

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM
MÉTODO AUTOMATIZADO PARA A
QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE
NITRITO/NITRATO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Etiane Tatsch

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
AUTOMATIZADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS
SÉRICOS DE NITRITO/NITRATO**

por

Etiane Tatsch

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
AUTOMATIZADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS
DE NITRITO/NITRATO**

elaborada por
Etiane Tatsch

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Rafael Noal Moresco, Dr.
(Presidente/Orientador)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)

Ricardo Brandão, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 09 março de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me conduziu e tornou este sonho realidade. Pela presença e força.

A meus pais, João Carlos e Rose, que sempre apoiaram meus sonhos e deram toda a base e força para enfrentar os desafios da vida. Amo vocês.

A minha querida irmã Francine, pelo apoio e encorajamento em todos os momentos.

Ao meu namorado Diego que tanto me apoiou, incentivou e colaborou em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael, a quem eu tenho uma imensa admiração, meus sinceros agradecimentos pelos seus ensinamentos, pela oportunidade em ser sua aluna, sua dedicação, amizade e constante incentivo durante todas as etapas.

A Prof. Dr. Ivana, pelas suas contribuições e sugestões no transcorrer do trabalho.

A Prof. Dr. Marta, pessoa amável, que sempre está disponível para ajudar, no que for preciso. Muito obrigada, de coração.

A todos meus colegas de laboratório e grandes amigos, Bruna, Carine, Helena, Guilherme, Lara, Manuela, Rafael, Renata, Silvia, Thiago, Vanessa, Zé, pelo apoio, conversas, brincadeiras, risadas, incentivo e colaboração técnico-científico para a finalização desta etapa.

A CAPES, pela bolsa de estudos.

Aos professores Dr. Roberto e Dr. Ricardo, por disporem do seu tempo para compor a banca examinadora dessa dissertação.

Aos demais amigos, pela compreensão das minhas ausências e pelo apoio mesmo que de longe.

A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos que fazem parte da minha vida, por estarem comemorando comigo mais esta realização.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO AUTOMATIZADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE NITRITO/NITRATO

AUTOR: ETIANE TATSCH

ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de março de 2012.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre reativo, agindo como uma molécula mensageira, mediando diversas funções, incluindo vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e neurotransmissão. Pelo fato deste radical possuir uma meia-vida curta, a sua determinação torna-se difícil, conseqüentemente, a mensuração de seus metabólitos nitrito/nitrato (NOx) é mais frequentemente utilizado para avaliar a produção de NO. A reação de Griess é o método mais utilizado na quantificação do NOx, devido a sua simplicidade, rapidez e custo-benefício. Devido à relevância biológica do NO, é de suma importância a sua mensuração. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico automatizado para a mensuração dos níveis séricos de NOx pelo método de Griess, utilizando o analisador Cobas Mira[®]. Este estudo propiciou o desenvolvimento de um protocolo automatizado para a quantificação dos níveis séricos de NOx, sendo este método linear ($r^2 = 0,993$, $P < 0,001$), preciso, pois apresentou um coeficiente de variação na precisão intra-ensaio de 8,7% e na precisão inter-ensaio de 5,6%. Além disso, foi observada uma recuperação de 114,6%, sendo este estudo considerado exato. Dessa forma, foi possível concluir que o método automatizado apresentado é linear, preciso, exato, simples e de baixo custo, passível a ser adaptado ao analisador Cobas Mira[®] e outros sistemas automatizados disponíveis em laboratórios clínicos de rotina.

Palavras-chave: óxido nítrico, vasodilatação, reação de Griess, método automatizado, NOx.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN AUTOMATED METHOD FOR THE MEASUREMENT OF SERUM LEVELS OF NITRITE/NITRATE

AUTHOR: ETIANE TATSCH
ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
Date and Place: Santa Maria, 09 de março de 2012.

Nitric oxide (NO) is a reactive free radical, acting as a messenger molecule, mediating several functions, including vasodilation, platelet aggregation inhibition and neurotransmission. Because this radical to have a short half-life, its determination is difficult, therefore, measurement of metabolites nitrite/nitrate (NO_x) is most often used to evaluate NO production. The Griess reaction is the most used method for NO_x quantification due to its simplicity, speed and cost-effective. Due to the biological relevance of NO, it is extremely importance to its measurement. The objective of this study was to develop and validate an analytical method for the automated measurement of serum levels of NO_x by the Griess method using the Cobas Mira clinical chemistry analyzer. This study provided the development of a protocol for the automated measurement of serum levels of NO_x, which is linear method ($r^2= 0.993$, $P < 0.001$), precise, because it showed a coefficient of variation in intra-assay precision of 8.7% and inter-assay precision of 5.6%. Moreover, we observed a recovery of 114.6% which is considered accurate study. Thus, it was concluded that the automated method presented here is linear, precise, accurate, simple and low cost, likely to be adapted to Cobas Mira analyzer and other automated systems available in clinical routine laboratory.

Keywords: nitric oxide, vasodilation, Griess reaction, automated method, NO_x.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGES: produtos finais de glicação avançada
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BH4: tetrahydrobiopterina
CG-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
cNOS: óxido nítrico sintase constitutiva
COX-2: ciclooxigenase-2
CV: coeficiente de variação
DA: doença de Alzheimer
DM tipo 1: diabetes *mellitus* tipo 1
DM tipo 2: diabetes *mellitus* tipo 2
DM: diabetes *mellitus*
DP: doença de Parkinson
DPR: desvio padrão relativo
EDRF: fator de relaxamento derivado do endotélio
EMA: *European Medicines Agency*
ERNS: espécies reativas de nitrogênio
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
EROS: espécies reativas de oxigênio
GlcNAc: N-acetilglucosamina
GMPc: guanosina monofosfato cíclica
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HNO₂: ácido nitroso
ICAM-1: molécula de adesão intercelular-1
ICH: *International Conference on Harmonization*
IL-6: interleucina-6
iNOS: óxido nítrico sintase induzida ou inflamatória
ISO: *International Organization for Standardization*
IUPAC: *International Union Of Pure and Applied Chemistry*
LIQ: limite inferior de quantificação
LPS: lipopolissacarídeo

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1
N₂O₃: óxido nitroso
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaNO₃: nitrato de sódio
NFκB: fator nuclear de transcrição Kappa B
NMDA: N-metil-D-aspartico
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO: Óxido nítrico
NO⁺: cátion nitrosônio
NO₂⁻: nitrito
NO₃⁻: nitrato
NOS: óxido nítrico sintase
NOx: nitrito/nitrato
O₂⁻: ânion superóxido
OH[•]: radical hidroxila
OONO⁻: peroxinitrito
ox LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidada
PKB: proteína quinase B
PKC: proteína quinase C
RO[•]: radical alcóxila
ROO[•]: radical peróxila
R-SH: grupamentos tióis
R-SNO: S-nitrosotióis
SDMO: síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
SNC: sistema nervoso central
SRIS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF-α: fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese do NO catalizada pela NOS.....	14
Figura 2. Mecanismo de citostase e citotoxicidade induzido por NO.....	18
Figura 3. Papel do NO na potencialização da atividade neuronal	19
Figura 4. Papel do NO no relaxamento vascular	21
Figura 5. Patogênese da arterosclerose.....	24
Figura 6. Formação de AGEs responsáveis pela disfunção endotelial	25

ARTIGO

Figura. 1. Linear regression of serum nitrite/nitrate (NOx) by the modified Griess method using Cobas Mira analyzer ($r^2= 0.993$, $P<0.001$)	38
---	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Química do óxido nítrico	14
2.2 Fisiologia do óxido nítrico	16
2.3 Óxido nítrico e sua associação com doenças	22
2.3.1 Aterosclerose	22
2.3.2 Diabetes <i>mellitus</i>	24
2.3.3 Sepse.....	26
2.3.4 Patologias do sistema nervoso central	28
2.4 Ensaaios para a quantificação de óxido nítrico	29
2.5 Validação de métodos analíticos	32
2.5.1 Linearidade	33
2.5.2 Precisão.....	33
2.5.3 Limite de quantificação	34
2.5.4 Exatidão.....	34
2.5.5 Contaminação.....	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. ARTIGO	36
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO I	54

1. INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) desempenha um papel importante em quase todos os sistemas biológicos (YOON et al., 2002). Derivado da L-arginina, tem a reação catalizada por enzimas denominadas NO sintases (NOS) (AVOGARO et al., 2006). O NO é um radical livre reativo, agindo como uma molécula mensageira, mediando diversas funções, incluindo vasodilatação, agregação e inibição plaquetária, neurotransmissão e também apresentando atividades antimicrobianas e antitumorais (DUSSE et al., 2005). Em várias condições patológicas, o NO está associado com o aumento da concentração circulatória de citocinas e endotoxinas, como em processos inflamatórios e sepse (MOSHAGE, et al., 1995). Sua relevância biológica na neurotransmissão, como anti-inflamatório e dilatador vascular, justifica a sua mensuração em campos experimentais e clínicos (RICART-JANÉ et al., 2002).

Devido a sua meia-vida curta, a determinação do NO torna-se difícil. Conseqüentemente, a mensuração de seus metabólitos, nitrito/nitrato (NOx) é mais frequentemente utilizado para a avaliar a produção de NO (MOSHAGE et al., 1995). Existe uma forte correlação entre a produção endógena de NO e os níveis séricos de NOx, mostrando que a determinação destes metabólitos inorgânicos parece ser a forma mais adequada para a quantificação da produção de NO endógeno (ROMITELLI et al., 2007).

Os níveis de NO podem ser determinados por métodos diretos, os quais utilizam metodologias complexas, como espectrofotometria, fluorescência, quimioluminescência e cromatografia (MIRANDA et al., 2001). Embora este radical possa ser medido diretamente através destes métodos, as suas baixas concentrações no organismo e sua meia-vida curta, diminuem a praticidade destas técnicas (GUEVARA, et al., 1998). Estas possuem custo elevado, são demoradas e requerem extensivo treinamento pessoal para o manuseio dos equipamentos (TARPEY e FRIDOVICH, 2001), tornando difícil a implementação destes métodos em laboratórios clínicos de rotina (MOSHAGE et al., 1995).

A determinação indireta pode ser realizada por dosagem sérica, plasmática ou urinária do NOx, sendo que o método mais frequentemente utilizado na mensuração destes íons é baseado na reação de Griess (TSIKAS, 2000). Esta reação apresenta vantagens em comparação com outras metodologias, como simplicidade, baixo custo e rapidez do método (DUSSE et al., 2005), sendo este

aplicável na prática diária de laboratórios clínicos (RICART-JANÉ et al., 2002). Para a validação de um método é importante a identificação dos parâmetros que são críticos para a avaliação do desempenho do processo analítico e para o desenvolvimento de protocolos próprios de validação (ERMER, 2001), como a linearidade, precisão, exatidão, especificidade e limite de quantificação do método de análise proposto (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Devido a importante função desempenhada pelo NO, bem como o seu envolvimento em diferentes patologias, é relevante a mensuração de seus níveis nos tecidos biológicos, a fim de elucidar o seu envolvimento em processos inflamatórios, de estresse oxidativo e disfunção endotelial. Desta forma, é de suma importância o desenvolvimento de métodos automatizados, simples e com boa relação custo-benefício para a mensuração de NO e que seja aplicável aos laboratórios clínicos e de rotina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Química do óxido nítrico

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, possuindo um importante papel em quase todos os sistemas biológicos (ASL et al., 2008). É um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, e sua molécula possui um elétron não pareado, reagindo facilmente com o oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição como ferro, cobalto, manganês ou cobre (KIECHLE e MARLINSKI, 1993).

A biossíntese do NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina, sendo catalisada pela enzima NOS, com a participação da forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como um doador de elétron. Esta biossíntese é dividida em duas etapas, sendo que na primeira fase ocorre a hidroxilação da L-arginina, formando N^G-hidroxi-L-arginina através da utilização de uma molécula de oxigênio e duas de NADPH. Posteriormente, com um elétron proveniente do NADPH e outro da molécula de oxigênio, N^G-hidroxi-L-arginina é convertido a L-citrulina e NO (GIULIVI, 2003) (Figura 1). As NOS requerem vários cofatores para o seu funcionamento, incluindo tetrahydrobiopterina (BH₄), NADPH, dinucleotídeo flavina adenina e mononucleotídeo flavina (NAPOLI e IGNARRO, 2009).

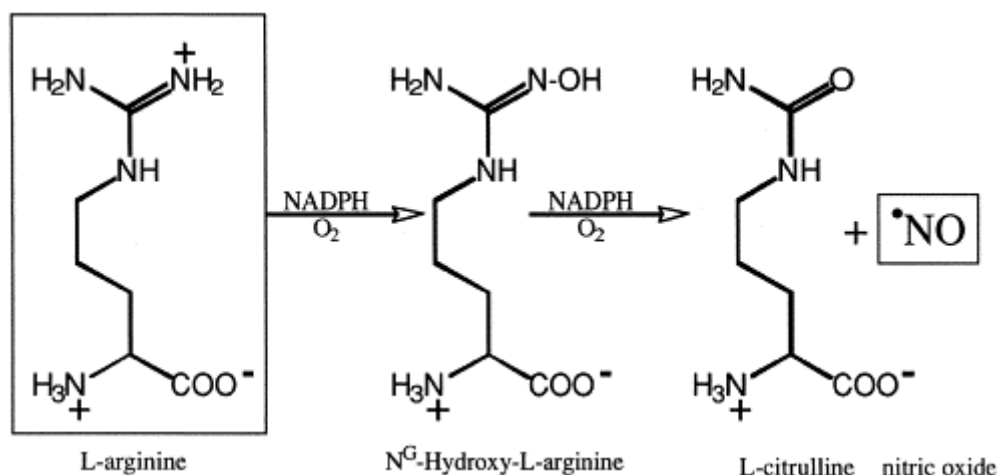


Figura 1 – Síntese do NO catalizada pela NOS. Reproduzido de GIULIVI, 2003.

O NO pode ser oxidante ou redutor, dependendo do meio em que se encontra, é extremamente lipofílico e prontamente se difunde pelas membranas plasmáticas conforme o gradiente de concentração (HART, 1999). Este radical é rapidamente degradado pelo oxigênio, e sua oxidação produz nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). O NO, em presença de oxigênio, é oxidado para NO_2^- *in vitro*, e na circulação sanguínea, em presença da hemoglobina, é oxidado até NO_3^- . Estes metabólitos podem sofrer ação de substâncias redutoras presentes na membrana celular e ser convertido de volta a NO (ALDERTON et al., 2001).

Sendo uma espécie radicalar, o NO é capaz de reagir rapidamente com outros radicais importantes do ponto de vista biológico, tais como oxigênio molecular e superóxido (O_2^-). O significado químico e biológico da oxidação do NO pela molécula de oxigênio é objeto de numerosas investigações, e é certo que tais reações são importantes para a sua toxicologia e fisiologia. Uma das mais significativas reações do NO é com o O_2^- , sendo o peroxinitrito (OONO^-), o produto desta reação (TUTEJA et al., 2004). Tais espécies são potentes oxidantes, capazes de oxidar tióis e bases de DNA (TARPEY e FRIDOVICH, 2001). O NO pode também reagir com as metaloproteínas, formando complexos entre este radical e o metal de transição. Podemos citar como exemplo a hemoglobina, uma metaloproteína que possui ferro no grupo heme (FÖRSTERMANN e SESSA, 2011). Este radical possui também uma elevada capacidade reativa frente a grupamentos tióis (R-SH), muito comuns em proteínas que contenham resíduos de cisteína (STAMLER, 1994). Esta reação induz a formação de S-nitrosotióis (R-SNO), que podem ser considerados como estoques endógenos de NO, estando presentes no plasma e nos tecidos. Em decorrência da liberação de NO de R-SNO protéicos, pode ocorrer a formação de pontes dissulfeto entre sulfidrilas vicinais. Esta modificação pós-translacional, por sua vez, pode também modular a funcionalidade de proteínas e enzimas. A S-nitrosilação de sulfidrilas de cisteínas é apontada como a maior responsável pela modulação redox e modificações funcionais de proteínas (MARSHALL et al., 2000).

As NOS são classificadas em função da sua atividade, em constitutivas (cNOS) e induzidas (iNOS) (STUEHR et al., 2001). A liberação da cNOS depende da concentração intracelular de cálcio/calmodulina e, uma vez liberadas, sintetizam NO por curtos períodos, em resposta à interação de agonistas, tais como a acetilcolina, bradicinina e histamina, via receptores acoplados à proteína G na membrana

plasmática, e ainda por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento causado pela circulação sanguínea (ALDERTON et al., 2001). Por outro lado, as iNOS independem da concentração intracelular de cálcio, e são liberadas por macrófagos poucas horas após sua ativação e também por outras células sob ação de citocinas. As iNOS sintetizam NO por longos períodos (MONCADA e HIGGS, 1993). Independente dessa subdivisão, as NOS são descritas como três isoformas, baseadas em três genes diferentes, já sequenciados. As isoformas são: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) (ambas constitutivas) e a NOS induzida ou inflamatória (iNOS) (GROSS e WOLIN, 1995; MICHEL e FERON, 1997; SZABO et al., 2000).

Quanto à ação de cada uma das NOS, é sabido que a eNOS, encontrada no endotélio vascular, gera baixas concentrações de NO, favorece a diminuição da pressão sanguínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária (NAPOLI e IGNARRO, 2009); a nNOS gera NO, regula transmissão neuronal e responde por funções de um neurotransmissor (ZHOU e ZHU, 2009); a iNOS forma NO induzido por certas citotoxinas, por hepatócito independente de cálcio e dependente de calmodulina, e por macrófagos. Este NO está intimamente ligado aos processos de defesa do organismo e, em função da produção excessiva, é relacionado aos processos destrutivos teciduais, na inflamação aguda ou crônica, e na apoptose (TODA et al., 2010). A atividade das enzimas, constitutivas e induzida, pode ser inibida por análogos da L-arginina, e a inibição da iNOS pode ser cessada por glicocorticóides (MONCADA et al., 1993), citocinas e fator de desativação de macrófagos (NATHAN, 1992).

2.2 Fisiologia do óxido nítrico

Os radicais livres gerados pelos tecidos dos organismos vivos têm sido associados a danos no DNA, proteínas e lipídeos (CAI e HARRISON, 2000). Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), ambas radicalares ou não (FINKEL e HOLBROOK, 2000). O organismo humano sofre ação constante das EROs e ERNs, sendo estas geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou,

ainda, sendo provenientes dos alimentos (AYDIN et al., 2001). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: hidroxila (HO^\bullet), superóxido (O_2^-), peroxila (ROO^\bullet) e alcóxila (RO^\bullet); e as não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2) e peroxinitrito (OONO^\bullet) (ROBERTS e SINDHU, 2009).

As ERNs estão envolvidas em diversos processos metabólicos e desempenham papel fundamental na regulação da pressão arterial, no sistema imune, coagulação e na neurotransmissão (PACHER et al., 2007). O metabolismo das ERNs se inicia com a geração do NO a partir da L-arginina e com o auxílio da enzima NOS, sendo precursor de diversas espécies mais reativas e pode, diretamente ou através destas espécies, reagir com aminoácidos, proteínas, íons metálicos e DNA (NEDIANI et al., 2011). Como exemplo, o NO pode reagir com o O_2^- para formar o OONO^\bullet , este possui alta reatividade e é responsável pela formação de diversas ERNs, que em conjunto com as EROs podem causar estresse oxidativo e danos às estruturas celulares ou mesmo a morte celular (MARTÍNEZ e ANDRIANTSITOHAINA, 2009). O estresse oxidativo, decorrente de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os radicais livres, pode estar relacionado a um grande número de doenças como, aterosclerose, diabetes *mellitus*, e outras doenças crônicas (CAI e HARRISON, 2000).

O interesse na molécula de NO tem aumentado significativamente desde a sua descoberta como um mensageiro biológico em 1987 (MICHEL e FERON, 1997). Este radical é uma importante molécula de sinalização presente em uma gama variada de tecidos, e está envolvido em muitos processos fisiológicos, tais como neurotransmissão, resposta imune, atuando na defesa inespecífica do hospedeiro e até mesmo na regulação da pressão sanguínea, promovendo a homeostasia vascular (BRYAN e GRISHAM, 2007; PACHER et al., 2007). Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a sua concentração ou depuração tecidual (YAMAGUCHI et al., 2006).

O NO é considerado um dos principais mediadores citotóxicos de células imunes efetoras ativadas, constituindo uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imune (MOILANEN & VAPPATALO, 1995). No sistema imunológico, o NO é produzido em quantidades significativas durante a resposta

inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune, que expressam a isoforma iNOS. Esta isoforma é induzida por lipopolissacarídeos (LPS) e/ou citocinas, sendo que o NO gerado nestas circunstâncias ocasiona danos oxidativos letais às células alvo, tais como células cancerosas ou bacterianas (WINK et al., 1991; KANWAR et al., 2009). Uma vez iniciada a produção de NO pela iNOS, ela se prolonga por várias horas e em concentrações altas o suficiente (na ordem de μM) para se mostrarem tóxicas à célula alvo (NATHAN e HIBBS, 1991). Este radical é difundido para fora dos macrófagos penetrando nas células tumorais, destruindo-as, através de enzimas que estão envolvidas na respiração celular, como a aconitase, uma enzima envolvida no ciclo do ácido tricarboxílico, e também a ribonucleotídeo redutase, enzima indispensável na síntese de DNA (WINK et al., 1991; MONCADA e HIGGS, 1993), como pode ser visualizado na Figura 2.

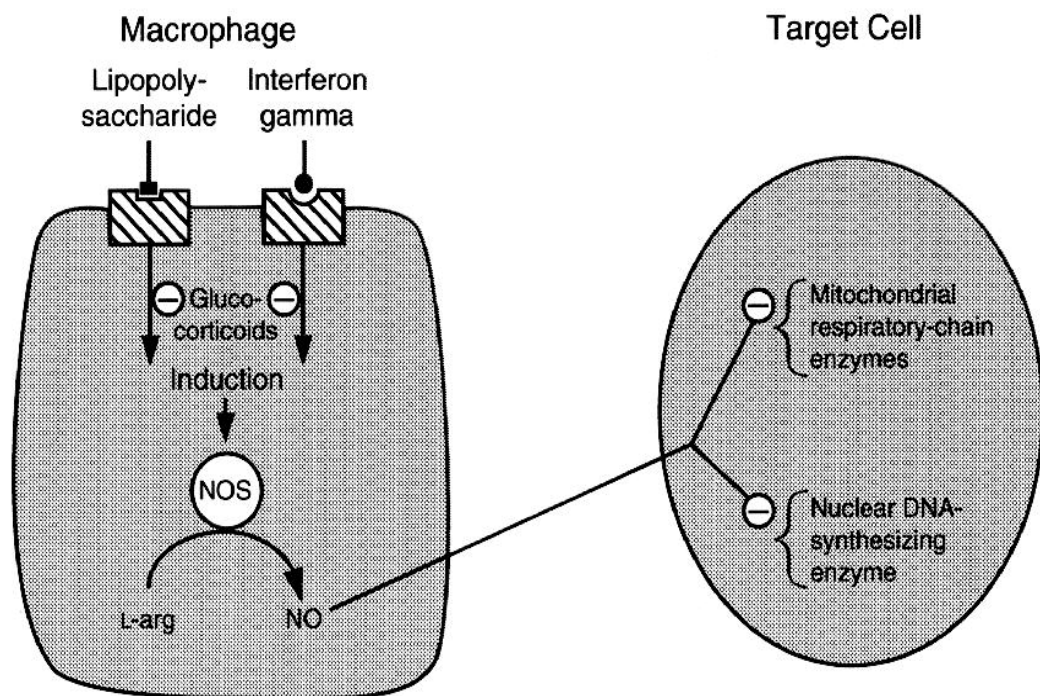


Figura 2 – Mecanismo de citostase e citotoxicidade induzido por NO. Reproduzido de MONCADA e HIGGS, 1993.

O NO possui também funções de neurotransmissor entre as células nervosas (FÖRSTERMANN e SESSA, 2011). No sistema nervoso central (SNC) e periférico, o NO, além de atuar como neurotransmissor, possui um papel de mediar a regulação a longo prazo da transmissão sináptica e facilitar a liberação de outros neurotransmissores e hormônios (CHO et al., 1992). A produção neuronal de NO é

conduzida quando um neurônio ativado libera um mensageiro químico, que difunde para o neurônio vizinho e interage com receptores específicos, que ativam a célula, transmitindo, assim, o impulso nervoso (MONCADA E HIGGS, 1993). O glutamato, principal neurotransmissor no cérebro de mamíferos, é liberado de vesículas no neurônio pré-sináptico ligando-se ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) do neurônio adjacente (MONCADA E HIGGS, 1993). A ativação dos receptores NMDA leva a um aumento de cálcio intracelular, ligando-se à calmodulina e ativando diferentes enzimas, incluindo a nNOS, provocando um aumento da produção de NO. Este NO formado, ativa a guanilato ciclase solúvel, pela ligação do ferro do grupo prostético heme da enzima (RODRIGO e FELIPO, 2006) (Figura 3).

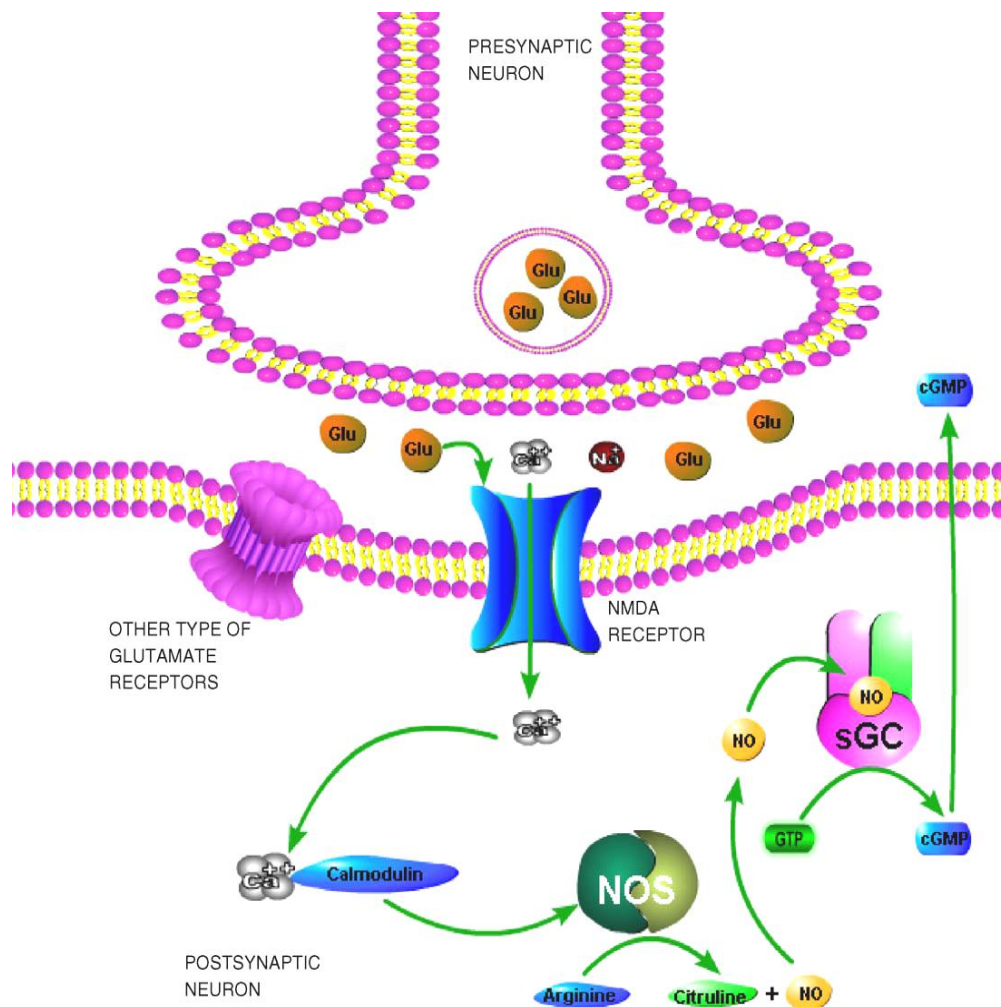


Figura 3 – Papel do NO na potencialização da atividade neuronal. Reproduzido de RODRIGO e FELIPO, 2006.

O NO exerce também funções sobre a aprendizagem, memória e neurogênese (ZHOU e ZHU, 2009). Há evidências de que o NO formado no SNC

pela nNOS está envolvido na regulação central da pressão arterial (TOGASHI et al., 1992; FÖRSTERMANN et al., 1994), e que um bloqueio da atividade da nNOS na medula e no hipotálamo pode causar hipertensão arterial sistêmica (TODA et al., 2009). As duas isoformas, eNOS e nNOS, podem ter papéis distintos na regulação fisiológica do tônus microvascular em humanos. Curiosamente, as células musculares e vasculares lisas também expressam baixos níveis de nNOS, demonstrando que também são responsáveis por um certo grau de vasodilatação, quando a eNOS torna-se disfuncional (MELIKIAN et al., 2009).

Sabe-se que o NO proveniente da eNOS é fundamental para a proteção dos vasos sanguíneos, uma vez que ele mantém o tônus vascular, regula a pressão sanguínea, previne a agregação plaquetária, inibe adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular e tem efeito antiproliferativo das células da camada vascular (PACHER et al., 2007). A disfunção endotelial mais importante é a alteração do relaxamento vascular devido à redução da biodisponibilidade do NO (ZHANG, 2008). O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento dos vasos. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*), levando à ativação da eNOS nestas células e à consequente produção de NO (BUSCONI e MICHEL, 1993).

O NO produzido na célula endotelial é difundido rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células são devido ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica (MONCADA et al., 1991). No interior da célula muscular, o NO reage com o ferro de heme proteínas ou com o ferro de proteínas sulfuradas, modulando assim a atividade de enzimas intracelulares críticas. O exemplo mais conhecido dessas reações envolve a difusão do NO de células vasculares endoteliais para células da musculatura lisa vascular, onde o NO reage com o ferro do grupamento heme da guanilato ciclase solúvel, alterando sua conformação e ativando a enzima. A guanilato ciclase ativa produz guanosina monofosfato cíclica (GMPc), promovendo o relaxamento dessas células musculares lisas da vasculatura (VANHOUTTE, 1998; HART, 1999). Estes eventos bioquímicos promovem potentes

efeitos vasodilatadores do NO e desencadeiam os mecanismos de sinalização para estímulos da modulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo (COGGINS e BLOCH, 2007) (Figura 4).

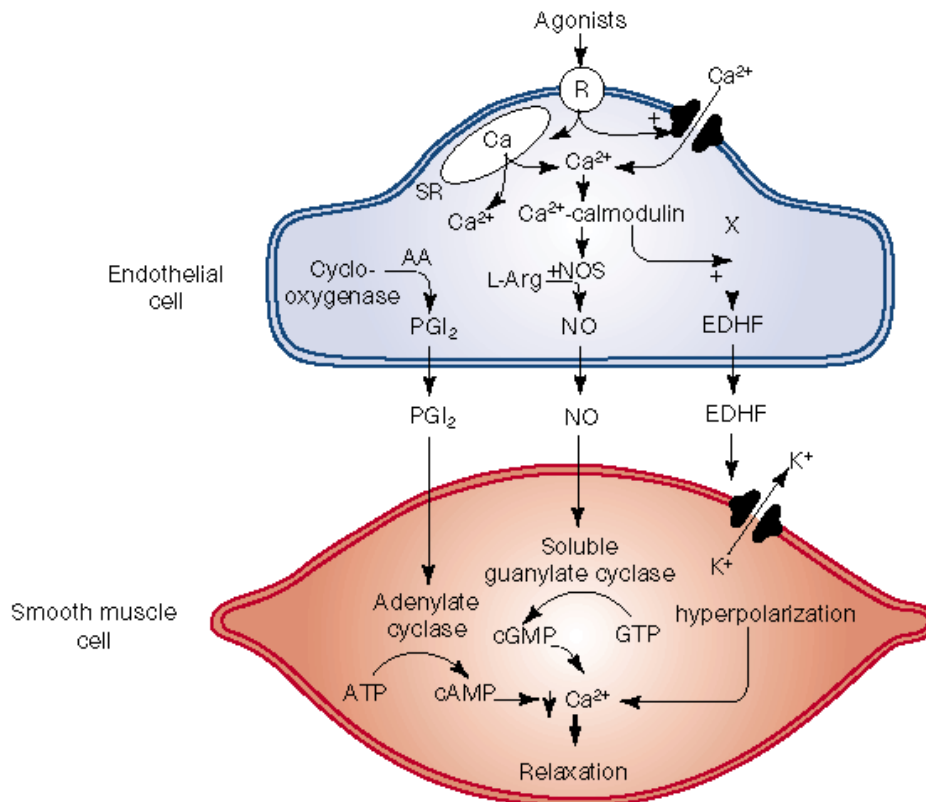


Figura 4 – Papel do NO no relaxamento vascular. Reproduzido de VANHOUTTE, 1998.

Em condições fisiológicas o NO provavelmente atua como um importante “scavenger” de radical livre, como o O_2^- , limitando a toxicidade associada com esta molécula, inibindo a agregação plaquetária e a adesão leucocitária na célula endotelial (PACHER et al., 2007). Embora o NO seja uma molécula importante na manutenção vascular, trata-se de um radical livre, sendo que sua síntese exacerbada está relacionada com vários processos patológicos (KANEKI et al., 2007). É sabido que na presença de O_2^- liberados por macrófagos, o NO é metabolizado a $OONO^-$, causando dano celular. Portanto, é possível observar que em situação de estresse oxidativo, o efeito benéfico do NO é suprimido, ocorrendo o impedimento de suas ações fisiológicas no endotélio vascular (HSICH et al., 2000).

2.3 Óxido nítrico e sua associação com doenças

Defeitos na via do NO podem levar ao desenvolvimento de muitas patologias, como hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, desordem no sistema nervoso central, aterosclerose, hipercolesterolemia, diabetes *mellitus*, entre outras (TAHA, 2003).

2.3.1 Aterosclerose

As células endoteliais situam-se na camada íntima dos vasos, estando em contato direto com as células musculares lisas e com o sangue circulante. Apresentam estrutura alongada com o núcleo proeminente e são repletas de organelas intracelulares, possuindo atividade metabólica elevada (LUSIS, 2000). O endotélio é o responsável pela manutenção do tônus vascular e homeostase sanguínea, pois produz várias substâncias ativas, como prostaciclina e o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), que é o próprio NO, sendo, por isso, de suma importância na gênese de doenças vasculares, como a aterosclerose (DEANFIELD et al., 2007). A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, podendo ter várias causas. Dentre estas, as mais comuns são acúmulo de vários tipos de células, formação de placas de tecido conjuntivo, acúmulo de lipídeos, disfunção endotelial e hipertensão arterial (HACKAM et al., 2003).

O termo disfunção endotelial é mais frequentemente usado para denotar uma diminuição na vasodilatação dependente do endotélio, mas também compreende aquelas condições que levam a ativação do endotélio com anormalidades nas interações deste com leucócitos, plaquetas e substâncias reguladoras (ANDERSON, 1999). Uma alteração na função endotelial tem sido identificada como um marcador precoce de doença cardiovascular e pode predizer a ocorrência de doença arterial coronariana no futuro, antes que as alterações ateroscleróticas apareçam nas artérias (DEANFIELD et al., 2007). A relação da lesão endotelial com o processo da aterosclerose torna-se clara com a compreensão do papel das lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL) (SCHLEICHER e FRIESS, 2007).

A oxidação do LDL é induzida pelos radicais livres produzidos pelos macrófagos, células endoteliais ou células musculares lisas (HEINECKE, 1998). A oxLDL induz as células endoteliais a expressar a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), permitindo que os monócitos e linfócitos T possam se aderir às células endoteliais através de seus receptores de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (SCALIA, 1998). Além disso, as oxLDL ligam-se a receptores específicos na superfície dos macrófagos, sendo internalizadas por estes, contribuindo na formação das células espumosas (SCHLEICHER e FRIESS, 2007). Uma vez formadas, as oxLDL exercem uma série de efeitos pró-ateroscleróticos, como a indução do acúmulo de colesterol nos macrófagos e o estímulo à produção endotelial de citocinas e fatores de crescimento, que podem afetar a função endotelial, regular a proliferação de células musculares lisas, além de participar da degradação do colágeno e da trombose (LIBBY, 2002).

Outra influência prejudicial das oxLDL na função endotelial é sua capacidade de reduzir a vasodilatação endotélio dependente, por inibição da atividade da eNOS e consequente redução da biodisponibilidade do NO, além de aumentar a produção de EROs (ROSENSON, 2004). Embora o NO seja vasodilatador e inibidor da oxidação da LDL (MALO-RANTA et al., 1994), trata-se de um radical livre que reage com o ânion O_2^- liberado por macrófagos, produzindo $OONO^-$, potente agente oxidante que determina peroxidação lipídica e ampla destruição tecidual (RADI et al., 1991). Além disso, ocorre também a inativação do NO e o impedimento de suas ações fisiológicas no endotélio vascular, ocorrendo uma diminuição dos níveis de NO, ocasionando uma aceleração da lesão aterosclerótica (ALEXANDER, 1995; LEOPOLD e LOSCALZO, 2008), como pode ser visualizado na Figura 5.

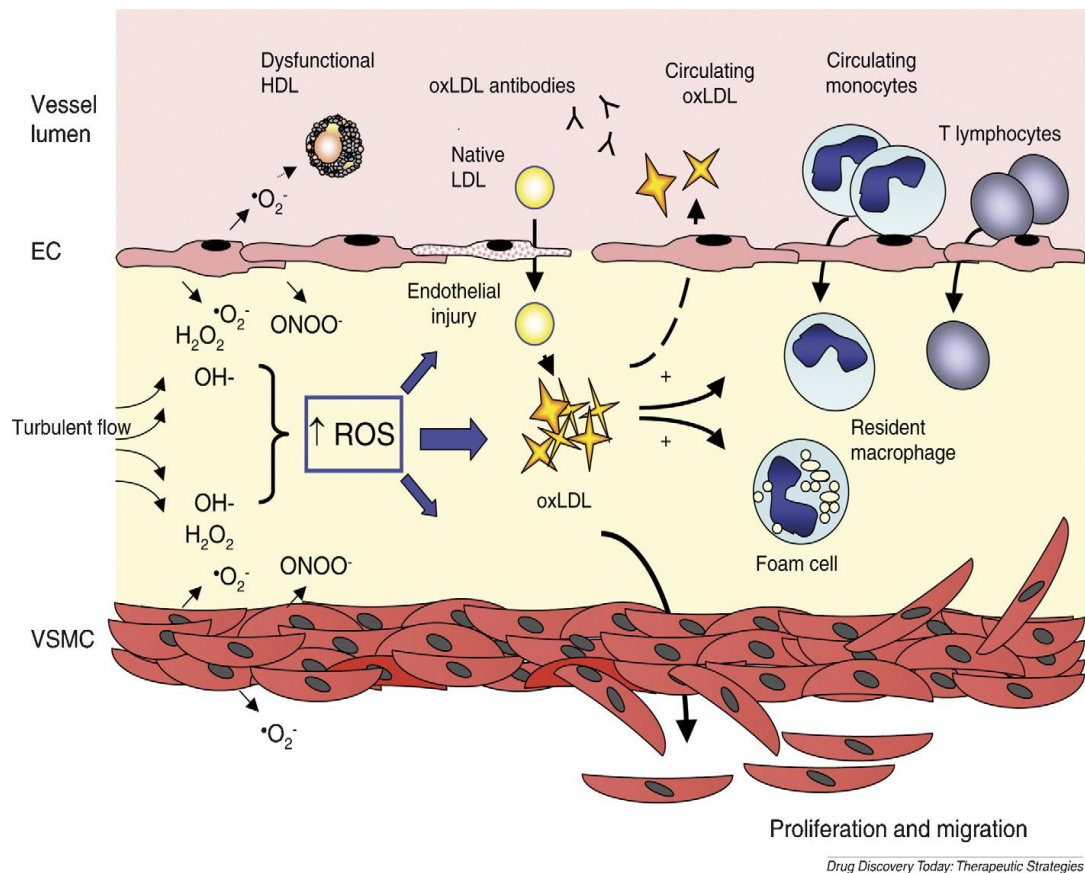


Figura 5 – Patogênese da aterosclerose. Reproduzido de LEOPOLD e LOSCALZO, 2008.

2.3.2 Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade desta de exercer adequadamente seus efeitos, sendo caracterizada por hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (ADA, 2004; CRAIG et al., 2009). Há duas formas principais de apresentação desta síndrome: o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM tipo 1), que é caracterizado pela deficiência de secreção insulínica; e o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM tipo 2), causando alterações na secreção insulínica e na sensibilidade dos tecidos alvos (BURTIS et al., 2008). Tanto a resistência à insulina como a falha progressiva nas células- β pancreáticas são peças-chaves da história do mecanismo natural do DM tipo 2 (FONSECA, 2006).

A complexidade das manifestações vasculares associadas ao DM é resultado da disfunção de múltiplos componentes da fisiologia vascular, principalmente o

endotélio, células musculares lisas e plaquetas (CAPELLINI et al., 2010). A hiperglicemia induz uma série de eventos celulares, que não somente aumentam a produção de EROs, mas também diminuem a disponibilidade de moléculas antioxidantes. O principal mecanismo pelo qual o estresse oxidativo leva à disfunção endotelial é a redução da biodisponibilidade do NO endotelial (NISHIKAWA et al., 2000; BECKMAN et al., 2001). O principal evento celular que reduz a biodisponibilidade do NO é o aumento do O_2^- pela mitocôndria, cuja atividade está aumentada na hiperglicemia. Este ânion inativa o NO para formar $OONO^-$, que é um potente oxidante. Além disso, $OONO^-$ pode oxidar o BH_4 , levando a um fenômeno conhecido como “desacoplamento da enzima NOS”, resultando na síntese de O_2^- , em vez da produção de NO pela NOS (CAPELLINI et al., 2010).

A produção mitocondrial de O_2^- também aumenta a produção intracelular dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (CREAGER e LÜSCHER, 2003). Estas proteínas glicadas acumulam-se nas paredes dos vasos expostos à hiperglicemia, alteram a integridade estrutural da parede vascular e neutralizam o NO, afetando substancialmente a função endotelial (AHMED, 2005; CHILTON et al., 2011) (Figura 6).

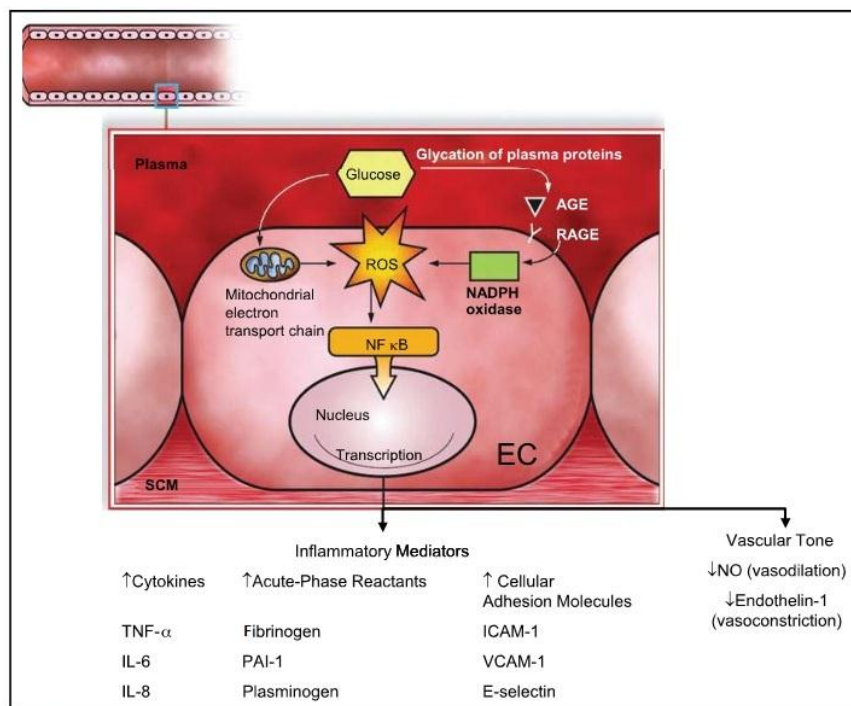


Figura 6 – Formação de AGEs responsáveis pela disfunção endotelial. Reproduzido de CHILTON et al., 2011.

Outra hipótese responsável pela alteração vascular no diabetes é a via da proteína quinase C (PKC) (TESSARI et al., 2010). A ativação da PKC pela hiperglicemia promove a inibição da eNOS, vasodilatação reduzida e baixa liberação da endotelina-1 (agente vasoconstritor) (AVOGARO et al., 2006). Através da via da hexosamina, a frutose 6-fosfato é convertida em glucosamina 6-fosfato e, posteriormente em N-acetilglucosamina (GlcNAc) (ROLO e PALMEIRA, 2006). A ligação de GlcNAc em resíduos de serina da eNOS dificulta a fosforilação deste resíduo pela proteína quinase B (PKB), com consequente diminuição da atividade da eNOS (DU et al., 2001). Já pela via do poliol, o excesso de glicose pode ser metabolizado em sorbitol pela enzima aldose redutase, diminuindo a concentração de NADPH e os níveis de glutatona reduzida, sendo ambos importantes agentes redutores do sistema antioxidante (BROWNLEE, 2001).

A resistência à insulina, níveis elevados de ácidos graxos livres e hiperglicemia aumentam o estresse oxidativo e o processo inflamatório, sendo esta condição associada à disfunção endotelial e às complicações diabéticas. Isto indica que o estresse oxidativo e o processo inflamatório exercem um papel crucial na patogênese das complicações diabéticas tardias (EVANS et al., 2002). A diminuição dos níveis de NO em pacientes com DM pode ser a base para a sua predisposição aterogênica (CREAGER e LÜSCHER, 2003). O diabetes aumenta a migração de células musculares lisas vasculares, podendo gerar lesões ateroscleróticas (SUZUKI et al., 2001). Além disso, é observado nesta patologia uma diminuição da síntese de colágeno nas células musculares lisas e um aumento da produção de metaloproteinases da matriz, levando a uma maior tendência de desestabilização e ruptura da placa aterosclerótica (FUKUMOTO et al., 1998). O desenvolvimento de microalbuminúria no DM caracteriza-se por um progressivo grau de comprometimento endotelial, ocasionado por uma redução da atividade do NO (OTT et al., 2011).

2.3.3 Sepses

O termo sepsis é definido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), resultando de uma complexa interação entre o microrganismo infectante e/ou suas toxinas e a resposta imune, pró-inflamatória e pró-coagulante do

hospedeiro (RUSSEL, 2006). Define-se um quadro de SRIS, quando o paciente manifesta duas ou mais das seguintes condições: hipertermia (temperatura maior que 38°C) ou hipotermia (temperatura menor que 36°C); taquicardia (frequência cardíaca maior que 90 batimentos (minutos)); taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 respirações/minutos ou pressão parcial de CO₂ menor que 32 mmHg) e contagem de leucócitos totais sanguíneos maior que 12.000/mm³ ou menor que 4.000/mm³ ou com mais de 10% de formas imaturas (FAIRCHILD e O' SHEA, 2010).

Uma das sequelas importantes da SRIS ou da sepse, que pode surgir, é a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), que acomete cerca de 30% dos pacientes com sepse, enquanto todos os pacientes desenvolvem disfunção de um órgão (KUBIAK et al., 2010). Caso o quadro de sepse não seja revertido, poderá ocorrer a evolução para o choque séptico, que é caracterizado por severa hipotensão e diminuição da perfusão tecidual em decorrência da hiporreatividade vascular a catecolaminas endógenas e exógenas, que pelo menos em parte é explicado pelo grande aumento na produção de NO que ocorre na sepse (VICENT et al., 2009).

A partir do momento em que uma bactéria (ou qualquer outro patógeno) entra no organismo, monócitos e macrófagos são ativados e recrutados para o reconhecimento dos antígenos bacterianos (FUJIHARA et al., 2003; NETEA et al., 2003). Após o reconhecimento dos patógenos, estes macrófagos e monócitos desencadeiam uma comunicação intracelular que ativa a síntese de fatores de transcrição como o fator nuclear de transcrição NFκB (*Nuclear Factor* KB), envolvidos na transcrição de inúmeras citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-6 (IL-6), quimiocinas, moléculas de adesão e outras enzimas induzíveis como ciclooxigenase-2 (COX-2) e iNOS (HOESEL et al., 2004; RUSSEL, 2006). Na sepse, além da liberação de citocinas, ocorre também o aumento da atividade da iNOS e a diminuição da atividade da eNOS (AIRD, 2003).

Nesta patologia, a iNOS é expressa em resposta à liberação de citocinas pró-inflamatórias, levando ao aumento da liberação de NO (COHEN, 2002). Acredita-se que esta enzima seja responsável pela lesão tecidual, disfunção sistêmica e hipóxia presentes nos indivíduos com esta patologia (AIRD, 2003). O NO e a iNOS estão implicados na patofisiologia da falência microcirculatória e na disfunção de órgãos

na sepse (ERUSALIMSKY e MONCADA, 2007). Por outro lado, a liberação de NO através da eNOS exerce um efeito protetor no choque séptico, melhorando o tônus vascular, prevenindo, portanto, uma vasoconstrição excessiva periférica e uma diminuição do fluxo sanguíneo, a despeito de concentrações elevadas de diversas substâncias vasoconstritoras, como a endotelina-1 (DINARELLO, 1997).

2.3.4 Patologias do sistema nervoso central

O NO possui um papel importante na formação e no funcionamento do sistema nervoso, bem como na patogenia de distúrbios degenerativos, como o Alzheimer e o Parkinson (STEINERT et al., 2010). A produção de OONO^- representa um dos principais causadores do estresse oxidativo e também está implicado na patogenia destas doenças neurodegenerativas (LIPTON et al., 1993; DAWSON e DAWSON, 1996). A produção excessiva de NO pode contribuir para um processo denominado excitotoxicidade glutamatérgica, que é descrita como uma condição resultante da liberação excessiva de glutamato e a consequente entrada de cálcio no terminal pós-sináptico e ativação da nNOS. A excitotoxicidade parece ser responsável por grande parte do dano cerebral que ocorre em várias doenças neurodegenerativas (DUNCAN e HEALES, 2005).

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pela diminuição progressiva da memória e declínio severo da cognição, associados com a degradação de neurônios colinérgicos em muitas áreas do SNC, acompanhada de uma redução de neurotransmissores, entre os quais a acetilcolina é o mais importante (GIASSON et al., 2002). As três isoformas do NO estão elevadas na DA, indicando um importante papel do NO nesta patologia (ZHOU e ZHU, 2009). O papel da iNOS nos mecanismos inflamatórios associados à DA foi evidenciado pela presença de nitrotirosina em cérebros com esta patologia, indicando exposição e dano oxidativo por OONO^- , gerando dano neuronal e tecidual (SMITH et al., 1997; HENEKA et al., 2001).

A doença de Parkinson (DP) está associada a uma perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra, resultando em disfunções motoras extrapiramidais, incluindo, tremores, rigidez e bradicinesia (ZHOU e ZHU, 2009). Durante a DP ocorre a excitotoxicidade do glutamato com o aumento da

desfosforilação da nNOS, com conseqüente aumento de sua atividade enzimática (KAVYA et al., 2006). Citocinas próinflamatórias induzem a expressão da iNOS, sendo que o aumento dos níveis de NO por esta isoenzima desempenha um importante papel na destruição dos neurônios dopaminérgicos (ZHANG et al., 2006). O NO é o responsável também pelo aumento da liberação de dopamina no estriado, sugerindo que este radical esteja envolvido no controle do comportamento motor nesta patologia (GOMES e BEL, 2003).

2.4 Ensaios para a quantificação de óxido nítrico

A detecção do NO em amostras biológicas representa um desafio em função da ínfima concentração e da meia-vida extremamente curta deste composto, sendo esta de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos (KIECHLE e MARLINSKI, 1993). O NO é produzido em pequenas quantidades nas células e reage rapidamente com o oxigênio, metais, sulfidril, dissulfeto e hemoglobina (GUEVARA et al., 1998). Conseqüentemente, a mensuração dos metabólitos do NO, os íons NO_2^- e NO_3^- , são mais frequentemente utilizados para a avaliação da sua produção (ASL, et al., 2008). Análises sanguíneas de humanos saudáveis sugerem que, sob condições normais, 85% do total de compostos relacionados ao NO consistem em NO_2^- e NO_3^- (SONADA et al., 1997).

As técnicas utilizadas para medir os níveis de NO de determinação direta empregam metodologias complexas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), fluorimetria, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), quimioluminescência, ressonância magnética e detecção eletroquímica através de sensores intravasculares (BRYAN & GRISHAM, 2007). Embora o NO possa ser medido diretamente através destas metodologias, a sua meia-vida curta e suas baixas concentrações *in vivo*, são fatores que diminuem a praticidade destes métodos para a avaliação em amostras biológicas (GUEVARA et al., 1998). A quimioluminescência é baseada na reação do NO com o ozônio, para produzir dióxido de nitrogênio em estado excitado (TAHA, 2003). A rápida taxa de reação do NO com o ozônio e a alta sensibilidade da detecção quimioluminescente da luz emitida pelo NO_2^- permite em tempo real o monitoramento da formação de NO, possuindo esta técnica uma boa especificidade e sensibilidade (BRYAN &

GRISHAM, 2007). Este método possui alguns inconvenientes como, custo elevado, ensaio demorado e a necessidade de vários reagentes para a realização da técnica (TARPEY e FRIDOVICH, 2001).

Os métodos fluorimétricos são bastante utilizados na avaliação do NO, sendo considerados sensíveis e específicos (KOJIMA et al., 2001). Na maioria das vezes, esta técnica emprega um grupo amino adjacente para revelar a capacidade do NO em produzir agentes N-nitrosantes para formar triazóis (TAHA, 2003). Os ensaios eletroquímicos para a análise de NO possuem uma boa sensibilidade, especificidade e baixo custo (TARPEY e FRIDOVICH, 2001). O NO é uma espécie reativa eletroquímica que pode ser oxidada na superfície de ânodos metálicos ou carbônicos. Esta reação é baseada na oxidação do NO, ocorrendo a transferência deste radical ao ânodo, gerando cátion nitrosônio (NO^+), sendo convertido a NO_2^- . A corrente gerada, a partir da oxidação do NO, é diretamente proporcional à concentração de NO, com limite de quantificação de 10 mmol/L (CHRISTODOULOU et al., 1996). Muitos fatores podem afetar a reprodutibilidade deste ensaio, como a própria natureza instável do NO (TAHA, 2003).

O método CG-MS requer a conversão de NO_3^- e NO_2^- em derivados voláteis e termicamente estáveis antes da detecção (SMYTHE et al., 1999). Em princípio, duas reações de derivatização são utilizadas, sendo que a primeira reação envolve ácido sulfúrico concentrado ou anidro trifluoroacético para a catálise de nitração de reagentes aromáticos, como benzeno, 1,3,5- trimetoxibenzeno e tolueno. A análise de NO_2^- por este ensaio requer a oxidação de NO_2^- em NO_3^- . A segunda reação é uma substituição nucleofílica de brometo em R-bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotolueno pelo NO_2^- para formar α -nitro-2,3,4,5,6-pentafluorotolueno (TSIKAS, 2000). Este ensaio tem sido utilizado para quantificar com especificidade e precisão o NO_2^- e NO_3^- presentes no plasma e urina (TSIKAS et al., 1999).

Os metabólitos do NO podem ser quantificados separadamente por determinação indireta, sendo a reação de Griess o ensaio mais utilizado em virtude de sua simplicidade, rapidez e custo-benefício (ASL, et al., 2008). A reação colorimétrica de Griess foi proposta em 1879, sendo uma técnica padrão para a determinação dos níveis do NO_2^- inorgânico (DUSSE et al., 2005). Esta é uma reação de diazotização, onde o NO_2^- reage com a sulfanilamida para produzir um íon diazônio, sendo então ligado ao N-(1-naftil) etilenodiamina, formando um cromóforo,

onde este apresenta um pico de absorvência em 540nm (BRYAN & GRISHAM, 2007). Comprimentos de onda na faixa de 520-590nm podem ser empregados para a análise do NO, pois as leituras mostraram pequenas diferenças nesta faixa de absorvência (ROMITELLI et al., 2007). Análise de NO_3^- pelo método de Griess requer redução de NO_3^- em NO_2^- , antes da reação de diazotização. Esta redução em fluídos biológicos é realizada por meio de redutores químicos e também através da enzima nitrato redutase, provenientes de *Aspergillus* sp ou *Escherichia coli* (BRYAN & GRISHAM, 2007). Os redutores químicos mais frequentemente utilizados incluem o cádmio (Cd) e o cloreto de vanádio (VCl_3). A redução com Cd pode ser realizada em condições ácidas e básicas, já a redução com o VCl_3 é feita sob condições ácidas. A redução utilizando a enzima nitrato redutase é mais frequentemente usada na presença do cofator NADPH (MIRANDA et al., 2001).

No método de Griess, um grande número de amostras pode ser processadas em um curto espaço de tempo, tornando este teste adequado para a rotina de laboratórios clínicos (MOSHAGE et al., 1995). A determinação quantitativa dos metabólitos do NO em sangue total, plasma, soro ou urina requer uma série de procedimentos analíticos, a fim de eliminar interferentes do sangue, como a hemoglobina e as proteínas plasmáticas (ELLIS et al., 1998). Na reação de Griess é indispensável a desproteinização de amostras séricas, para evitar interferências na leitura espectrofotométrica. Os agentes desproteinizantes mais utilizados são sulfato de zinco, metanol/éter, cloreto de mercúrio e ácido sulfossalicílico (DUSSE et al., 2005). Outra condição de variabilidade analítica na determinação dos níveis de NO com a reação de Griess são as hemoproteínas sanguíneas, como a hemoglobina, sendo que esta pode interferir na quantificação nos níveis de NO_2^- e NO_3^- , pois pode ser absorvida no mesmo comprimento de onda (500-600 nm) como o cromóforo formado no final da reação de Griess, sendo que esta interferência depende do grau de hemólise durante a punção venosa (RICART-JANÉ et al., 2002).

Os valores plasmáticos de NO_2^- e NO_3^- determinados pela reação de Griess podem sofrer influências de acordo com o tipo de anticoagulante utilizado na coleta (RICART-JANÉ et al., 2002). O plasma heparinizado pode formar um precipitado sobre a adição do Griess, tornando este anticoagulante desfavorável para a análise, não ocorrendo o mesmo com o citrato e o EDTA (BRYAN & GRISHAM, 2007). Para Ricart-Jané et al (2002) o EDTA é o melhor anticoagulante, em comparação com a

heparina e o citrato para a quantificação dos metabólitos do NO, sendo o mais usado em rotinas clínicas e experimentais. Em um estudo preliminar realizado pelo nosso grupo, não foi observada interferência dos anticoagulantes sobre os níveis de NO_2^- , e também foi possível concluir que o tipo de amostra utilizado (soro ou plasma) não influenciou significativamente os níveis de NO_2^- , independentemente de esta dosagem ser realizada em amostras frescas ou mantida a -20°C pelo período de quatro meses (ANEXO I). Como o NO_2^- também é originado a partir de alimentos é essencial que a coleta de sangue seja realizada em jejum, e também que seja feita uma restrição por dois dias de alimentos ricos em NO_2^- e NO_3^- , como carnes, beterraba, espinafre, queijos, entre outros (DUSSE et al., 2005). Segundo Ricart-Jané et al (2002), os valores de NO_x obtidos pelo método de Griess são menos confiáveis do que os resultados obtidos por outros métodos. No entanto, este método é simples e aplicável à rotina diária. Além disso, os metabólitos do NO medidos segundo a reação de Griess têm mostrado uma boa correlação com CG-MS (ROMITELLI et al., 2007).

2.5 Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório (McDONALD, 1999; WALSH, 1999). O objetivo da validação de métodos analíticos é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida (ANVISA, 2003).

As características de execução de um método são expressas em termos de parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação do mesmo. Estes parâmetros visam verificar a linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limite de quantificação do método de análise proposto (ANVISA, 2003; ICH, 2005). O analista deve identificar os parâmetros que são críticos para o desempenho do processo analítico e desenvolver protocolos próprios de validação, incluindo critérios de confiabilidade e o desenvolvimento de uma análise apropriada. Cada método validado indica que o mesmo foi avaliado estatisticamente e é adequado para seu propósito (ERMER, 2001).

Estes parâmetros de validação têm sido definidos por comitês e/ou agências nacionais e internacionais como: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *European Medicines Agency* (EMA), *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), *International Conference on Harmonization* (ICH) e *International Organization for Standardization* (ISO).

2.5.1 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco padrões com concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática (ANVISA, 2003; EMA, 2011).

2.5.2 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é expressa como o coeficiente de variação (CV). A repetibilidade ou precisão intra-corrida (intra-ensaio) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária ou precisão inter-corridas (inter-ensaio) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária é recomendado um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas diferentes (ANVISA, 2003; EMA, 2011).

2.5.3 Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis diferentes. (ANVISA, 2003; EMEA, 2011).

2.5.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança diferentes (ANVISA, 2003; EMEA, 2011).

2.5.5 Contaminação

É realizada uma análise pelo método de adição de padrão, no qual é adicionado quantidades conhecidas de impurezas, ou seja, é o estudo da contaminação entre amostras de concentrações diferentes em sistemas automatizados (ANVISA, 2003; EMEA, 2011). Este parâmetro pode ser avaliado para ver se não há o arraste entre duas diferentes concentrações do analito (EMEA, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Desenvolver e validar um método automatizado para a quantificação dos níveis séricos de nitrito/nitrato (NOx).

3.2. Objetivos específicos:

- Desenvolver um protocolo automatizado para a quantificação dos níveis de NOx no sistema automatizado Cobas Mira[®].
- Avaliar algumas características analíticas, como linearidade, precisão, exatidão, limite inferior de quantificação e contaminação do método proposto.
- Avaliar os níveis de NOx em amostras séricas de pacientes saudáveis, a fim de sugerir um valor médio para os níveis de NOx mensurados pelo método proposto.

4. ARTIGO

O artigo apresentado a seguir inclui as seções “Materiais e Métodos” e “Resultados” desta dissertação. Além disso, também é apresentada uma discussão dos resultados e a relação das referências utilizadas para a elaboração deste artigo, o qual está disposto no formato publicado no periódico *Clinical Biochemistry*.



A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate

Etiane Tatsch^{a,b}, Guilherme Vargas Bochi^a, Renata da Silva Pereira^{a,b}, Helena Kober^a,
Vanessa Albertina Agertt^b, Marli Matiko Anraku de Campos^b, Patrícia Gomes^c,
Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^d, Rafael Noal Moresco^{a,b,*}

^a Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Curso de Farmácia, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brazil

^d Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2010

Received in revised form 5 December 2010

Accepted 11 December 2010

Available online 23 December 2010

Keywords:

Clinical laboratory techniques

Inflammation

Nitric oxide

Oxidative stress

Vasodilation

ABSTRACT

Objective: We described an automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate (NO_x) using the Cobas Mira clinical chemistry analyzer.

Design and methods: NO_x was measured by the modified Griess method. Precision, accuracy, linearity, instrument carry-over and lower limit of quantitation (LLOQ) were assessed.

Results: The automated technique for measurement of serum NO_x was linear, precise, and accurate. It has a LLOQ of 2.0 μmol/L.

Conclusion: Serum NO_x measured by the modified Griess method can be applied easily to the Cobas Mira clinical chemistry analyzer.

© 2010 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Nitric oxide (NO), although structurally a simple molecule, plays important roles in almost every biological system [1]. Formation of NO from L-arginine is catalyzed by a diverse family of nitric oxide synthase (NOS) isoenzymes [2]. The radical NO acts as a messenger molecule mediating diverse functions including vasodilatation, platelet aggregation inhibition, neurotransmission, learning and memory formation, antimicrobial and antitumoral activities [3]. Its biological relevance in neurotransmission, anti-inflammation, and vascular dilatation justifies its measurement in clinical and experimental fields [4]. NO reacts with oxygen species and biological molecules, such as dioxygen, superoxide anion and oxyhemoglobin to form a variety of products, including nitrite and nitrate. Nitrite and nitrate are the major stable metabolites of endogenous NO and are accessible for quantitative analysis [5]. Due to very short half-life, determination of the NO itself is difficult, consequently, measurement of the circulatory stable end products of NO, nitrite/nitrate (NO_x), are

most often used to evaluate NO production. Since a strong correlation between endogenous NO production and serum NO_x levels has been established, determination of these inorganic NO metabolites in the circulation seems to be the most suitable method of NO production quantification [1].

The Griess method is recommended for nitrate and nitrite quantification because it is easier, quicker, cheaper, and more sensitive than other methods [4]. It requires a shorter time for measurement of nitrate in serum compared with high performance liquid chromatography (HPLC) [6]. In addition, this method can be applied to ELISA microplate readers [4]. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based methods are presently the most accurate quantitative methods for nitrate and nitrite in plasma and serum. However, other analytical methods, such as gas and liquid chromatography, capillary electrophoresis and chemiluminescence have also been applied [3]. However, the simplicity, rapidity and cost-effectiveness of the batch Griess assay encourage attempts to improve its dependability, especially for use on large population in clinical studies [5].

The extensive use of the Griess method presents advantages in comparison to other methodologies in NO evaluation as it is simple, inexpensive and does not require expensive equipment [3]. Thus, our aim was to describe an automated technique for measurement of serum NO_x by the modified Griess method using the Cobas Mira (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) clinical chemistry analyzer.

* Corresponding author. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 32208018.

E-mail address: rnmoresco@yahoo.com.br (R.N. Moresco).

Materials and methods

The chemicals used were as follows: sodium nitrate, vanadium (III) chloride (VCl_3), sulphanilamide and N-(1-naphthyl)ethylenediamine (NED) were purchased from Sigma, and orthophosphoric acid and chloride acid was purchased from Vetec (Brazil). Solutions of sodium nitrate were prepared in distilled/deionized water at the following concentrations: 2.0, 20.0, 40.0, 80.0, 120.0 and 200.0 $\mu\text{mol/L}$ for development of the calibration curve. The reduction of nitrate to nitrite was performed with the VCl_3 0.08%. Griess reagent was composed of mixture of sulphanilamide 2%, NED 0.2% and orthophosphoric acid in distilled/deionized water. Sulfanilamide reacts with the nitrite in the sample to form a diazonium salt which reacts with the NED to produce the purple-azo-dye product with a peak absorbance at 540 nm [4]. In addition other wavelengths in the range 520–590 nm can be used because the absorbance readings show only slight differences in this range [5].

NO_x was measured by the modified Griess method using the Cobas Mira automated analyzer as follows: 50 μL of sample was pipetted into the reaction cuvette and 50 μL of VCl_3 was added to reduce nitrate to nitrite after 25 s. Thus, 50 μL of Griess reagent was added. The mixture sample/ VCl_3 /Griess reagent was incubated for 20 min and read at 550 nm. All incubations were at 37 °C and results were expressed in $\mu\text{mol/L}$. Imprecision was studied using two controls at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$. The intra-assay (within-run) precision was assessed with 10 replicate assays of each control in two analytical runs. Inter-assay (between-run) precision was assessed by analyzing duplicate assays for each of the two controls on four different days. Accuracy of the method was determined by replicate analysis using five determinations of four concentration levels of standard solution of sodium nitrate (10, 45, 90, 150 $\mu\text{mol/L}$) added to serum samples within a single run. Instrument carry-over was assessed using 10 replicate assays of the two controls (control 1: 50 $\mu\text{mol/L}$ and control 2: 100 $\mu\text{mol/L}$) run repeatedly in the following sequence (control 1, control 2, control 1, control 2...) within a single analytical run.

NO_x concentrations were measured in 158 healthy volunteers (mean age \pm SD, 48.6 \pm 12.4 years), 70 men and 88 women, recruited from Santa Maria city, Rio Grande do Sul, Brazil. Blood samples were collected from subjects after an overnight fast into Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes no anticoagulant. Specimens were centrifuged at 2500g for 15 min. Serum samples were deproteinized by adding 1/20th volume of zinc sulfate (300 g/L) to give a final concentration of 15 g/L. Deproteinization is essential to avoid interferences in spectrophotometer readings and to eliminate artifactually high results in a significant proportion of samples [3,7]. After centrifugation at 10,000g for 5 min at room temperature, samples were analyzed by the modified Griess assay using the Cobas Mira automated analyzer. This study protocol was approved by the Local Research Ethics Committee (registration number: 0198.0.243.000-09). Statistical analysis was performed by linear regression using Statistica 6.0 software (StatSoft, Inc., USA).

Results

The automated technique for measurement of serum NO_x by the modified Griess method using Cobas Mira analyzer was linear ($r^2 = 0.993$, $P < 0.001$), as shown in Fig. 1. The regression equation was $y = 0.0004x + 0.0526$. This method was linear at a concentration range from 2.0 to 200.0 $\mu\text{mol/L}$. This method has a lower limit of quantitation (LLOQ) of 2.0 $\mu\text{mol/L}$, and LLOQ was determined by replicate analysis using five determinations at this concentration. The intra-assay coefficients of variation (CVs) were 8.3% at 50 $\mu\text{mol/L}$ and 9.1% at 100 $\mu\text{mol/L}$. Inter-assay CVs were 3.8% at 50 $\mu\text{mol/L}$ and 7.4% at 100 $\mu\text{mol/L}$. Accuracy of the method was determined by recovery test. The mean recovery was 114.6%, showing that the method was accurate. A possible contamination between specimens during

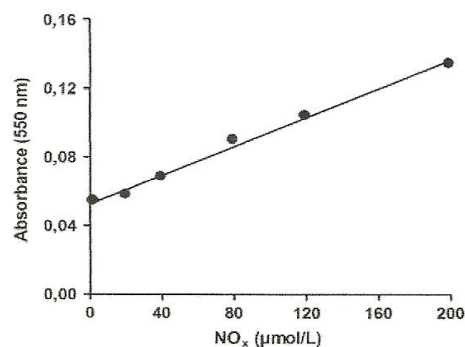


Fig. 1. Linear regression for measurement of serum nitrite/nitrate (NO_x) by the modified Griess method using Cobas Mira analyzer ($r^2 = 0.993$, $P < 0.001$).

analysis was assessed by carry-over. The within-run CV was 4.7% for the control 1 (50 $\mu\text{mol/L}$) and 9.5% for the control 2 (100 $\mu\text{mol/L}$) compared to 8.3% and 9.1% of within-run precision study results. The similarity of results between these two studies indicates that there is no instrument carry-over effect. Serum NO_x in healthy subjects were 116.2 ± 53.4 $\mu\text{mol/L}$.

Discussion

We recently described a simple, fast and inexpensive automated technique for measurement of plasma nitrite [8]. However, some authors reported that the determination of nitrite alone as a marker for NO radical formation is meaningless [7]. Nitrite in whole blood is rapidly oxidized to nitrate by hemoglobin in erythrocytes. Consequently, considering the time interval between blood withdrawal and plasma preparation in most medical centers, nitrite will not be detectable in most plasma samples [7]. Thus, the use of NO_x is a more reliable marker than the nitrite [7]. Although the NO_x measurement has already been previously described, to our knowledge, this is the first report to describe an automated technique for measurement of serum NO_x by the modified Griess method using the Cobas Mira clinical chemistry analyzer.

The present study reported a simple, inexpensive, precise and accurate automated technique for measurement of serum NO_x . Many factors influence formation, stability and the reaction fate of diazonium ions, intermediates and azo, dyes in the Griess reaction. These factors are as follows: (a) relative concentration of sulfanilamide and NED; (b) reactions of nitrite with the sulfanilamide and NED; (c) formation of more than one pigment; (d) oxidation of the diazonium ion intermediate and the azo dye; (e) reduction of the diazonium ion; (f) formation of semi stable nitroso-reductant intermediates; (g) pre-reaction of sulfanilamide with nitrite; and (h) pH values between 2.5–3.5 [9]. One important mechanism to monitor the overall reliability of the Griess assays is the use of a quality control (QC) system. However, in practice the analysis of QC samples in parallel to study samples is very rare. Therefore, the establishment of QC systems and co-processing of QC samples for nitrite and nitrate in clinical studies is absolutely essential [9].

The NO_x values produced by the Griess method are less reliable than results given by other methods and many pre-analytical factors remain to be clarified. However, this method is easy and applicable to the daily routine [4]. Nevertheless, NO metabolites measured by the Griess method have shown a good correlation with GC-MS [1]. In conclusion, serum NO_x measured by the modified Griess method can be applied easily to the Cobas Mira clinical chemistry analyzer and this simple and inexpensive automated technique is applicable in daily routine laboratory for assessing and monitoring inflammatory

process, oxidative stress and endothelial dysfunction in several clinical conditions.

Conflicts of interest statement

None of the authors have conflicts of interest to declare.

References

- [1] Asl AZ, Ghasemi A, Azizi F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2008;41:1342–7.
- [2] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapide, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001;5:62–71.
- [3] Dusse LMSA, Silva RMM, Vieira LM, Carvalho MG. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? *Clin Chim Acta* 2005;362:195–7.
- [4] Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess Method. *Nitric Oxide* 2002;6:178–85.
- [5] Romitelli F, Santini AS, Chierici E, Pitocco D, Tavazzi B, Amorini AM, et al. Comparison of nitrate/nitrite concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851:257–67.
- [6] Larsen TL, Nilsen V, Andersen DO, Francis G, Rustad P, Mansoor MA. Comparison of high-pressure liquid chromatography (HPLC) and Griess reagent-spectroscopic methods for the measurement of nitrate in serum from healthy individuals in the Nordic countries. *Clin Biochem* 2008;41:1474–81.
- [7] Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892–6.
- [8] Pereira RS, Piva SJ, Tatsch E, Kober H, Gomes P, Oliveira JR, et al. A simple, fast and inexpensive automated technique for measurement of plasma nitrite. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1837–9.
- [9] Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B* 2007;851:51–70.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi descrito e validado um método analítico automatizado capaz de detectar os níveis séricos de NOx através da técnica de Griess modificada. Este método foi adaptado ao sistema automatizado Cobas Mira[®] sendo linear, preciso, exato, simples e aplicável na prática diária do laboratório clínico, sendo útil para avaliar o estresse oxidativo, a disfunção endotelial, bem como o processo inflamatório, que podem estar envolvidos em várias desordens patológicas. Embora a mensuração dos níveis de NOx já tenha sido descrita anteriormente (MOSHAGE et al., 1995; MIRANDA et al., 2001; ROMITELLI et al., 2007), para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que desenvolveu e validou um método automatizado para a quantificação dos níveis séricos de NOx adaptado ao sistema automatizado Cobas Mira[®]. O protocolo de automação desenvolvido neste estudo pode ser facilmente adaptado a outros sistemas automatizados disponíveis em laboratórios clínicos de rotina, possibilitando a análise dos níveis de NOx.

A baixa concentração, a meia-vida curta em fluídos biológicos e a alta reatividade com outras moléculas, tais como o oxigênio, grupos sulfidril, entre outros, são as principais barreiras para a mensuração direta do NO (TARPEY e FRIDOVICH, 2001). Sendo assim, a determinação quantitativa dos níveis de NO₂⁻ e NO₃⁻, metabólitos estáveis do NO, nos fluídos biológicos, é a forma mais adequada para avaliar a síntese de NO *in vivo* (TSIKAS, 2007). O método de Griess é recomendado para a quantificação dos níveis de NOx devido a sua facilidade, rapidez, baixo custo (R\$ 0,15 por teste) e sensibilidade, quando comparado a outros métodos (RICART-JANÉ et al., 2002).

Métodos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), fluorimetria, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), quimioluminescência, ressonância magnética e detecção eletroquímica através de sensores intravasculares são algumas técnicas empregadas para a detecção de NOx em amostras biológicas (MIRANDA et al., 2001). Porém, estas são metodologias que apresentam um custo mais elevado, com procedimentos fastidiosos e que requerem pessoal de laboratório especializado para operar os equipamentos (DUSSE et al., 2005). Embora a reação colorimétrica de Griess seja menos sensível do que estes outros métodos, ela apresenta algumas vantagens,

como simplicidade, adequação às análises de rotina para o processamento de um grande número de amostras (BRYAN e GRISHAM, 2007) e uma boa correlação com CG-MS (RICART-JANÉ et al., 2002; ASL et al., 2008). Porém, alguns parâmetros analíticos tais como linearidade, precisão e exatidão, devem ser estabelecidos para otimizar o uso da técnica colorimétrica de Griess na prática clínica. Com base nisso, este trabalho avaliou estes e outros parâmetros analíticos a fim de inserir a mensuração dos níveis de NOx como um marcador útil e confiável na rotina laboratorial, bem como validar um método automatizado para sua dosagem.

Neste trabalho foi descrito e validado um método automatizado no analisador Cobas Mira[®], sendo baseado nas recomendações da ANVISA e do EMEA. Segundo estes órgãos de validação, alguns dos parâmetros que devem ser avaliados são: linearidade, exatidão, precisão e contaminação. Foi observado, neste estudo, que a quantificação dos níveis séricos de NOx através do método automatizado proposto foi linear na faixa de 2,0 a 200,0 µmol/L, demonstrando que as amostras de soro podem ser quantificadas dentro deste intervalo de valores. Segundo a ANVISA (2003) e o EMEA (2011), o critério mínimo aceitável do coeficiente de regressão linear (r^2) deve ser igual a 0,99, corroborando com o valor de r^2 obtido neste estudo, que foi de 0,99.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (ANVISA, 2003; EMEA, 2011). Foi realizada a precisão intra-ensaio para padrões de nitrato de sódio (NaNO₃) nas concentrações de 50 e 100 µmol/L, obtendo os CVs de 8,3 e 9,1%, respectivamente. Para a precisão inter-ensaio os CVs foram 3,8 e 7,4% para os mesmos padrões. Sendo assim, este método demonstrou ser preciso e reprodutível. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno na faixa de 80 a 120% são desejáveis (ANVISA, 2003; EMEA, 2011). No nosso método proposto, foi observado uma recuperação de 114,6%, demonstrando este ser exato.

A possível contaminação entre as amostras durante a análise foi avaliada através do teste de contaminação (*carry-over*). O CV intra-ensaio foi de 4,7% para o controle de 50 µmol/L e 9,5% para o controle de 100 µmol/L, em comparação com 8,3% e 9,1% dos resultados intra-ensaio através da análise de precisão. A semelhança destes resultados indicou que o carreamento entre as amostras foi o

menor possível, não ocorrendo contaminação entre as amostras analisadas. Em um estudo anterior, os níveis séricos de NOx em pacientes saudáveis obtidos através do método de Griess foi de 89,54 $\mu\text{mol/L}$ (GÖÇMEN et al., 2008), valores próximos ao do nosso estudo, que foi de $116,2 \pm 53,4 \mu\text{mol/L}$. Alguns fatores pré-analíticos podem alterar os valores dos metabólitos do NO avaliados pelo método de Griess, sendo importante o esclarecimento destes. Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, foi avaliado a influência de diferentes anticoagulantes e do armazenamento a -20°C por quatro meses, sobre os níveis de NO_2^- , sendo estes mensurados em amostras de soro e plasma pelo método de Griess. Através deste estudo foi possível concluir que os tipos de amostras utilizados (soro ou plasma) e de anticoagulante utilizado na coleta não influenciaram significativamente os níveis de NO_2^- , independentemente de esta dosagem ser realizada em amostras frescas ou mantida a -20°C pelo período de quatro meses (ANEXO I).

Assim, níveis séricos de NOx medido pelo método de Griess podem ser facilmente aplicados ao analisador químico Cobas Mira[®] e os resultados do ensaio são considerados confiáveis por serem precisos e exatos. Portanto, esta técnica simples, com baixo-custo e automatizada é aplicável na prática diária em laboratórios clínicos para avaliar parâmetros como, estresse oxidativo, processo inflamatório em várias condições clínicas. Devido a importante função desempenhada pelo NO em várias patologias como hipertensão arterial, aterosclerose, diabetes *mellitus*, acidente vascular cerebral, desordem do sistema nervoso central, entre outras, é de suma importância a mensuração dos níveis séricos de NOx a fim de elucidar o real envolvimento deste biomarcador na fisiopatologia destas doenças, através de métodos simples, automatizados e de baixo-custo.

6. CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido e validado um método analítico automatizado para a mensuração dos níveis séricos de NO_x, sendo este adaptado ao analisador Cobas Mira[®].
- O método automatizado desenvolvido foi linear, preciso e exato.
- Este estudo propiciou um protocolo automatizado para a quantificação dos níveis de NO_x, podendo este ser aplicado a rotina de laboratórios clínicos.
- O protocolo de automação desenvolvido neste estudo pode servir de base para ser adaptado a outros sistemas automatizados disponíveis em laboratórios clínicos de rotina, possibilitando a análise dos níveis de NO_x.
- Foi sugerido um valor médio para valores de níveis séricos de NO_x em uma população saudável.
- Este trabalho pode servir de base para outros estudos que abordem os fatores pré-analíticos que podem alterar os valores dos metabólitos do NO avaliados pelo método de Griess.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA, American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 27, s. 1, p. S5-S10, 2004.

AHMED N. Advanced glycation end products role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

AIRD, W. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Blood**, v. 101, p. 3765-3777, 2003.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, p. 593-615, 2001.

ALEXANDER, R.W. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. **Hypertension**, v. 25, p. 155-161, 1995.

ANDERSON, T.J. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. **J Am Coll Cardiol**, v. 34, p. 631-637, 1999.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos através da revogação do RE- nº 475 publicada no D.O.U. 19 de março de 2002. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de Junho, 2003.

ASL, A.Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clin Biochem**, v. 41, p. 1342-1347, 2008.

AVOGARO, A.; FADINI, G.P.; GALLO, A. et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 16, p. S39-S45, 2006.

AYDIN, A.; ORHAN, H.; SAYAL, A. et al. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type 2 diabetes *mellitus*: effects of glycemic control. **Clin Biochem**, v. 34, p. 65-70, 2001.

BECKMAN, J.A.; GOLDFINE, A.B.; GORDO, M.B. et al. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. **Circulation**, v. 103, p. 1618-1623, 2001.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BRYAN, N.S.; GRISHAM, M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med**, v. 43, p. 645-657, 2007.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz Fundamentos de Química Clínica**, 6° edição, Rio de Janeiro, ed: Elsevier, 2008.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 268, n. 12, p. 8410-8413, 1993.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, v. 87, p. 840-844, 2000.

CAPELLINI, V.K.; CELOTTO, A.C.; BALDO, C.F. et al. Diabetes and vascular disease: basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 8, p. 526-544, 2010.

CHILTON, R.; WYATT, J.; NANDISH, S. et al. Cardiovascular comorbidities of type 2 diabetes mellitus: defining the potential of glucagonlike peptide-1-based therapies. **Am J Med**, v. 124, p. S35-S53, 2011.

CHO, H.J.; XIE, Q.W.; CALYCAJ, J. et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **J Exp Med**, v. 176, p. 599-604, 1992.

CHRISTODOULOU, D.; KUDO, S.; COOK, J.A. Electrochemical methods for detection of nitric oxide. **Methods Enzymol**, v. 268, p. 69-83, 1996.

COGGINS, M.P.; BLOCH, K.D. Nitric oxide in the pulmonary vasculature. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, p. 1877-1885, 2007.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 19-26, 2002.

CRAIG, M.E.; HATTERSLEY, A.; DONAGHUE, K.C. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v. 10, s. 12, p. 3-12, 2009.

CREAGER, M.A.; LÜSCHER, T.F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: party I. **Circulation**, v. 108, p. 1527-1532, 2003.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide neurotoxicity. **J Chem Neuroanat**, v. 10, p. 179-190, 1996.

DEANFIELD, J.E.; HALCOX, J.P.; RABELINK, T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, p. 1285-1295, 2007.

DINARELLO, C.A. Pathogenesis of septic shock cytokines as mediators in the proinflammatory and anti-inflammatory. **Chest**, v. 112, p. 321S-329S, 1997.

DU, X.L.; EDELSTEIN, D.; DIMMELER, S. et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. **J Clin Invest**, v. 108, p. 1341-1348, 2001.

DUNCAN, A.J.; HEALES, S.J.R. Nitric oxide and neurological disorders. **Mol Aspects Med**, v. 26, p. 67-96, 2005.

DUSSE, L.M.S.A.; SILVA, R.M.M.; VIEIRA, L.M. et al. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? **Clin Chim Acta**, v. 362, p. 195-197, 2005.

ELLIS, G.; ADATIA, I.; YAZDANPANA, M. et al. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. **Clin Biochem**, v. 31, p. 195-220, 1998.

EMA. European Medicines Agency. Guideline on Validation of Bioanalytical methods (DRAFT) 2011.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **J Pharm Biomed Anal**, v. 24, p. 755-767, 2001.

ERUSALIMSKY, J.D.; MONCADA, S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. **Atheroscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, p. 2524-2531, 2007.

EVANS, J.L.; GOLDFINE, I.D.; MADDUX, B.A. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v. 23, n. 5, p. 599-622, 2002.

FAIRCHILD, K.D.; O' SHEA, M. Heart rate characteristics: physiologic markers for detection of late-onset neonatal sepsis. **Clin Perinat**, v. 37, n. 3, p. 581-598, 2010.

FINKEL, F.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FONSECA, V. The role basal insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. **Insulin**, v. 1, n. 2, p. 51-60, 2006.

FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S. et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, p. 1121-1131, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, doi:10.1093/eurheartj/ehr304, 2011.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K. et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacol Ther**, v. 100, n. 2. p. 171-194, 2003.

FUKUMOTO, H.; NAITO, Z.; ASANO, G. et al. Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. **J Atheroscler Thromb**, v. 5, p. 29-35, 1998.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.Y. et al. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 12, p. 1264-1275, 2002.

GIULIVI, C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. **Free Radic Biol Med**, v. 34, p. 397-408, 2003.

GÖÇMEN, A.Y.; SAHIN, E.; KOÇAK, H. Levels of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide and lipid peroxidation markers in patients with end-stage renal disease having peritoneal dialysis treatment. **Clin Biochem**, v. 41, p. 836-840, 2008.

GOMES, M.Z.; BEL, E.A. Effects of electrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase diphosphatase. **Brain Res Bull**, v. 62, p. 107-115, 2003.

GROSS, S.S.; WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanism. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 737-769, 1995.

GUEVARA, I.; IWANEJKO, J.; DEMBIN´SKA-KIEC, A. et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clin Chim Acta**, v. 274, p. 177-188, 1998.

HACKAM, G.D.; ANAND, S.S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA**, v. 290, p. 932-940, 2003.

HART, M.C. Nitric oxide in adult lung disease. **Chest**, v. 115, p. 1407-1417, 1999.

HEINECKE, J.W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. **Arteriosclerosis**, v. 141, p. 1-15, 1998.

HENEKA, M.T.; WIESINGER, H.; DUMITRESCU-OZIMEK, L. et al. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 60, n. 9, p. 906-916, 2001.

HOESEL, L.M.; WARD, P.A. Mechanisms of inflammatory response syndrome in sepsis. **Drug Discov Today**, v. 3, n.1, p. 345-350, 2004.

HSICH, E.; SEGAL, B.H.; PAGANO, P.J. et al. Vascular effects following homozygous disruption of p47(phox): An essential component of NADPH oxidase. **Circulation**, v. 101, p. 1234-36, 2000.

ICH. Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2 (R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

KANEKI, M.; SHIMIZU, N.; YAMADA D. et al. Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, p. 319-329, 2007.

KANWAR, J.R.; KANWAR, R.K.; BURROW, H. et al. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. **Curr Med Chem**, v. 16, p. 2373-2394, 2009.

KAVYA, R.; SALUJAB, R.; SINGHB, S. et al. Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implications in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 280-294, 2006.

KIECHLE, F.L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **Am J Clin Pathol**, v. 100, p. 567-575, 1993.

KOJIMA, H.; HIROTANO, M.; NAKATSUBO, N. Bioimaging of nitric oxide with fluorescent indication based on the rhodamine chromophore. **Anal Chem**, v. 73, n. 9, p. 1967-1973, 2001.

KUBIAK, B.D.; ALBERT, S.P.; GATTO, L.A. et al. Peritoneal negative pressure therapy prevents multiple organ injury in a chronic porcine sepsis and ischemia/reperfusion model. **Shock**, v. 34, n. 5, p. 525-534, 2010.

LEOPOLD, J.A.; LOSCALZO, J. Oxidative mechanism and atherothrombotic cardiovascular disease. **Drug Discov Today Ther Strateg**, v. 5, p. 5-13, 2008.

LIBBY, P. Inflammation and atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.

LIPTON, S.A.; CHOI, Y.B.; PAN, Z.H. et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, v. 364, p. 626-632, 1993.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-241, 2000.

MALO-RANTA, V.; YLÄ-HERTTUALA, S.; METSÄ-KETALA, A. Nitric oxide donor GEA3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. **FEBS Lett**, v. 337, p. 179-83, 1994.

MARSHALL, H.E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J.S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J**, v. 14, p. 1889-1900, 2000.

McDONALD, R.D. The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. **Anal Chim Acta**, v. 391, p. 149-158, 1999.

MARTÍNEZ, M.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanism and potential significance in health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, p. 669-702, 2009.

MELIKIAN, N.; SEDDON, M.D.; CASADEI, B. et al. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. **Trends Cardiovasc Med**, v.19, p. 256–262, 2009.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: Which, where, how and why? **J Clin Invest**, v. 100, p. 2146-2152, 1997.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 62-71, 2001.

MOILANEN, E.; VAPPATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann Med**, v. 27, p. 359-367, 1995.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-Arginine nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 27, p. 2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clin Chem**, v. 41, n. 6, p. 892-896, 1995.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Arch Pharm Res**, v. 32, n. 8, p. 1103-1108, 2009.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J**, v. 6, p. 3051-3064, 1992.

NATHAN, C.F.; HIBBS, J.B. Role of nitric oxide synthases in macrophage antimicrobial activity. **Curr Opin Immunol**, v. 3, p. 65-70, 1991.

NEDIANI, C.; RAIMONDI, L.; BORCHI, E. et al. Nitric oxide/reactive oxygen species generation and nitroso/redox imbalance in heart failure: from molecular mechanism to therapeutic implication. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, p. 289-331, 2011.

NETEA, M.G.; MEER, J.W.M.; DEUREN, M. et al. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends in Immunol**, v. 24, n. 5, p. 254-258, 2003.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, XL. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787-790, 2000.

OTT, C.; SCHNEIDER, M.P.; DELLES, C. et al. Reduction in basal nitric oxide activity causes albuminuria. **Diabetes**, v. 60, p. 572-576, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, p. 315-324, 2007.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, v. 288, p. 481-87, 1991.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M.D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide**, v. 6, n. 2, p. 178-185, 2002.

ROBERTS, C.K.; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci**, v. 84, p. 705-712, 2009.

RODRIGO, R.; FELIPO, V. Brain regional alteration in the modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in liver cirrhosis. Role of hyperammonemia and cell types involved. **Neurochem Int**, v. 48, p. 472-477, 2006.

ROLO, A.P.; PALMEIRA, C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 212, p. 167-178, 2006.

ROMITELLI, F.; SANTINI, S.A. CHIERIEI, E. et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and sérum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 851, p. 257-267, 2007.

ROSENSON, R.S. Statin in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 1-12, 2004.

RUSSEL, J.A. Management of sepsis. **N Engl J Med**, v. 355, p. 1699-1713, 2006.

SCALIA, R.; APPEL, J.Z.; LEFER, A.M. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, p. 1093-1100, 1998.

SCHLEICHER, E.; FRIESS, U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. **Kidney Int**, v. 72, p. S17-S26, 2007.

SMITH, M.A.; RICHEY HARRIS, P.L.; SAYRE, L.M. et al. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 17, n. 8, p. 2653-2657, 1997.

SMYTHE, G.A.; MATANOVIC, G.; YI, D. Trifluoroacetic anhydride-catalyzed nitration of toluene as an approach to the specific analysis of nitrate by gas chromatography-mass spectrometry. **Nitric oxide**, v. 3, n. 1, p. 67-74, 1999.

SONADA, M.J.; KOBAYASYI, J.; TAKEZAWA, M. et al. Na assay method for nitric oxide-related compounds in whole blood. **Anal Biochem**, v. 247, p. 421-427, 1997.

STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interaction with nitric oxide. **Cell**, v. 78, p. 931-936, 1994.

STEINERT, J.R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I.D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **Neuroscientist**, v. 16, p. 435-452, 2010.

STUEHR, D.; POU, S.; ROSEN, G.M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **J Biol Chem**, v. 276, p. 14533-14536, 2001.

SUZUKI, L.A.; POOT, M.; GERRITY, R.G. et al. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. **Diabetes**, v. 50, p. 851-860, 2001.

SZABO, C.; LIAUDET, L.; SORIANO, F.G. Biology of nitric oxide signaling. **Crit Care Med**, v. 28, p. 37-52, 2000.

TAHA, Z.H. Nitric oxide measurements in biological samples. **Talanta**, v. 61, p. 3-10, 2003.

TARPEY, M.; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. **Circ Res**, v. 89, p. 224-236, 2001.

TESSARI, P.; CECCHET, D.; COSMA, A. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. **Diabetes**, v. 59, n. 9, p. 2152-2159, 2010.

TODA, N.; IMAMURA, T.; OKAMURA, T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. **Pharmacol Ther**, v. 127, p. 189-209, 2010.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. **J Hypertens**, v. 27, p. 1929-1940, 2009.

TOGASHI, H.; SAKUMA, I.; YOSHIOKA, M. et al. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 262, p. 343-347, 1992.

TSIKAS, D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 72, p. 4064-4072, 2000.

TSIKAS, D.; GUTZKI, F.M.; SANDMANN, J. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of human plasma and urinary nitrate after its reduction to nitrite and derivatization to the pentafluorobenzyl derivative. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 20, p. 285-291, 1999.

TUTEJA, N.; CHANDRA, M.; TUTEJA, R. et al. Nitric oxide as a unique bioactive signaling Messenger in physiology and pathophysiology. **J Biomed Biotechnol**, v.4, p. 227-237, 2004.

VANHOUTTE, P.M. Vascular biology: old-timer makes a comeback. **Nature**, v. 396, p. 213-216, 1998.

VICENT, J.L.; MARTINEZ, E.O.; SILVA, E. Evolving concepts in sepsis definition. **Crit Care Clin**, v. 25, n. 2, p. 665-675, 2009.

WALSH, M.C. Moving from oficial to traceable methods. **Trends Analyt Chem**, v. 18, p. 616-623, 1999.

WINK, D.A.; KASPRZAK, K.S.; MARAGOS, C.M. et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. **Science**, v. 254, p. 1001-1003, 1991.

YAMAGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, N.; KAGOTA, S. et al. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 380-386, 2006.

YOON, S.; MOON, J.; SHIN, C. et al. Smoking status-dependent association of the 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial nitric oxide synthase gene with plasma nitric oxide concentrations. **Clin Chim Acta**, v. 324, p. 113-120, 2002.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endotelial dysfunction. **Basic Res Cardiol**, v. 103, n. 5, p. 398-406, 2008.

ZHANG, L.; DAWSONA, V.; DAWSONA, T.M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacol Ther**, v. 109, p. 33-41, 2006.

ZHOU, L.; ZHU, D. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications, **Nitric oxide**, v. 20, p. 223-230, 2009.

ANEXO I

J Bras Patol Med Lab • v. 47 • n. 2 • p. 147-150 • abril 2011

COMUNICAÇÃO BREVE
BRIEF COMMUNICATION**Influência dos anticoagulantes e da temperatura de armazenamento sobre os níveis sanguíneos de nitrito**Primeira submissão em: 25/11/10
Última submissão em: 01/03/11
Aceite para publicação em: 02/03/11
Publicação em: 20/04/11*Effects of anticoagulants and storage temperature on blood nitrite levels*Etiane Tatsch¹; Guilherme Vargas Bochi²; Renata da Silva Pereira¹;
Helena Kober³; Jarbas Rodrigues de Oliveira⁴; Rafael Noal Moresco⁵

unitermos	resumo
Óxido nítrico	A mensuração dos metabólitos do óxido nítrico pode ser útil para a melhor compreensão de diferentes processos fisiopatológicos. Este estudo avaliou a influência de diferentes anticoagulantes (ácido etilenodiaminotetracético [EDTA], citrato e heparina) e do armazenamento a -20°C por quatro meses sobre os níveis de nitrito, sendo estes mensurados em amostras de soro e plasma pelo método de Griess. Os tipos de amostra utilizados (soro ou plasma) e de anticoagulante usado na coleta não influenciaram significativamente os níveis de nitrito, independentemente de as dosagens serem realizadas em amostras frescas ou naquelas mantidas a -20°C por quatro meses.
Nitrito	
Reagente de Griess	
Estabilidade	
Anticoagulantes	
Armazenamento	

abstract**key words**

The measurement of nitric oxide metabolites may be useful for better understanding of different physiopathological processes. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of different anticoagulants (EDTA, citrate and heparin) and four-month storage at -20°C on nitrite levels. The serum and plasma samples were analyzed by using the Griess method. The type of sample (serum or plasma) or anticoagulant used in the collection did not influence on nitrite levels significantly, regardless the fact they were fresh or four-month samples stored at -20°C.

*Nitric oxide
Nitrite
Griess reagent
Stability
Anticoagulants
Storage*

1. Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
2. Aluno de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde da UFSM.
3. Pesquisadora do Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSM.
4. Professor titular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS); coordenador do Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação da PUCRS.
5. Professor adjunto do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSM.

Introdução

O óxido nítrico (NO) possui funções metabólicas altamente ativas, principalmente na regulação das atividades cardiovasculares. O NO formado nas células endoteliais promove vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, inibição da agregação e da adesão plaquetária, redução da migração e adesão leucocitária e diminuição da proliferação de células musculares lisas⁽²⁾. Assim, todas essas funções desempenhadas pelo NO contribuem para a prevenção da aterosclerose⁽⁷⁾. Alguns fatores de risco para aterosclerose, como a dislipidemia, obesidade, diabetes *mellitus* e hipertensão arterial, podem estar especificamente associados a anormalidades da vasodilatação endotelial mediada pelo NO, ocasionando vasoconstrição, agregação plaquetária, adesão de neutrófilos para o endotélio, redução da luz dos vasos e, em última instância, isquemia dos tecidos⁽¹⁾.

Embora o NO seja uma molécula importante na manutenção cardiovascular, trata-se de um radical livre, sendo que sua síntese exacerbada está relacionada com vários processos patológicos⁽⁵⁾. Sabe-se que, na presença de ânions superóxidos liberados por macrófagos, o NO é metabolizado à peroxinitrito, causando dano celular. Portanto é possível observar que, em situações de estresse oxidativo, o efeito benéfico do NO é suprimido, ocorrendo o impedimento de suas ações fisiológicas no endotélio vascular. Assim, no estágio avançado de aterosclerose, percebem-se uma redução dos níveis de NO e um aumento de sua decomposição em peroxinitrito⁽⁴⁾.

Devido à importante função desempenhada pelo NO, torna-se relevante a mensuração de seus níveis nos tecidos biológicos a fim de elucidar o seu real envolvimento nas doenças cardiovasculares e, talvez, atuar como um possível marcador para aterosclerose⁽⁷⁾. A determinação indireta do NO pode ser realizada por dosagem plasmática ou urinária dos seus metabólitos nitrato e nitrito, sendo que o método frequentemente utilizado na mensuração desses íons baseia-se na reação de Griess⁽²⁾. Os valores de nitrito obtidos pela reação de Griess podem sofrer influências de acordo com o tipo de anticoagulante utilizado na coleta⁽⁹⁾. Desta forma, este trabalho visa avaliar a influência de algumas variáveis pré-analíticas como o tipo de anticoagulante utilizado na colheita e a temperatura de armazenamento da amostra sobre os níveis sanguíneos de nitrito mensurados pelo método de Griess automatizado.

Métodos

Para a análise dos níveis de nitrito, foram coletadas amostras de sangue pela técnica padrão de punção venosa de 10 indivíduos saudáveis adultos e de ambos os sexos. Essas amostras foram transferidas para tubos a vácuo (Vacutainer®, BD Diagnostics, EUA) sem anticoagulante e para tubos contendo os anticoagulantes heparina, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e citrato de sódio a 3,2%. As amostras coletadas foram rotineiramente centrifugadas a 2.800 rpm por 15 minutos para a separação das amostras de soro e plasma. A quantificação dos níveis de nitrito foi realizada nas amostras dentro de, no máximo, 2 horas após a colheita, sendo as dosagens realizadas em triplicata. Depois, as amostras foram armazenadas à temperatura de -20°C por quatro meses, sendo que, ao término desse período, foram realizadas novamente as dosagens de nitrito. Os sujeitos com diabetes *mellitus*, histórico de doenças cardíacas, acidente vascular cerebral (AVC) ou com processos inflamatórios agudos ou crônicos foram excluídos do estudo. Este protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (Processo nº 0198.0.243.000-09) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os níveis de nitrito foram mensurados nas amostras de soro e plasma pelo método de Griess adaptado ao sistema automatizado Cobas Mira® (Roche Diagnostics) previamente padronizado e validado em nosso laboratório⁽⁸⁾. Nesta técnica, 30 µl de amostra são pipetados para a cubeta de reação, sendo posteriormente adicionados 150 µl do reagente de Griess [sulfanilamida a 2%, N-(1-naftil) etilenodiamina a 0,2% e ácido ortofosfórico em água destilada/deionizada]. A mistura amostra/reagente de Griess é incubada por 300 segundos e a leitura, realizada em 550 nm. Todas as incubações são realizadas a 37°C e os resultados são expressos em µmol/l. Esta técnica apresenta coeficiente de variação (CV) intraensaio de 6,3% e interensaio de 5,7%, além de limite de detecção de 2,5 µmol/l e linearidade até 80 µmol/l.

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão, sendo analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey, além do teste *t* de Student para amostras pareadas, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Os indivíduos avaliados nesse estudo tinham idade de $29,8 \pm 5,1$ anos. Os níveis de nitrito obtidos nas amostras recém-colhidas (frescas) foram: $12,61 \pm 3,97 \mu\text{mol/l}$ (soro), $11,64 \pm 3,68 \mu\text{mol/l}$ (plasma-EDTA), $10,2 \pm 3,57 \mu\text{mol/l}$ (plasma-citrato) e $12,25 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$ (plasma-heparina), sendo que essas diferenças não foram estatisticamente significativas, conforme apresentado na **Figura**. Os níveis de nitrito obtidos nas amostras mantidas armazenadas a -20°C por quatro meses foram: $14,03 \pm 6,36 \mu\text{mol/l}$ (soro), $12,21 \pm 6,43 \mu\text{mol/l}$ (plasma-EDTA), $11,18 \pm 7,1 \mu\text{mol/l}$ (plasma-citrato) e $10,7 \pm 5,18 \mu\text{mol/l}$ (plasma-heparina), mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Além disso, quando realizadas comparações pareadas para cada tipo de amostra (soro ou plasma) nas duas condições testadas (frescas e mantidas a -20°C durante quatro meses), não houve diferença estatisticamente significativa, o que indica que o analito manteve-se estável e que pode ser mensurado em amostras armazenadas durante quatro meses a -20°C , independentemente do tipo de amostra utilizada.

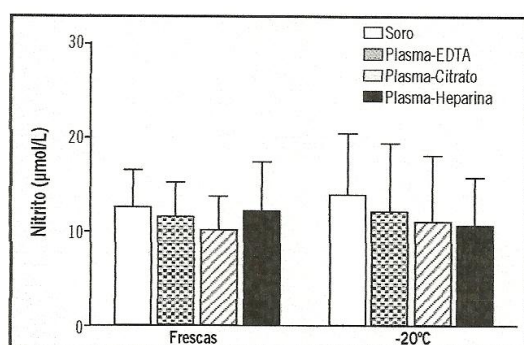


Figura – Níveis de nitrito obtidos nas amostras de soro e plasma recém-colhidas (frescas) e nas amostras mantidas a -20°C pelo período de quatro meses

Discussão

O presente estudo baseou-se na determinação indireta do NO pela quantificação dos íons nitrito pelo método de Griess, sendo avaliadas algumas variáveis pré-analíticas, uma vez que este marcador apresenta importante papel na fisiologia de diversas patologias⁽²⁾, principalmente na

regulação das atividades cardiovasculares⁽⁷⁾. Neste estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de nitrito, independentemente do tipo de amostra utilizada (soro e plasma frescos) e do tipo de anticoagulante utilizado (EDTA, citrato e heparina), nem nas amostras mantidas a -20°C pelo período de quatro meses, o que indica que os níveis de nitrito mantiveram-se estáveis. Dessa forma, o nitrito também pode ser mensurado em amostras armazenadas durante quatro meses a -20°C , independente do tipo de amostra utilizada.

Quanto ao tipo de anticoagulante usado na coleta, foi demonstrado que nenhum deles interferiu significativamente nos níveis de nitrito em amostras recém-colhidas nem naquelas mantidas a -20°C pelo período avaliado neste estudo. Alguns estudos sugerem que o EDTA é o melhor anticoagulante em comparação com a heparina e o citrato para a quantificação dos metabólitos do óxido nítrico, sendo o mais usado em rotinas clínicas e experimentais⁽⁹⁾. No entanto, neste estudo conduzido por Ricart-Jané *et al.*, foram determinados simultaneamente os níveis de nitrato e nitrito (NOx) em amostras de plasma, não sendo avaliados os níveis de NOx em amostras de soro⁽⁹⁾. Outros estudos demonstraram que o plasma heparinizado pode formar um precipitado sobre a adição do reagente de Griess, tornando este anticoagulante desfavorável para a análise⁽³⁾. Os metabólitos do óxido nítrico são estáveis a -20°C por um período de um ano no plasma⁽⁶⁾. No entanto, nenhum estudo de estabilidade foi realizado em amostras de soro. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que apresenta uma avaliação preliminar de estabilidade para os níveis de nitrito em amostras de soro.

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que os tipos de amostra utilizados (soro ou plasma) e de anticoagulante usado na coleta (EDTA, citrato ou heparina) não influenciaram significativamente os níveis de nitrito, independentemente de esta dosagem ser realizada em amostras frescas ou mantidas a -20°C pelo período de quatro meses. De qualquer forma, faz-se necessária a realização de estudos adicionais que avaliem um número maior de amostras, bem como outras condições de armazenamento com diferentes temperaturas e períodos.

Referências

1. ARKIN, J. M. *et al.* Relation of cumulative weight burden to vascular endothelial dysfunction in obesity. *Am J Cardiol*, v. 101, n. 1, p. 98-101, 2008.
2. ASL, A. Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clin Biochem*, v. 41, n. 16-7, p. 1342-47, 2008.

3. BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, v. 43, n. 5, p. 645-57, 2007.
4. HSICH, E. *et al.* Vascular effects following homozygous disruption of p47(phox): an essential component of NADPH oxidase. *Circulation*, v. 101, n. 11, p. 1234-6, 2000.
5. KANEKI, M. *et al.* Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*, v. 9, n. 3, p. 319-29, 2007.
6. MOSHAGE, H. *et al.* Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*, v. 41, n. 6, p. 892-6, 1995.
7. NAPOLI, C. *et al.* Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide*, v. 15, n. 4, p. 265-79, 2006.
8. PEREIRA, R. S. *et al.* A simple, fast and inexpensive automated technique for measurement of plasma nitrite. *Clin Chem Lab Med*, v. 48, n. 12, p. 1837-9, 2010.
9. RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide*, v. 6, n. 2, p. 178-85, 2002.

Endereço para correspondência

Rafael Noal Moresco
Centro de Ciências da Saúde, Departamento de
Análises Clínicas e Toxicológicas
Universidade Federal de Santa Maria
Avenida Roraima, 1.000 – Prédio 26, sala 1402
CEP: 97105-900 – Santa Maria-RS
Tel.: (55) 3220-8941
Fax: (55) 3220-8018
E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br