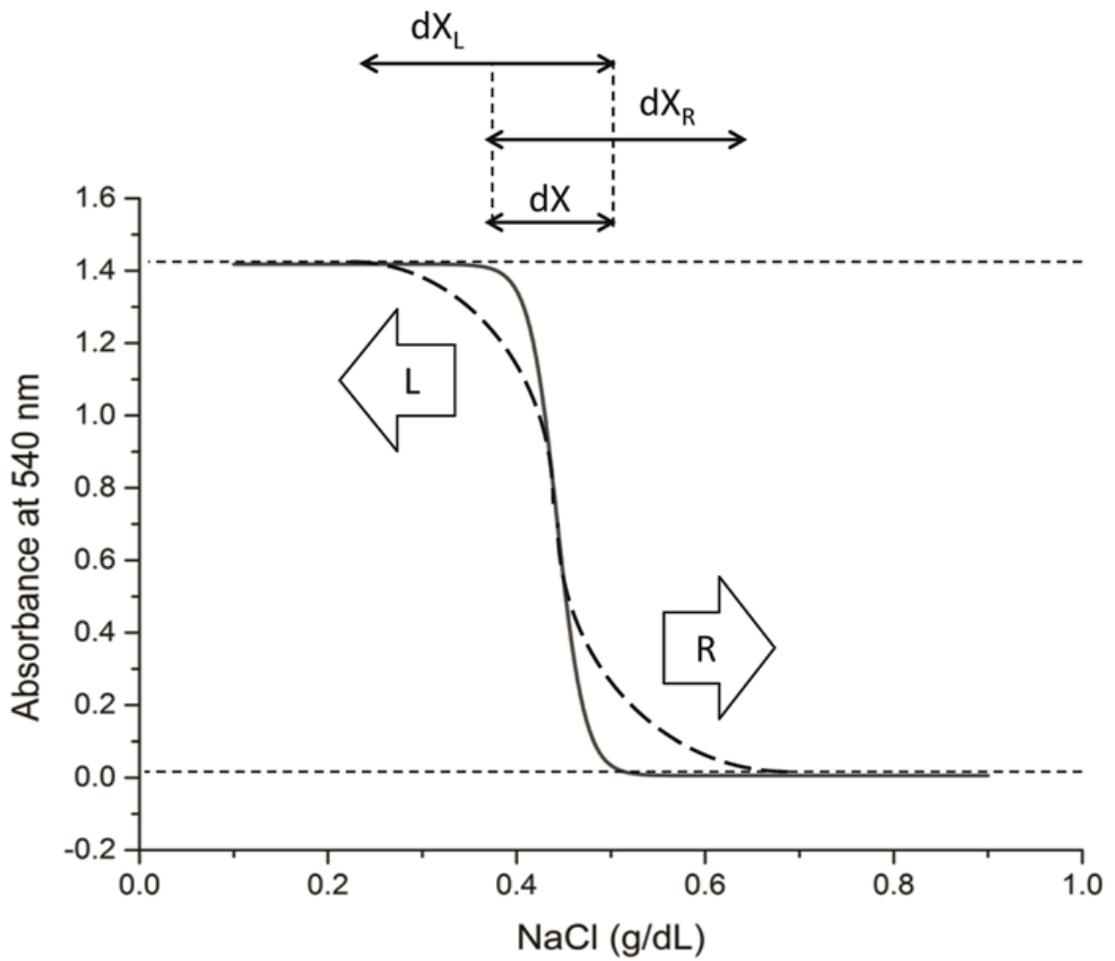
**Figure 2.1.** A typical curve of osmotic fragility of human erythrocytes, showing the meaning of the parameters dX and H<sub>50</sub>. Although dX has a direct relationship with the stability of the erythrocyte membrane, this relation is the inverse for H<sub>50</sub>.



**Figure 2.2.** A typical curve of osmotic stability of human erythrocytes, showing the meaning of the parameters  $dX$  and  $1/H_{50}$ . Both  $dX$  and  $1/H_{50}$  have a direct relationship with the osmotic stability of the erythrocyte membrane.



**Figure 2.3.** Path diagram showing significant correlations involving dX, RDW, MCV and RBC.



**Figure 2.4.** Increase in the value of  $dX$  by shift to the right (R), left (L) or both directions.

## **CAPÍTULO 3**

### **3. RELAÇÃO ENTRE ESTABILIDADE OSMÓTICA E DISTRIBUIÇÃO DE VOLUMES DE ERITRÓCITOS EM MULHERES SAUDÁVEIS DE ACORDO COM A ANÁLISE DE TRILHA**

## RESUMO

### RELAÇÃO ENTRE ESTABILIDADE OSMÓTICA E DISTRIBUIÇÃO DE VOLUMES DE ERITRÓCITOS EM MULHERES SAUDÁVEIS DE ACORDO COM A ANÁLISE DE TRILHA

Por meio de experimentos em meios hipotônicos, foram obtidos diversos parâmetros de estabilidade osmótica de eritrócitos de mulheres de diferentes idades. Esses parâmetros incluíram:  $1/H_{50}$ , que é o inverso da concentração salina em que houve 50% de hemólise;  $dX$ , que consiste no intervalo de concentração salina que se estende do início ao fim da transição de hemólise; e  $A_{min}$ , que corresponde ao valor de absorvância antes do início da hemólise hipotônica. Também foram avaliados parâmetros hematológicos e bioquímicos de cada uma das amostras de sangue analisadas. Por meio de análise de trilha constatou-se que o aumento na idade está associado a uma diminuição da estabilidade osmótica dos eritrócitos, pois a idade exerce efeito indireto negativo sobre  $dX$  e  $A_{min}$ . A menopausa, presumida a partir da idade das participantes do estudo, exerce moderação distinta sobre o efeito direto de parâmetros que atuam sobre a estabilidade osmótica em mulheres com 50 anos ou mais em relação às aquelas com idade abaixo de 50 anos. Além disso, o RDW exerce efeito direto positivo sobre  $1/H_{50}$  nas mulheres com menopausa, mas não naquelas que ainda não alcançaram essa condição fisiológica.

**PALAVRAS-CHAVE:** fragilidade osmótica, menopausa, colesterol, idade, glicose

### **3.1. ABSTRACT**

#### **RELATION BETWEEN OSMOTIC STABILITY AND DISTRIBUTION WIDTH OF ERYTHROCYTES IN HEALTHY WOMEN ACCORDING THE PATH ANALYSIS**

Through experiments in hypotonic media, various osmotic stability parameters of erythrocytes from women with different ages were obtained. These parameters included:  $1/H_{50}$ , which is the inverse of that salt concentration in which there was 50% hemolysis;  $dX$ , which is the salt concentration range that extends from the beginning to the end of the hemolysis transition; and  $A_{min}$ , which corresponds to the absorbance value before the hypotonic hemolysis. We also evaluated hematological and biochemical indices of each of the blood samples analyzed. Through path analysis it was found that an increase in the age of the individual is associated with a decrease in osmotic stability of erythrocytes, since age has negative indirect effects on  $dX$  and  $A_{min}$ . Menopause, presumed from the age of the study participants, exerts distinct moderation on the direct effect of parameters that influence osmotic stability in women aged 50 years or older compared to those under the age of 50 years. Furthermore, RDW has a positive direct effect on  $1/H_{50}$  in the menopausal women, but not in those that have not reached this physiological condition.

**KEYWORDS:** osmotic fragility, menopause, cholesterol, age, glucose

### 3.2. INTRODUÇÃO

Os eritrócitos são células sanguíneas bicôncavas cuja principal função é o transporte de oxigênio. Essas células duram em média 120 dias. Durante esse período, elas se tornam gradativamente menores, mais esféricas e com menor quantidade de hemoglobina em seu interior. Essas transformações caracterizam o que é chamado de envelhecimento do eritrócito. Esse processo não ocorre pela simples passagem do tempo, mas devido a um desgaste contínuo (Ganzoni et al., 1971; Huang et al., 2011).

Dentre os fatores responsáveis pelo envelhecimento do eritrócito, destaca-se o estresse mecânico, que é decorrente principalmente da mudança de forma que essa célula precisa sofrer para atravessar capilares menores do que o seu próprio diâmetro (Narla Mohandas et al., 1980). Isso requer que o eritrócito tenha uma membrana suficientemente fluida. Essa fluidez depende da proporção de colesterol em relação aos fosfolipídios. Um aumento dessa proporção implica em uma membrana menos fluida e, conseqüentemente, em eritrócitos menos deformáveis (Cazzola et al., 2011; Chabanel et al., 1983; Richard A. Cooper et al., 1975).

Por outro lado, os eritrócitos com membrana mais rígida são osmoticamente mais estáveis, pois são mais resistentes à expansão de volume, a qual seria decorrente da entrada de água quando expostos a um meio hipotônico. Outro fator que contribui para essa maior estabilidade osmótica é a idade dessas células, pois eritrócitos mais jovens requerem uma maior redução da concentração salina do meio externo para que sofram lise (Paul A Marks & Anne B. Johnson, 1958; Rifkind et al., 1983).

Ao longo do tempo de vida de uma pessoa os eritrócitos se tornam maiores e osmoticamente mais resistentes. Isso acontece porque essas células envelhecem mais intensamente, o que resulta em um aumento da taxa de renovação celular e, conseqüentemente, em aumento da população de eritrócitos jovens (Kosower, 1993). Além disso, também há um aumento dos níveis sanguíneos de colesterol total e de LDL-colesterol quando uma pessoa envelhece, favorecendo a aquisição de colesterol pela membrana do eritrócito (Araki & Rifkind, 1980).

Tanto a alteração do tempo de vida do eritrócito, como do conteúdo de colesterol de sua membrana, ocorrem em homens e mulheres. Entretanto, nas mulheres, há também a menstruação, que é capaz de interferir nos parâmetros hematológicos devido à perda de ferro que acompanha os sangramentos vaginais periódicos (Kameneva et al., 1998; Ruston et al., 2001).

Essa perda de ferro é responsável pela diferença do perfil hematológico entre o gênero feminino e masculino, pois faz com que as mulheres em idade reprodutiva tenham menor quantidade de eritrócitos (RBC) e de hemoglobina (Hb) do que homens de idade equivalente. Entretanto, essas diferenças tendem a desaparecer com a menopausa, que tem início por volta dos 51 anos (Ruston et al., 2001).

Um dos principais parâmetros hematológicos que se alteram pelo envelhecimento de uma pessoa, em especial pela menopausa em mulheres, é o RDW (Red Cell Distribution Width) (Lippi, Sanchis-Gomar, Danese, & Montagnana, 2013). Esse parâmetro merece destaque porque seus valores elevados estão relacionados ao agravamento de diversas condições que prejudicam a saúde, como doenças e cirurgias (de Arvelos et al., 2013; Ephrem, 2013; Hunziker et al., 2012; Lippi et al., 2014; Patel et al., 2010; Perlstein et al., 2009; Riedl et al., 2014).

A investigação das relações entre muitas variáveis simultaneamente torna necessário o uso de estatística multivariada, que é composta por diversas ferramentas, dentre as quais se destacam a regressão linear múltipla e a análise de trilha. Dentre essas duas ferramentas estatísticas, a regressão linear múltipla é a mais utilizada em estudos na área da saúde, talvez pela sua maior simplicidade. Entretanto, a análise de trilha tem sido cada vez mais empregada em pesquisas nessa área (Kuntsche et al., 2010; Qiu et al., 2007; Reyes et al., 2011).

A análise de trilha, ao contrário da regressão linear múltipla, permite obter de forma simples o efeito indireto entre duas variáveis mediado por uma ou mais variáveis, assim como o efeito moderador de uma variável sobre as correlações entre outras variáveis (Ulman, 2006). Esses efeitos são de grande importância para uma maior compreensão sobre as interações que afetam os parâmetros de estabilidade osmótica, dentre os quais se destaca a participação do RDW.

Já foram realizados vários estudos sobre estabilidade osmótica envolvendo os parâmetros  $H_{50}$  e  $dX$ . Entretanto, os primeiros estudos envolviam apenas os parâmetros fornecidos pela sigmoide de Boltzmann (Cunha et al., 2007; de Freitas et al., 2010; Fonseca et al., 2010; Lemos et al., 2011; Penha-Silva et al., 2008; Penha-Silva et al., 2007). Mais recentemente foram incluídos diversos parâmetros hematológicos e bioquímicos nesses estudos, o que exigiu o uso de uma estatística mais avançada, que permitisse a realização de análises multivariadas, como é o caso da análise de trilha. Outras análises multivariadas já realizadas também incluem a regressão linear múltipla e a correlação canônica (Bernardino Neto et al., 2013; de Arvelos et al., 2013; de Freitas et al., 2013; Mascarenhas Netto Rde et al., 2014).

Entretanto, dentre os diferentes tipos de análises multivariadas já empregadas, a análise de trilha tem se mostrado a ferramenta estatística mais útil no estudo da estabilidade osmótica de eritrócitos. Em parte, isso é devido à possibilidade de criar diagramas de trilha, que é uma forma de representar visualmente as interações entre as diversas variáveis que compõem um determinado modelo teórico. A análise de trilha também permite determinar se esse modelo teórico pode ser considerado válido ou não (Graham, 2008; Ullman, 2006).

### **3.3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.3.1. Coleta e análise das amostras de sangue**

O sangue foi coletado por venipuntura de 51 indivíduos do gênero feminino ( $48 \pm 14$  anos), após jejum de 8 a 12 horas. As amostras foram armazenadas em tubos de vácuo contendo 1 g/dL de  $K_3EDTA$  como anticoagulante (Vacutainer, Becton Dickinson, Juiz de Fora, MG, Brasil). Esses tubos foram refrigerados entre 0 a 4 °C e usados em menos de 24 h para os experimentos de fragilidade osmótica. A partir da amostra de sangue também foram obtidos hemograma, lipidograma e glicose sérica.

Esse estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Uberlândia.

### **3.3.2. Reagentes e equipamentos**

A medida de massa foi realizada em balança digital de precisão (Shimadzu, model AW220). Incubação em 37 °C foi realizada em banho termostaticado (Marconi, model MA 184, Piracicaba, SP, Brasil).

Todos os reagentes usados apresentavam grau de pureza elevado e suas concentrações foram corrigidas apropriadamente no preparo das soluções.

O processo de centrifugação foi conduzido em centrífuga refrigerada (Hitachi Koki model CF15RXII, Hitachinaka, Japan). As leituras de absorbância foram executadas em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, model UV1650TC, Japan) por meio do programa UV Probe 2.21.

O hemograma foi empreendido por meio de analisador hematológico automatizado (Sysmex K4500, Sysmex Corporation, Mundelein, IL, USA). Os parâmetros hematológicos incluem RBC (contagem de eritrócitos), Hb (hemoglobina total), Ht (hematócrito), MCH (hemoglobina corpuscular média), MCV (volume corpuscular médio), MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média) e RDW (amplitude de distribuição de hemácias).

A determinação do colesterol total (t-C), HDL-colesterol (HDL-C), LDL-colesterol (LDL-C), VLDL-colesterol (VLDL-c), triglicerídeos totais (TGC) e glicose (Glu) foi feita em analisador automatizado (Hitachi 917, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

### **3.3.3. Avaliação da estabilidade osmótica de eritrócitos**

As análises foram realizadas em duplicata usando 24 microtubos (*Eppendorf*) contendo 2 mL de solução de NaCl com concentração entre 0 e 1.5 g/dL. Os microtubos foram preincubados em 37 °C por 15 min.

Após adição de 20 µL de sangue total, os tubos foram fechados, homogeneizados e incubados por 30 min em 37 °C. Após centrifugação por 10 minutos em 1600 x g, o sobrenadante foi cuidadosamente removido usando pipeta automática e teve seu conteúdo de hemoglobina lido em 540 nm ( $A_{540}$ ).

A relação entre a absorbância e a concentração de NaCl (X) foi ajustada em uma regressão sigmoidal de acordo com a equação de Boltzmann:

$$A_{540} = \frac{A_{\min} - A_{\max}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{\max} \quad (3.1)$$

onde  $A_{\min}$  e  $A_{\max}$  representam os valores médios dos platôs mínimo e máximo da sigmoide,  $H_{50}$  é a concentração de sal capaz de promover 50% de hemólise e  $dX$  é a mudança na concentração de sal na transição da hemólise (Penha-Silva et al., 2007). Os parâmetros de estabilidade  $H_{50}$  e  $dX$  são ilustrados na **Figura 3.1**.

#### 3.3.4. Análises estatísticas

A sigmoide de Boltzmann foi calculada usando o programa Origin 9.1 (Microcal, Northampton, MA) e as análises de trilha foram conduzidas por meio do programa AMOS versão 21 (IBM Corp., Armonk, NY). Outras análises estatísticas, como a matriz de correlação, teste de normalidade, comparação de médias, dentre outros, foram realizados com o SPSS versão 21 (IBM Corp., Armonk, NY).

### 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1. Correlações envolvendo RDW

Todos os parâmetros avaliados foram correlacionados entre si e as principais correlações significantes obtidas foram listadas na **Tabela 3.1**. Dentre essas correlações, destacam-se aquelas envolvendo os parâmetros de estabilidade osmótica ( $1/H_{50}$  e  $dX$ ), assim como os parâmetros hematológicos (RDW e MCHC). A atenção dada ao RDW se deve à importância clínica desse parâmetro. MCHC, por sua vez, revelou-se um parâmetro central devido à grande quantidade de correlações apresentadas com outros parâmetros.

O parâmetro  $1/H_{50}$  apresentou correlação positiva tanto com  $dX$  como com RDW. É interessante observar que  $dX$  e RDW são parâmetros similares conceitualmente, pois ambos estão relacionados com a variabilidade entre os eritrócitos. Inclusive, tanto  $dX$  como RDW apresentaram correlação negativa com MCH, MCV e MCHC.

A correlação de mesmo sentido entre RDW e estabilidade osmótica sugere que o agravamento de doenças a que o RDW está associado estaria relacionado ao aumento da estabilidade osmótica de eritrócitos. A princípio isso seria contraditório, já que uma estrutura mais estável seria melhor do que uma menos estável. Entretanto, eritrócitos osmoticamente mais estáveis são menos deformáveis, o que os torna mais suscetíveis à lise in vivo (R. C. Griggs et al., 1960).

A variabilidade de volume indicada pelo RDW certamente está relacionada às subpopulações de eritrócitos. Isso aconteceria porque os eritrócitos diminuem de tamanho na medida em que envelhecem (Conham, 1969; Ganzoni et al., 1971; Waugh et al., 1992). Durante esse processo os eritrócitos também se tornam osmoticamente menos resistentes (P. A. Marks & A. B. Johnson, 1958; Parpart et al., 1947; Rifkind et al., 1983).

Dessa forma, uma diminuição do tempo de vida dos eritrócitos implicaria em um aumento da resistência osmótica dessas células. É interessante que os eritrócitos duram menos tempo na medida em que uma pessoa envelhece, de forma que a proporção de eritrócitos mais jovens é maior em pessoas mais velhas (Araki & Rifkind, 1980; Kosower, 1993; Shperling & Danon, 1990). Isso explicaria as correlações envolvendo RDW, idade e estabilidade osmótica.

### **3.4.2. Correlações envolvendo parâmetros de estabilidade**

A correlação positiva entre  $dX$  e  $1/H_{50}$  já era esperada, pois ambos os parâmetros variam no mesmo sentido. Além disso, tanto  $dX$  como  $1/H_{50}$  são obtidos a partir de uma mesma curva de fragilidade osmótica. Também se destaca a correlação negativa entre  $dX$  e  $A_{min}$ . Isso significa que um aumento da lise prévia que antecede a realização dos experimentos implica em menor valor de  $dX$ , que poderia ter encurtado tanto por um deslocamento para a esquerda ou direita, conforme indicado na **Figura 3.2**.

A manutenção de uma amostra de sangue fora do corpo humano resulta em uma aceleração do envelhecimento dos eritrócitos (Antonelou et al., 2010), o que afetaria tanto os eritrócitos mais velhos como os mais novos. Os eritrócitos mais velhos sofreriam lise prévia e isso implicaria em aumento de  $A_{min}$ , enquanto

que os mais jovens resistiriam menos à hipotonicidade, o que encurtaria  $dX$  em direção à direita, conforme indicado na **Figura 3.2A**. Com isso também seria esperada uma diminuição do valor de  $1/H_{50}$ , o que seria condizente com a correlação de mesmo sentido entre  $dX$  e  $1/H_{50}$ .

Também existe a possibilidade de que a redução do valor de  $dX$  em decorrência do aumento de  $A_{min}$  seja devida predominantemente à lise prévia dos eritrócitos mais velhos, enquanto que os mais jovens praticamente não seriam afetados. Assim, haveria um aumento de  $A_{min}$ , mas em contrapartida haveria na amostra um predomínio de eritrócitos mais jovens e, portanto, osmoticamente mais resistentes. Isso então promoveria uma redução de  $dX$  em direção à direita, como mostrado na **Figura 3.2B**.

Entretanto, consideramos essa possibilidade pouco provável, já que o mais esperado é que os eritrócitos jovens também sejam afetados pelo fato de estarem fora do corpo. Além disso, uma redução de  $dX$  em direção à esquerda implicaria em uma variação de  $dX$  em sentido oposto à de  $1/H_{50}$ , o que entraria em desacordo com a correlação positiva entre  $dX$  e  $1/H_{50}$ .

O parâmetro  $A_{min}$ , por sua vez, apresentou correlação positiva com o nível de glicose sérico. Sabe-se que uma elevação dos níveis de glicose resulta em um aumento de glicação da membrana do eritrócito, o que contribui para tornar essa célula osmoticamente mais frágil (Cohen et al., 2008). Assim, haveria uma aceleração do envelhecimento do eritrócito, que dessa forma duraria menos tempo. Isso de certa forma é coerente com a correlação positiva entre idade e glicose.

Outra correlação intrigante envolvendo  $A_{min}$  ocorreu entre esse parâmetro e MCHC. Essa correlação foi positiva. Constatamos que MCHC teve correlação com MCH, que foi positiva, mas não teve correlação com MCV. Dessa forma, a variação de MCHC seria devida principalmente à MCH. Portanto, os eritrócitos com maior MCHC seriam aqueles não apenas com maior concentração de hemoglobina, mas também com maior quantidade dessa molécula.

Assim, uma vez que um eritrócito com valor elevado de MCHC arrebatasse previamente, isso também resultaria em uma maior liberação de hemoglobina em relação a eritrócitos com menor MCHC, o que justificaria a correlação positiva entre MCHC e  $A_{min}$ .

### 3.4.3. Menopausa

O perfil hematológico e bioquímico de mulheres antes e depois da menopausa é diferente. Para avaliar o efeito moderador da menopausa presumida sobre as correlações dos parâmetros estudados as pacientes foram divididas em dois grupos, um formado por mulheres com até 50 anos e outro por mulheres com 51 anos ou mais.

Os valores de RDW, Glicose, tC, e LDL-C são maiores no grupo de mulheres presumidamente com menopausa, enquanto que MCHC foi menor nesse mesmo grupo. Os demais parâmetros não apresentaram diferença entre os dois grupos (**Tabela 3.2**). Resultados similares foram encontrados em trabalho sobre estabilidade osmótica em que a lise foi induzida por SDS (de Freitas et al., 2013).

As mulheres, assim como os homens, apresentam naturalmente aumento dos níveis de t-C e LDL-C devido ao aumento da idade (Sperry & Webb, 1950). Entretanto, nas mulheres esse processo é mais proeminente devido à menopausa, possivelmente devido a fatores hormonais (Pasquali et al., 1997).

### 3.4.4. Análise de trilha

A **Figura 3.3** representa um diagrama de trilha com as **relações** envolvendo Idade, MCHC,  $A_{\min}$  e dX. Esse diagrama foi elaborado a partir de um conjunto de correlações bivariadas (**Tabela 3.1**). As setas entre cada uma das variáveis indica o efeito direto entre elas. O valor sobre essas setas, denominado coeficiente de trilha, corresponde ao coeficiente beta da regressão linear múltipla. As correlações envolvidas são: Age-MCHC, MCHC- $A_{\min}$  e  $A_{\min}$ -dX.

Entretanto, montar um diagrama de trilha não significa simplesmente juntar diferentes correlações bivariadas de modo a concatenar uma sequência de efeitos diretos. É preciso que o diagrama como um todo seja plausível. Isso é feito por meio de parâmetros de *model fitting*, os quais precisam apresentar valores aceitáveis, conforme indicado na **Tabela 3.3**. Além disso, o ideal é que o diagrama não fique restrito às correlações bivariadas encontradas, pois essa

ferramenta estatística oferece a possibilidade de identificar correlações que não puderam ser medidas diretamente.

Em um diagrama de trilha os retângulos representam as variáveis observadas, que foram aquelas efetivamente mensuradas. Essas variáveis, por sua vez, podem ser endógenas ou exógenas. Uma variável é endógena quando recebe efeito de outra variável, independentemente do fato de também exercerem ou não efeito sobre outra variável. Tais variáveis incluem MCHC, Amin e dX. Já as variáveis exógenas não recebem efeito de nenhuma outra, como é o caso de Age. Há também as variáveis não observadas, que em nossos diagramas consistem no erro associado às variáveis endógenas.

Não é possível visualizar o efeito indireto em um diagrama de trilha. Entretanto, podemos usar um artifício para pelo menos se saber se esse efeito é positivo ou negativo. Esse artifício consiste em adicionar setas sobre as variáveis observadas com base em seu sentido de variação. Por exemplo, se considerarmos uma análise em que a idade aumenta, será colocada uma seta apontando para cima. Como MCHC tem correlação negativa com Age, a seta a ser adicionada ao MCHC terá sentido oposto ao de Age e, portanto, irá apontar para baixo. Já a correlação dentre Amin e MCHC é positiva, o que significa que a seta a ser incorporada a Amin também apontará para baixo. E assim por diante.

Para saber o sentido do efeito indireto entre duas variáveis basta observar se as setas sobre essas variáveis possuem sentido igual ou diferente. Se o sentido for igual isso significa que o efeito indireto entre elas é positivo, não importando se ambas apontam para cima ou para baixo. Por outro lado, se o sentido for diferente, então o efeito indireto é negativo. Essas setas originalmente não fazem parte de um diagrama de trilha e foram adicionadas para fins didáticos.

A análise de trilha referente ao diagrama mostrado na **Figura 3.3** revelou que a idade exerce efeito indireto significativo sobre  $A_{\min}$  e dX. O valor e a significância desse efeito e dos demais efeitos nesse diagrama e em outros modelos são apresentados na **Tabela 3.4**. Entretanto, esses efeitos diferiram quanto ao sentido, pois o efeito da Idade sobre  $A_{\min}$  foi negativo, enquanto que aquele sobre dX foi positivo, conforme se pode observar pelo sentido presumido de variação dos valores de cada variável com base no efeito direto entre elas.

Cada um desses efeitos indiretos é coerente com as hipóteses que elaboramos e que são em parte indicadas na **Figura 3.2**.

No diagrama de trilha da **Figura 3.3** ainda há o efeito indireto e negativo de MCHC sobre dX. Isso faz sentido, pois quanto menor a concentração de hemoglobina no interior do eritrócito, menor será a diferença osmótica desse eritrócito em relação ao meio externo em comparação com outro eritrócito com maior MCHC.

Dessa forma, se ambos os eritrócitos forem submetidos a uma solução salina parcialmente hipotônica, aquele com menor MCHC conseguirá resistir mais contra a entrada de água em seu interior. Isso resultaria em um deslocamento da curva de fragilidade osmótica à esquerda, o que aumentaria o valor de dX (**Figura 3.4**). Isso é condizente com o fato de que tais eritrócitos realmente são osmoticamente mais estáveis, apoiando a ideia de que dX é um indicador de estabilidade osmótica.

A **Figura 3.5** mostra dois modelos teóricos em que se tem o efeito moderador da idade. Um desses modelos, denominado modelo 2, é composto pelos parâmetros MCHC, RDW e  $1/H_{50}$ . Esse modelo é subdividido nos modelos 2A e 2B, conforme a idade das voluntárias.

Não foi observada diferença no coeficiente de trilha relativo ao efeito de MCHC sobre RDW entre os modelos 2A e 2B. Por outro lado, foi notável o fato de que RDW tem maior efeito direto sobre  $1/H_{50}$  em mulheres com idade igual ou superior a 51 anos (modelo 2B), mas não naquelas que ainda não alcançaram essa idade (modelo 2A). Apesar de significativa, o efeito de RDW sobre  $1/H_{50}$  em mulheres com idade inferior a 50 anos foi nulo, conforme se pode observar pelo valor do coeficiente de trilha entre esses dois parâmetros.

No modelo 3, que também é moderado pela idade (**Figura 3.5**), não foi encontrada diferença no efeito de Glicose sobre  $A_{\min}$  entre os modelos 3A e 3B, apesar da glicose ter sido maior em mulheres com 51 anos ou mais. Em contrapartida, o efeito direto de  $A_{\min}$  sobre dX foi diferente entre modelos 3A e 3B. Apesar de significativa, esse efeito foi nulo em mulheres com 51 anos ou mais (modelo 3B), e, esse mesmo efeito foi expressivo em mulheres com idade inferior a essa idade.

O fato de  $A_{\min}$  ter efeito negativo sobre dX em mulheres com até 50 anos, mas não em mulheres acima dessa idade, pode ser justificado pelo tempo de vida dos eritrócitos que diminui com o aumento da idade. Dessa forma, em mulheres mais jovens, os eritrócitos envelheceriam mais rapidamente. Isso resultaria no predomínio da subpopulação de eritrócitos velhos e ao mesmo tempo redução da subpopulação de eritrócitos jovens. Dessa forma, a população de eritrócitos se tornaria mais homogênea, o que se refletiria em menores valores de RDW.

A análise de trilha nos permitiu aproveitar melhor os dados e dessa forma ter uma compreensão muito maior a respeito do efeito da idade sobre os parâmetros que afetam direta ou indiretamente a estabilidade osmótica de eritrócitos em mulheres.

#### **3.4.5. Limitações do estudo**

A análise de trilha requer uma amostra grande, que é proporcional à complexidade do modelo a ser testado. Devido à limitação da nossa amostra, preferimos por modelos mais simples, mas que ainda assim foram reveladores.

Teria sido interessante investigar um possível efeito do tempo decorrido desde o início da menopausa sobre os parâmetros estudados. Entretanto, não havia como obter essa informação de forma confiável, pois se tratou de um estudo transversal.

Devido à grande importância do RDW, o ideal é que os níveis de folato e cobalamina tivessem sido mensurados. Entretanto, todas as participantes do estudo eram saudáveis, já que esse foi um dos critérios de elegibilidade. Portanto, é improvável que houvesse uma quantidade grande o suficiente de indivíduos com deficiência dessas vitaminas capaz de interferir nos resultados encontrados. Entretanto, essa possibilidade não pode ser descartada.

Como a menstruação implica em perda de ferro, teria sido interessante ter à disposição os níveis desse elemento, já que uma deficiência pode resultar em aumento do RDW (Aulakh, Sohi, Singh, & Kakkar, 2009). Também é possível que os níveis de ferro tivessem apresentado importantes correlações com outros parâmetros avaliados. Ficam como sugestões para futuros estudos sobre o assunto, em especial aqueles que envolvem o gênero feminino.

### 3.5. CONCLUSÃO

O parâmetro de estabilidade osmótica  $1/H_{50}$  tem correlação positiva com RDW, enquanto dX se destaca por sua correlação com  $A_{min}$ . Tanto  $1/H_{50}$  quanto dX recebem efeito indireto da idade, conforme indicado por análise de trilha. A idade exerce moderação significativa do efeito de RDW sobre  $1/H_{50}$  em mulheres com 51 anos ou mais, que presumidamente estariam no período da menopausa. A idade ainda tem ação moderadora significativa sobre o efeito de  $A_{min}$  sobre dX em mulheres com menos de 50 anos. Isso mostra que a idade afeta de forma distinta os parâmetros de estabilidade osmótica.

### 3.6. REFERÊNCIAS

- Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Stamoulis, K. E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L. H., & Papassideri, I. S. (2010). Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion*, *50*(2), 376-389. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02449.x
- Araki, K., & Rifkind, J. M. (1980). Erythrocyte membrane cholesterol. *Life Science*, *26*, 2223-2230.
- Aulakh, R., Sohi, I., Singh, T., & Kakkar, N. (2009). Red cell distribution width (RDW) in the diagnosis of iron deficiency with microcytic hypochromic anemia. *Indian J Pediatr*, *76*(3), 265-268. doi: 10.1007/s12098-009-0014-4
- Bakaltcheva, I. B., Odeyale, C. O., & Spargo, B. J. (1996). Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochim Biophys Acta*, *1280*(1), 73-80.
- Bentler, P. M., & Chou, C. P. (1987). Practical Issues in Structural Modeling. *Sociological Methods & Research*, *16*(1), 78-117. doi: 10.1177/0049124187016001004
- Bernardino Neto, M., de Avelar, E. B., Jr., Arantes, T. S., Jordao, I. A., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., . . . Penha-Silva, N. (2013). Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. *Biorheology*, *50*(5-6), 305-320. doi: 10.3233/BIR-130641
- Brites, D., Silva, R., & Brito, A. (1997). Effect of bilirubin on erythrocyte shape and haemolysis, under hypotonic, aggregating or non-aggregating conditions, and correlation with cell age. *Scand J Clin Lab Invest*, *57*(4), 337-349.
- Caporal, F. A., & Comar, S. R. (2013). Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. *Journal of Brazilian Patology and Medical Laboratory*, *49*(5), 324-331.

- Cassoly, R. (1982). Interaction of hemoglobin with the red blood cell membrane a saturation transfer electron paramagnetic resonance study. *Biochim Biophys Acta*, 689, 203-209.
- Cavusoglu, E., Chopra, V., Gupta, A., Battala, V. R., Poludasu, S., Eng, C., & Marmur, J. D. (2010). Relation between red blood cell distribution width (RDW) and all-cause mortality at two years in an unselected population referred for coronary angiography. *Int J Cardiol*, 141(2), 141-146. doi: 10.1016/j.ijcard.2008.11.187
- Cazzola, R., Rondanelli, M., Trotti, R., & Cestaro, B. (2011). Effects of weight loss on erythrocyte membrane composition and fluidity in overweight and moderately obese women. *J Nutr Biochem*, 22(4), 388-392. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.03.007
- Chabanel, A., Flamm, M., Sung, K. L., Lee, M. M., Schachter, D., & Chien, S. (1983). Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophys J*, 44(2), 171-176. doi: 10.1016/S0006-3495(83)84288-X
- Chasis, J. A., Agre, P., & Mohandas, N. (1988). Decreased membrane mechanical stability and in vivo loss of surface area reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. *J Clin Invest*, 82(2), 617-623. doi: 10.1172/JCI113640
- Cohen, R. M., Franco, R. S., Khera, P. K., Smith, E. P., Lindsell, C. J., Ciralo, P. J., . . . Joiner, C. H. (2008). Red cell life span heterogeneity in hematologically normal people is sufficient to alter HbA1c. *Blood*, 112(10), 4284-4291. doi: 10.1182/blood-2008-04-154112
- Condon, M. R., Kim, J. E., Deitch, E. A., Machiedo, G. W., & Spolarics, Z. (2003). Appearance of an erythrocyte population with decreased deformability and hemoglobin content following sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(6), H2177-2184. doi: 10.1152/ajpheart.01069.2003
- Conham, P. B. (1969). Difference in Geometry of Young and Old Human Erythrocytes Explained by a Filtering Mechanism. *Circulation Research*, 25(1), 39-45. doi: 10.1161/01.res.25.1.39
- Constantino, B. T. (2013). Red Cell Distribution Width, Revisited. *Lab Medicine*, 44(2). doi: 10.1309/LMZ1GKY9LQTVFBL7
- Cooper, R. (1974). Modification of red cell membrane structure by cholesterol-Rich lipid dispersion. *Journal of Clinical Investigation*, 55, 115-196.
- Cooper, R. A., Arner, E. C., Wiley, J. S., & Shattil, S. J. (1975). Modification of red cell membrane structure by cholesterol-Rich lipid dispersion. *Journal of Clinical Investigation*, 55, 115-196.
- Cooper, R. A., Arner, E. C., Wiley, J. S., & Shattil, S. J. (1975). Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest*, 55(1), 115-126. doi: 10.1172/JCI107901
- Courville, T., & Thompson, B. (2001). Use of Structure Coefficients in Published Multiple Regression Articles. *Educational and Psychological Measurement*, 61, 229-248. doi: 10.1177/0013164401612006
- Cunha, C. C., Arvelos, L. R., Costa, J. O., & Penha-Silva, N. (2007). Effects of glycerol on the thermal dependence of the stability of human erythrocytes. *J Bioenerg Biomembr*, 39(4), 341-347. doi: 10.1007/s10863-007-9092-z

- Custodio Afonso Rocha, V., Ramos de Arvelos, L., Pereira Felix, G., Nogueira Prado de Souza, D., Bernardino Neto, M., Santos Resende, E., & Penha-Silva, N. (2012). Evolution of nutritional, hematologic and biochemical changes in obese women during 8 weeks after Roux-en-Y gastric bypass. *Nutr Hosp*, 27(4), 1134-1140. doi: 10.3305/nh.2012.27.4.5812
- D'Alessandro, A., Blasi, B., D'Amici, G. M., Marrocco, C., & Zolla, L. (2013). Red blood cell subpopulations in freshly drawn blood: application of proteomics and metabolomics to a decades-long biological issue. *Blood Transfus*, 11(1), 75-87. doi: 10.2450/2012.0164-11
- Dawson, R. (2011). How Significant is a Boxplot Outlier? *Journal of Statistics Education*, 19(2), 1-13.
- de Arvelos, L. R., Rocha, V. C., Felix, G. P., da Cunha, C. C., Bernardino Neto, M., da Silva Garrote Filho, M., . . . Penha-Silva, N. (2013). Bivariate and multivariate analyses of the influence of blood variables of patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass on the stability of erythrocyte membrane against the chaotropic action of ethanol. *J Membr Biol*, 246(3), 231-242. doi: 10.1007/s00232-013-9524-0
- de Freitas, M. V., de Oliveira, M. R., dos Santos, D. F., de Cassia Mascarenhas Netto, R., Fenelon, S. B., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the use of statin on the stability of erythrocyte membranes in multiple sclerosis. *J Membr Biol*, 233(1-3), 127-134. doi: 10.1007/s00232-010-9232-y
- de Freitas, M. V., Marquez-Bernardes, L. F., de Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., Goncalves, E. O. A. F., Mascarenhas Netto, R. D., . . . Penha-Silva, N. (2013). Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation to sodium dodecyl sulfate. *Hematology*. doi: 10.1179/1607845413Y.0000000145
- 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. (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol In Vitro*, 22(1), 219-224. doi: 10.1016/j.tiv.2007.07.010
- Ejima, J., Ijichi, T., Ohnishi, Y., Maruyama, T., Kaji, Y., Kanaya, S., . . . Ohmura, T. (2000). Relationship of high-density lipoprotein cholesterol and red blood cell filterability: cross-sectional study of healthy subjects. *Clin Hemorheol Microcirc*, 22(1), 1-7.
- Ephrem, G. (2013). Red Blood Cell Distribution Width is a Predictor of Readmission in Cardiac Patients. *Journal of Clinical Cardiology*, 36(5), 293-299. doi: 10.1002/clc.22116c2013
- Fields, P. A., Wahlstrand, B. D., & Somero, G. N. (2001). Intrinsic versus extrinsic stabilization of enzymes: the interaction of solutes and temperature on A4-lactate dehydrogenase orthologs from warm-adapted and cold-adapted marine fishes. *Eur J Biochem*, 268(16), 4497-4505.
- Fonseca, L. C., Arvelos, L. R., Netto, R. C., Lins, A. B., Garrote-Filho, M. S., & Penha-Silva, N. (2010). Influence of the albumin concentration and temperature on the lysis of human erythrocytes by sodium dodecyl sulfate. *J Bioenerg Biomembr*, 42(5), 413-418. doi: 10.1007/s10863-010-9310-y
- Forsyth, A. M., Braunmuller, S., Wan, J., Franke, T., & Stone, H. A. (2012). The effects of membrane cholesterol and simvastatin on red blood cell

- deformability and ATP release. *Microvasc Res*, 83(3), 347-351. doi: 10.1016/j.mvr.2012.02.004
- Frank, S. M., Abazyan, B., Ono, M., Hogue, C. W., Cohen, D. B., Berkowitz, D. E., . . . Barodka, V. M. (2013). Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration. *Anesth Analg*, 116(5), 975-981. doi: 10.1213/ANE.0b013e31828843e6
- Ganzoni, A. M., Oakes, R., & Hillman, R. S. (1971). Red cell aging in vivo. *J Clin Invest*, 50(7), 1373-1378. doi: 10.1172/JCI106619
- George-Gay, B., & Parker, K. (2003). Understanding the complete blood count with differential. *J Perianesth Nurs*, 18(2), 96-114; quiz 115-117. doi: 10.1053/jpan.2003.50013
- Girasole, M., Pompeo, G., Cricenti, A., Longo, G., Boumis, G., Bellelli, A., & Amiconi, S. (2010). The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness. *Nanomedicine*, 6(6), 760-768. doi: 10.1016/j.nano.2010.06.004
- Goldstein, D. B. (1986). Effect of alcohol on cellular membranes. *Ann Emerg Med*, 15(9), 1013-1018.
- Graham, J. M. (2008). The General Linear Model as Structural Equation Modeling. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 33(485-506). doi: 10.3102/1076998607306151
- Greenwalt, T. J., Bryan, D. J., & Dumaswala, U. J. (1984). Erythrocyte membrane vesiculation and changes in membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1. *Vox Sang*, 47(4), 261-270.
- Griggs, R. C., Weisman, R., & Harris, J. W. (1959). Alteration in osmotic and mechanical fragility related to in vivo erythrocyte aging and splenic sequestration in hereditary spherocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, 39(1), 89-101.
- Griggs, R. C., Weisman, R., Jr., & Harris, J. W. (1960). Alterations in osmotic and mechanical fragility related to in vivo erythrocyte aging and splenic sequestration in hereditary spherocytosis. *J Clin Invest*, 39, 89-101. doi: 10.1172/JCI104032
- Hooper, D., Coughlan, J., & Mullen, M. R. (2008). Structural Equation Modelling: Guidelines for Determining Model Fit. *Electronic Journal of Business Research Methods*, 6(1), 53-60.
- Hua, L. t., & Bentlerb, P. M. (1999). Cutoff criteria for fit indexes in covariance structure analysis: Conventional criteria versus new alternatives. *Structural Equation Modeling*, 6(1), 1-55. doi: 10.1080/10705519909540118
- Huang, Y. X., Wu, Z. J., Mehrishi, J., Huang, B. T., Chen, X. Y., Zheng, X. J., . . . Luo, M. (2011). Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties. *J Cell Mol Med*, 15(12), 2634-2642. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01310.x
- Hui, D. Y., & Harmony, J. A. K. (1979). Interaction of plasma lipoproteins with erythrocytes  
i. Alteration of erythrocyte morphology. *Biochim Biophys Acta*, 550, 407-424.
- Hui, S. W., Stewart, C. M., Carpenter, M. P., & Stewart, T. P. (1980). Effects of cholesterol on lipid organization in human erythrocyte membrane. *J Cell Biol*, 85(2), 283-291.

- Hunziker, S., Celi, L. A., Lee, J., & Howell, M. D. (2012). Red cell distribution width improves the simplified acute physiology score for risk prediction in unselected critically ill patients. *Crit Care*, *16*(3), R89. doi: 10.1186/cc11351
- Jay, A. W., & Rowlands, S. (1975). The stages of osmotic haemolysis. *J Physiol*, *252*(3), 817-832.
- Kameneva, M. V., Garrett, K. O., Watach, M. J., & Borovetz, H. S. (1998). Red blood cell aging and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc*, *18*(1), 67-74.
- Kameneva, M. V., Watach, M. J., & Borovetz, H. S. (1999). Gender difference in rheologic properties of blood and risk of cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Microcirc*, *21*(3-4), 357-363.
- Kenny, D. A., & McCoach, B. D. (2003). Effect of the number of variables on measures of fit in structural equation modeling. *Structural Equation Modeling*, *10*, 333-351.
- Kosower, N. S. (1993). Altered properties of erythrocytes in the aged. *Am J Hematol*, *42*(3), 241-247.
- Koury, M. J., & Ponka, P. (2004). New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu Rev Nutr*, *24*, 105-131. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132306
- Kuntsche, S., Knibbe, R. A., & Gmel, G. (2010). A step beyond--the relevance of depressed mood and mastery in the interplay between the number of social roles and alcohol use. *Addict Behav*, *35*(11), 1013-1020. doi: 10.1016/j.addbeh.2010.06.020
- Lange, Y., & Slayton, J. M. (1982). Interaction of cholesterol and lysophosphatidylcholine in determining red cell shape. *J Lipid Res*, *23*(8), 1121-1127.
- Lemos, G. S., Marquez-Bernardes, L. F., Arvelos, L. R., Paraiso, L. F., & Penha-Silva, N. (2011). Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes. *Cell Biochem Biophys*, *61*(3), 531-537. doi: 10.1007/s12013-011-9235-z
- Lippi, G., Salvagno, G. L., Danese, E., Tarperi, C., Guidi, G. C., & Schena, F. (2014). Variation of red blood cell distribution width and mean platelet volume after moderate endurance exercise. *Adv Hematol*, *2014*, 192173. doi: 10.1155/2014/192173
- Lippi, G., Sanchis-Gomar, F., Danese, E., & Montagnana, M. (2013). Association of red blood cell distribution width with plasma lipids in a general population of unselected outpatients. *Kardiol Pol*, *71*(9), 931-936. doi: 10.5603/KP.2013.0228
- Macdougall, L. G. (1968). Red cell metabolism in iron-deficiency anemia. *J Pediatr*, *72*(3), 303-318.
- Malandrino, N., Wu, W. C., Taveira, T. H., Whitlatch, H. B., & Smith, R. J. (2011). Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*, *55*(1), 226-235. doi: 10.1007/s00125-011-2331-1
- Malandrino, N., Wu, W. C., Taveira, T. H., Whitlatch, H. B., & Smith, R. J. (2012). Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*, *55*(1), 226-235. doi: 10.1007/s00125-011-2331-1

- Marks, P. A., & Johnson, A. B. (1958). Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 11(37), 1542–1548.
- Marks, P. A., & Johnson, A. B. (1958). Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. *J Clin Invest*, 37(11), 1542-1548. doi: 10.1172/JC1103746
- Mascarenhas Netto Rde, C., Fabbri, C., de Freitas, M. V., Bernardino Neto, M., Garrote-Filho, M. S., Lacerda, M. V., . . . Penha-Silva, N. (2014). Influence of Plasmodium vivax malaria on the relations between the osmotic stability of human erythrocyte membrane and hematological and biochemical variables. *Parasitol Res*, 113(3), 863-874. doi: 10.1007/s00436-013-3717-4
- Massafra, C., Gioia, D., De Felice, C., Muscettola, M., Longini, M., & Buonocore, G. (2002). Gender-related differences in erythrocyte glutathione peroxidase activity in healthy subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 57(5), 663-667.
- Matyushichev, V. B., Shamratova, V. G., & Muzafarova, D. A. (1999). Qualitative difference between Male and Female Erythrocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 128(10), 978-980.
- Mela, C. F., & Kopalle, P. K. (2002). The impact of collinearity on regression analysis: the asymmetric effect of negative and positive correlations. *Applied Economics*, 34, 667-677. doi: 10.1080/0003684011005848
- Menchaca, H. J., Michalek, V. N., Rohde, T. D., O'Dea, T. J., & Buchwald, H. (1998). Decreased blood oxygen diffusion in hypercholesterolemia. *Surgery*, 124(4), 692-698. doi: 10.1067/msy.1998.90944
- Meurs, I., Hoekstra, M., van Wanrooij, E. J., Hildebrand, R. B., Kuiper, J., Kuipers, F., . . . Van Eck, M. (2005). HDL cholesterol levels are an important factor for determining the lifespan of erythrocytes. *Exp Hematol*, 33(11), 1309-1319. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.004
- Minetti, M., Agati, L., & Malorni, W. (2007). The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases. *Cardiovasc Res*, 75(1), 21-28. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.007
- Mohandas, N., Clark, M. R., Jacobs, M. S., & Shoehet, S. (1980). Analysis of Factors Regulating Erythrocytes Deformability. *Journal of Clinical Investigation*, 66, 563-573.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939-3948. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166
- Mouritsen OG, Z. M. (2004). What's so special about collesterol? *Lipids*, 39, 1101-1113.
- Musielak, M. (2009). Red blood cell-deformability measurement: review of techniques. *Clin Hemorheol Microcirc*, 42(1), 47-64. doi: 10.3233/CH-2009-1187
- Narayanan, A. (2012). A Review of Eight Software Packages for Structural Equation Modeling. *The American Statistician*, 66(2), 129-138. doi: 10.1080/00031305.2012.708641
- Nimon, K. F. (2012). Statistical assumptions of substantive analyses across the general linear model: a mini-review. *Front Psychol*, 3, 322. doi: 10.3389/fpsyg.2012.00322

- Parpart, A. K., Lorenz, P. B., Parpart, E. R., Gregg, J. R., & Chase, A. M. (1947). The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *Journal of Clinical Investigation*, 26(4), 636-640.
- Pasquali, R., Casimirri, F., Pascal, G., Tortelli, O., Morselli Labate, A., Bertazzo, D., . . . Gaddi, A. (1997). Influence of menopause on blood cholesterol levels in women: the role of body composition, fat distribution and hormonal milieu. Virgilio Menopause Health Group. *J Intern Med*, 241(3), 195-203.
- Patel, K. V., Semba, R. D., Ferrucci, L., Newman, A. B., Fried, L. P., Wallace, R. B., . . . Guralnik, J. M. (2010). Red cell distribution width and mortality in older adults: a meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 65(3), 258-265. doi: 10.1093/gerona/glp163
- Penha-Silva, N., Arvelos, L. R., Cunha, C. C., Aversi-Ferreira, T. A., Gouvea-e-Silva, L. F., Garrote-Filho, M. S., . . . de Freitas Reis, F. G. (2008). Effects of glycerol and sorbitol on the thermal dependence of the lysis of human erythrocytes by ethanol. *Bioelectrochemistry*, 73(1), 23-29. doi: 10.1016/j.bioelechem.2008.04.002
- Penha-Silva, N., Firmino, C. B., de Freitas Reis, F. G., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M., de Freitas, M. V., & Netto, R. C. (2007). Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. *Mech Ageing Dev*, 128(7-8), 444-449. doi: 10.1016/j.mad.2007.06.007
- Perlstein, T. S., Weuve, J., Pfeffer, M. A., & Beckman, J. A. (2009). Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort. *Arch Intern Med*, 169(6), 588-594. doi: 10.1001/archinternmed.2009.55
- Perrotta, S., Gallagher, P. G., & Mohandas, N. (2008). Hereditary spherocytosis. *Lancet*, 372(9647), 1411-1426. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61588-3
- Qiu, L., Leng, S., Wang, Z., Dai, Y., Zheng, Y., & Wang, Z. (2007). Path analysis of biomarkers of exposure and early biological effects among coke-oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(6), 1193-1199. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0001
- Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21-33.
- Reyes, M., Gahagan, S., Diaz, E., Blanco, E., Leiva, L., Lera, L., & Burrows, R. (2011). Relationship of adiposity and insulin resistance mediated by inflammation in a group of overweight and obese Chilean adolescents. *Nutr J*, 10, 4. doi: 10.1186/1475-2891-10-4
- Riedl, J., Posch, F., Konigsbrugge, O., Lotsch, F., Reitter, E. M., Eigenbauer, E., . . . Ay, C. (2014). Red cell distribution width and other red blood cell parameters in patients with cancer: association with risk of venous thromboembolism and mortality. *PLoS One*, 9(10), e111440. doi: 10.1371/journal.pone.0111440
- Rifkind, J. M., Araki, K., & Hadley, E. C. (1983). The Relationship between the Osmotic Fragility of Human-Erythrocytes and Cell Age. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 222(2), 582-589. doi: Doi 10.1016/0003-9861(83)90556-8
- Risso, A., Turello, M., Biffoni, F., & Antonutto, G. (2007). Red blood cell senescence and neocytolysis in humans after high altitude acclimatization. *Blood Cells Mol Dis*, 38(2), 83-92. doi: 10.1016/j.bcmed.2006.10.161

- Ruston, D. H., Dover, R., Sainsbury, A. W., Norris, M. J., & Gilkes, J. J. H. (2001). Why should women have lower reference limits for haemoglobin and ferritin concentrations than men? , 322(BMJ), 1355-1357.
- Saari, J. T., & Beck, J. S. (1975). Hypotonic hemolysis of human red blood cells: a two-phase process. *J Membr Biol*, 23(3-4), 213-226.
- Sanghani, S. P., & Haldankar, V. A. (2006). Comparative analysis of RBC membrane fatty acids, proteins and glycoporphin in patients with heterozygous beta thalassemia and iron deficiency anemia. *Indian J Clin Biochem*, 21(2), 28-33. doi: 10.1007/BF02912907
- Shalel, S., Streichman, S., & Marmur, A. (2002). Monitoring surfactant-induced hemolysis by surface tension measurement. *J Colloid Interface Sci*, 255(2), 265-269. doi: 10.1006/jcis.2002.8621
- Sherry, A. (2005). Conducting and Interpreting Canonical Correlation Analysis in Personality Research. *Journal of Personality Assessment*, 84(1), 37-48.
- Shperling, T., & Danon, D. (1990). Age population distribution of erythrocytes in young and old healthy donors. *Exp Gerontol*, 25(5), 413-422.
- Sonmez, M., Ince, H. Y., Yalcin, O., Ajdzanovic, V., Spasojevic, I., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2013). The effect of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size. *PLoS One*, 8(9), e76579. doi: 10.1371/journal.pone.0076579
- Sperry, W. M., & Webb, M. (1950). The effect of increasing age on serum cholesterol concentration. *J Biol Chem*, 187(1), 107-110.
- Tziakas, D. N., Chalikias, G., Grapsa, A., Gioka, T., Tentis, I., & Konstantinides, S. (2012). Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane. *Clin Hemorheol Microcirc*, 51(4), 243-254. doi: 10.3233/CH-2012-1530
- Tziakas, D. N., Chalikias, G. K., Stakos, D., & Boudoulas, H. (2010). The role of red blood cells in the progression and instability of atherosclerotic plaque. *Int J Cardiol*, 142(1), 2-7. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.10.031
- Tziakas, D. N., Chalikias, G. K., Stakos, D., Tentis, I. K., Chatzikyriakou, S. V., Mitrousi, K., . . . Kaski, J. C. (2008). Cholesterol composition of erythrocyte membranes and its association with clinical presentation of coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*, 19(8), 583-590. doi: Doi 10.1097/Mca.0b013e328313819b
- Tziakas, D. N., Chalikias, G. K., Stakos, D., Tentis, I. K., Papazoglou, D., Thomaidi, A., . . . Boudoulas, H. (2011). Independent and additive predictive value of total cholesterol content of erythrocyte membranes with regard to coronary artery disease clinical presentation. *International Journal of Cardiology*, 150(1), 22-27. doi: DOI 10.1016/j.ijcard.2010.02.022
- Ulman, J. B. (2006). Structural Equation Modeling: Rreviewing the Basic and Moving Forward. *Journal of Personality Assessment*, 87(1), 35-50.
- Vaya, A., Camara, R., Hernandez-Mijares, A., Romagnoli, M., Sola, E., Corella, D., & Laiz, B. (2010). Erythrocyte deformability in morbid obesity before bariatric surgery. Influence of abdominal obesity. *Clin Hemorheol Microcirc*, 46(4), 313-320. doi: 10.3233/CH-2010-1357
- Vaya, A., Simo, M., Santaolaria, M., Todoli, J., & Aznar, J. (2005). Red blood cell deformability in iron deficiency anaemia. *Clin Hemorheol Microcirc*, 33(1), 75-80.

- Warnick, R., Knopp, R. H., Fitzpatrick, V., & Branson, L. (1990). Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol by the Friedewald Equation is Adequate for Classifying Patients on the Basis of Nationally Recommended Cutpoints. *Clinical Chemistry*, 36, 15-19.
- Waugh, R. E., Narla, M., Jackson, C. W., Mueller, T. J., Suzuki, T., & Dale, G. L. (1992). Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood*, 79(5), 1351-1358.
- Wright, S. (1917). On the nature of size factors. *Genetics*, 3, 367-374.
- Yip, R., Mohandas, N., Clark, M. R., Jain, S., Shohet, S. B., & Dallman, P. R. (1983). Red cell membrane stiffness in iron deficiency. *Blood*, 62(1), 99-106.
- Zou, K. H., Tuncali, K., & Silverman, S. G. (2003). Correlation and simple linear regression. *Radiology*, 227(3), 617-622. doi: 10.1148/radiol.2273011499

**Tabela 3.1.** Significant bivariate correlations

Parameters		r	p	N
Main	Related			
1/H <sub>50</sub>	dX	0.273	0.055	50
	RDW	0.439	0.001	50
dX	A <sub>min</sub>	- 0.376	0.007	51
	MCV	- 0.325	0.020	51
	MCH	- 0.378	0.006	51
	MCHC	- 0.310	0.029	50
A <sub>min</sub>	A <sub>max</sub>	- 0.359	0.010	51
	MCHC	0.304	0.032	50
	Glu	0.335	0.018	49
Age	RDW	0.439	0.001	51
	MCHC	- 0.400	0.004	50
	Glu	0.305	0.033	49
RDW	MCV	- 0.308	0.028	51
	MCH	- 0.521	0.000	51
	MCHC	- 0.629	0.000	50
RBC	Hb	0.731	0.000	51
	Ht	0.785	0.000	51
	MCV	- 0.342	0.014	51
	MCH	- 0.421	0.002	51
MCHC	MCH	0.395	0.005	50

**Tabela 3.2.** Comparação de médias

Parameter	Age group	N	Mean	Std. Deviation	Significance
Dx	≥ 51	19	.0182	.00516	.348
	< 50	32	.0166	.00681	
1/H <sub>50</sub>	≥ 51	19	2.2610	.12550	.076
	< 50	31	2.1997	.09410	
A <sub>1</sub>	≥ 51	19	1.1857	.09418	.021*
	< 50	32	1.1008	.16047	
A <sub>2</sub>	≥ 51	19	.0138	.01624	.773
	< 50	32	.0152	.01695	
RBC	≥ 51	19	4.6663	.39427	.954
	< 50	32	4.6728	.37406	
RDW	≥ 51	19	13.7474	.80026	.024*
	< 50	32	13.2594	.50728	
Hb	≥ 51	19	13.5789	1.10884	.911
	< 50	32	13.5438	1.04540	
Ht	≥ 51	19	41.2263	3.38573	.390
	< 50	32	40.3875	3.24114	
MCV	≥ 51	19	88.5105	5.23460	.163
	< 50	32	86.5250	3.93733	
MCH	≥ 51	19	29.1842	2.00728	.754
	< 50	32	29.0188	1.41135	
MCHC	≥ 51	19	32.9421	.84282	.015*
	< 50	31	33.5129	.59259	
t-C	≥ 51	19	200.3211	24.50321	.045*
	< 50	32	184.5313	29.36369	
TGC <sup>§</sup>	≥ 51	19	117.1526	55.84907	.635
	< 50	32	109.5375	53.45326	
LDL-C	≥ 51	19	115.2989	21.95652	.110
	< 50	32	103.8988	27.38843	
VLDL-C	≥ 51	19	23.4326	11.16789	.630
	< 50	32	21.8856	10.69350	
HDL-C	≥ 51	19	61.5895	14.64676	.519
	< 50	32	58.7281	16.04098	
Glu	≥ 51	18	111.0222	47.96777	.049*
	< 50	31	86.9452	8.02940	

\* p &lt; 0.05

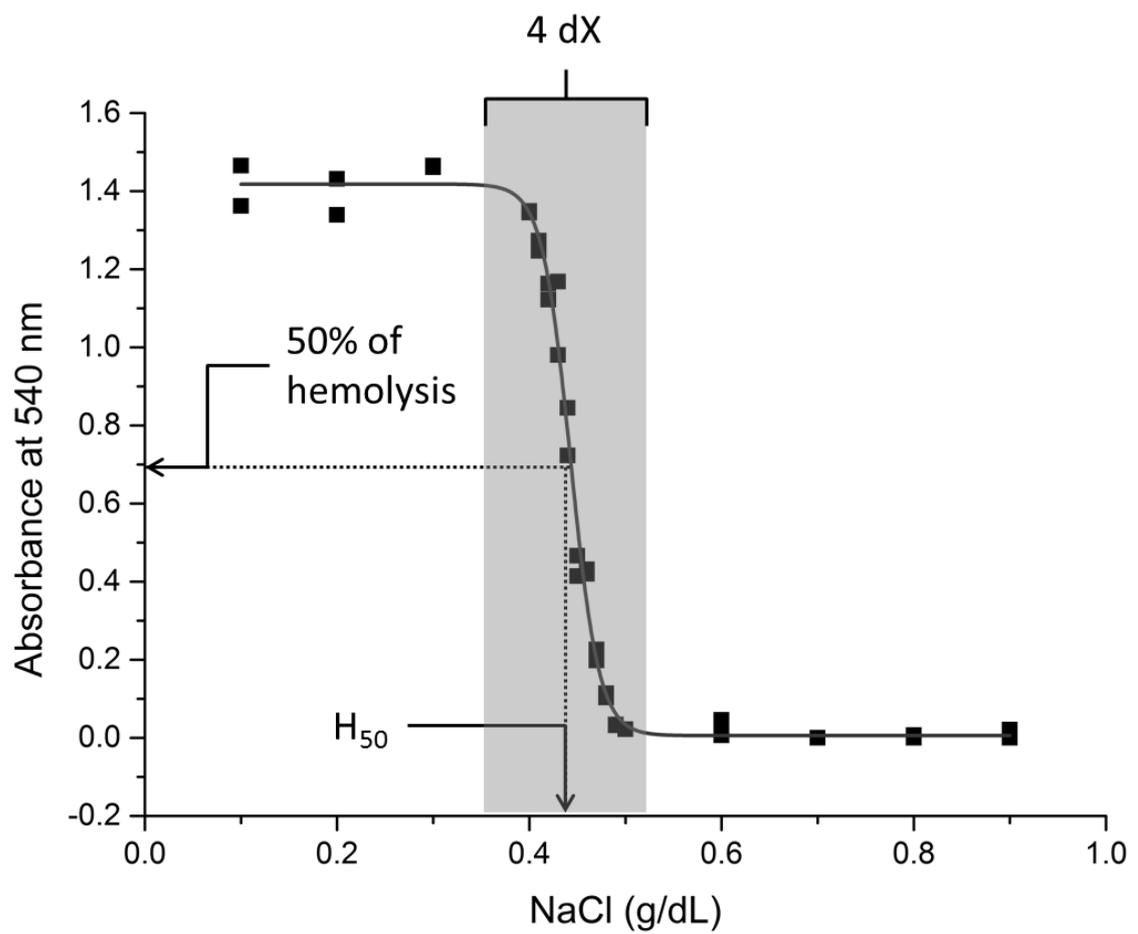
**Tabela 3.3.** Parâmetros de *model fit*

Acronym	Name	Reference	Model 1	Model 2	Model 3
CMIN p	Chi-square p	> 0.05	0.335	0.690	0.395
GFI	Goodness Fit Index	> 0.95	0.996	0.990	0.974
NNFI	Non Normal Fit Index	> 0.95	0.954	1.174	1.026
CFI	Comparative Fit Index	> 0.95	0.979	1.000	1.000
RMSEA	Root Mean Squared Error of Approx.	< 0.06	0.052	0.000	0.000

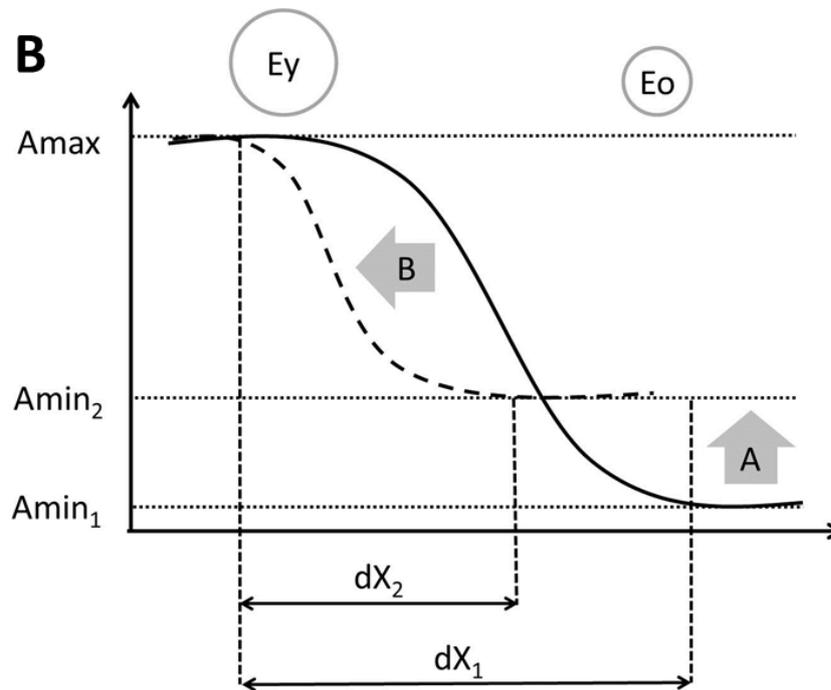
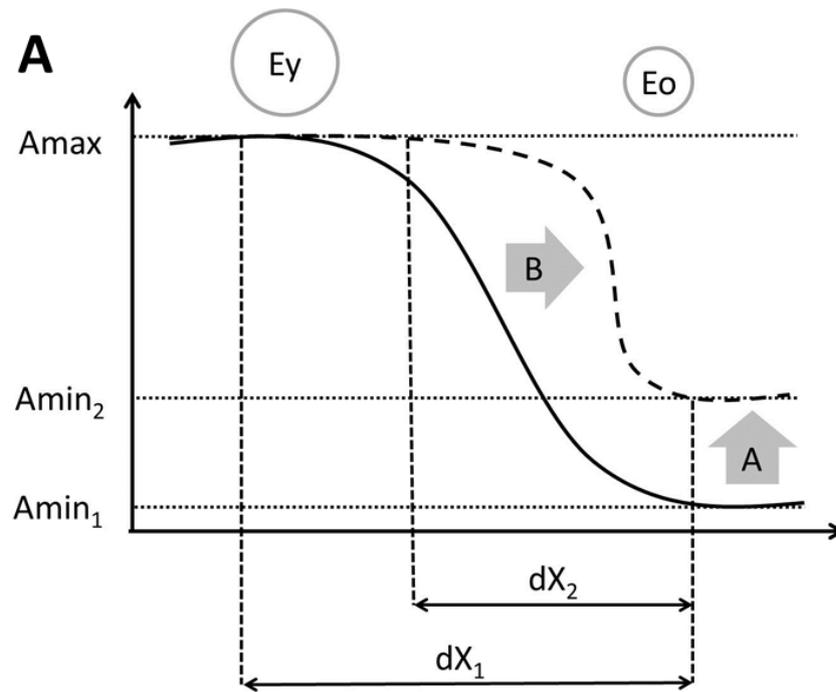
**Tabela 3.4.** Efeitos totais. Estão incluídos os efeitos diretos e indiretos

Model	IV	DV	Type	Effect	p
1	Age	MCHC	Direct	- 0.401	0.007
		A <sub>min</sub>	Indirect	- 0.122	0.010
		dX	Indirect	0.049	0.011
	MCHC	A <sub>min</sub>	Direct	0.304	0.008
		dX	Indirect	- 0.122	0.012
	A <sub>min</sub>	dX	Direct	- 0.403	0.015
2A	MCHC	RDW	Direct	- 0.449	0.021
		1/H50	Indirect	0.000	0.997
	RDW	1/H50	Direct	- 0.001	0.999
2B	MCHC	RDW	Direct	- 0.672	0.021
		1/H50	Indirect	- 0.428	0.045
	RDW	1/H50	Direct	0.637	0.029
3A	Glucose	A <sub>min</sub>	Direct	0.362	0.025
		dX	Indirect	- 0.208	0.023
	A <sub>min</sub>	dX	Direct	- 0.574	0.016
3B	Glucose	A <sub>min</sub>	Direct	0.520	0.555
		dX	Indirect	0.032	0.754
	A <sub>min</sub>	dX	Direct	0.062	0.815

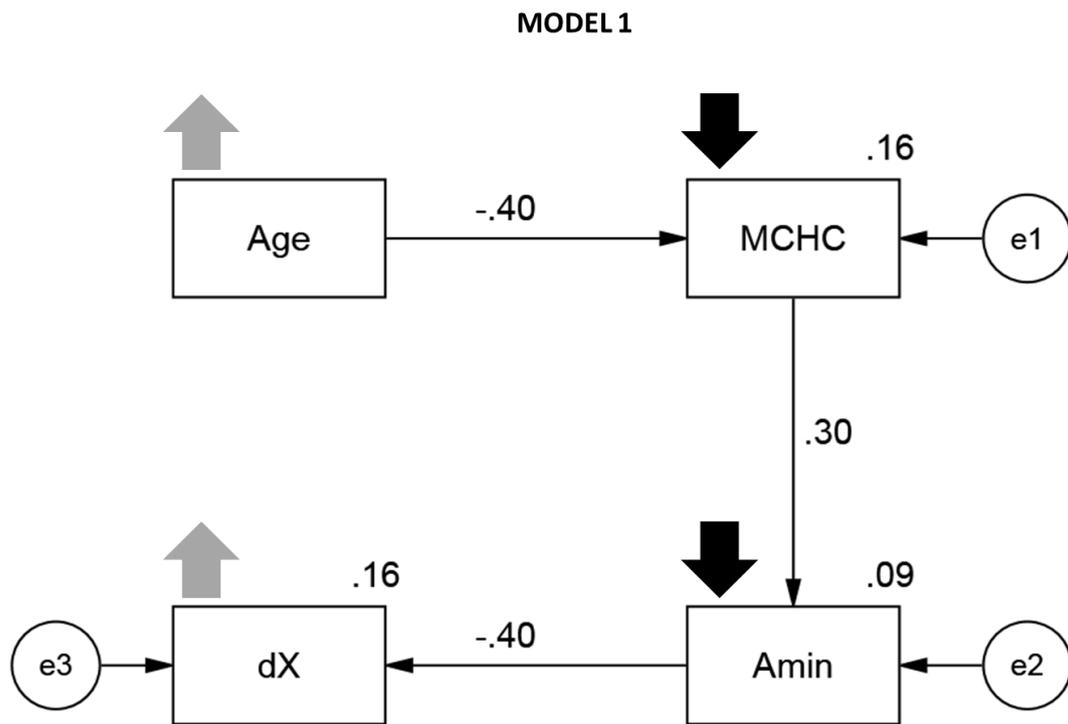
IV: Independent variable; DV: dependent variable



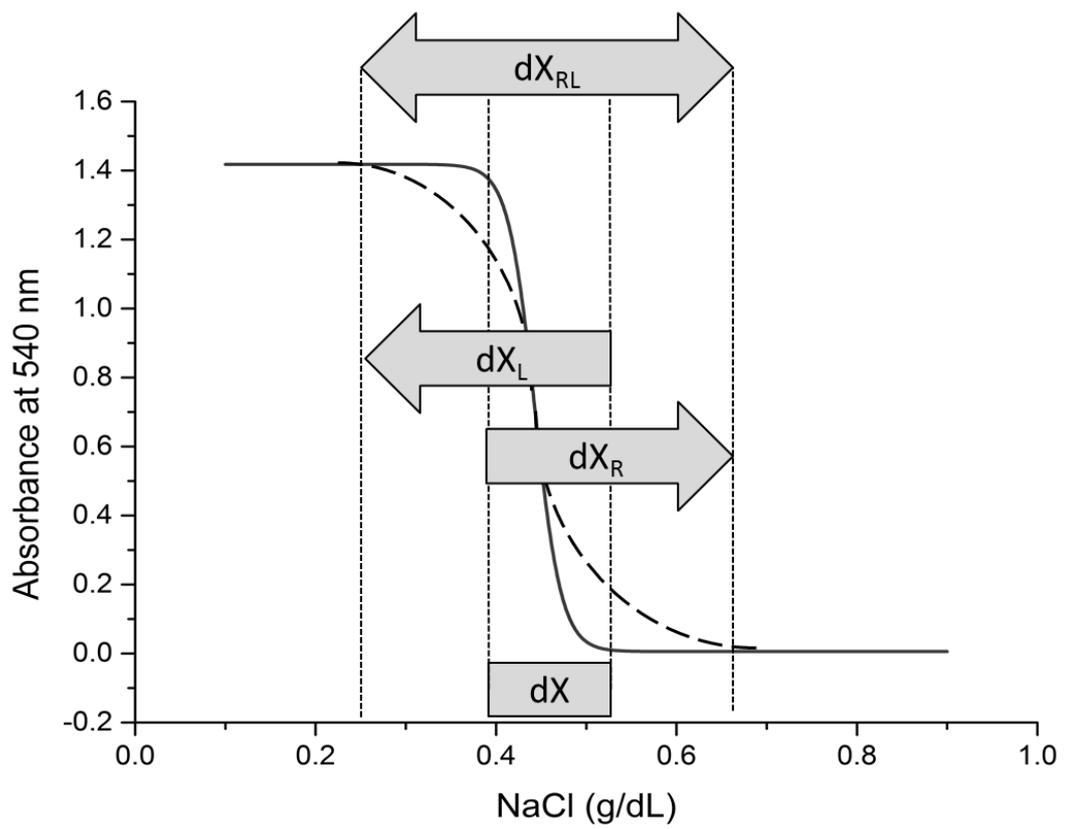
**Figura 3.1.** Obtenção dos parâmetros de estabilidade osmótica H<sub>50</sub> e dX.



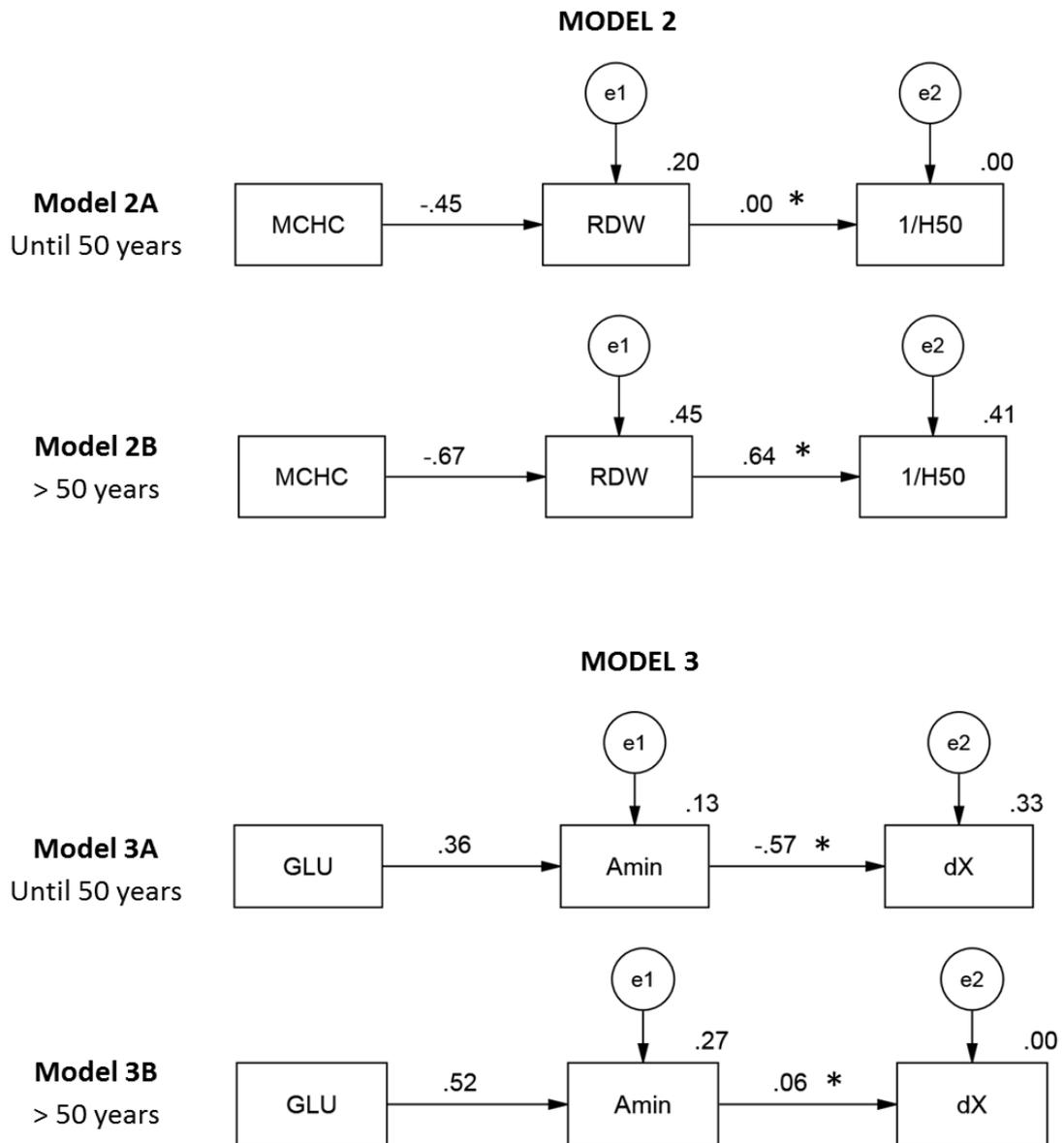
**Figura 3.2.** Hipóteses para explicar a correlação negativa entre  $dX$  e  $A_{min}$ .



**Figura 3.3.** Diagrama de trilha com Age, MCHC, Amin e dX



**Figura 3.4.** Variação de  $dX$ .



**Figura 3.5.** Efeito moderador da idade em dois modelos teóricos. \*Pares de efeito direto diferentes de acordo com o nível de moderação.

