

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

**AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE FATORES
PRÉ-ANALÍTICOS NA MENSURAÇÃO DOS
METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO E
DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE
REFERÊNCIA PARA UMA POPULAÇÃO SAUDÁVEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Taís Corrêa Almeida

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE FATORES PRÉ-
ANALÍTICOS NA MENSURAÇÃO DOS METABÓLITOS DO
ÓXIDO NÍTRICO E DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS
DE REFERÊNCIA PARA UMA POPULAÇÃO SAUDÁVEL**

por

Taís Corrêa Almeida

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas 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

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Patrícia Gomes

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**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


**AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE FATORES PRÉ-ANALÍTICOS
NA MENSURAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO E
DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA UMA
POPULAÇÃO SAUDÁVEL**

elaborada por

Taís Corrêa Almeida

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

COMISSÃO EXAMINADORA



Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UNIFRA)



Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 07 de janeiro de 2014.

Dedico este trabalho:

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais (Vânia e Carlos Rufino), minha irmã (Iasmin) e ao meu noivo (Caio) por todo o incentivo e apoio para que esse sonho pudesse ser concretizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e aos mentores espirituais por guiarem e iluminarem meus caminhos; pela força e persistência necessárias para a construção deste trabalho. Agradeço às oportunidades, amparo e orientação nas dificuldades diárias. Que essas presenças sejam constantes na etapa que se inicia com a finalização desse estudo.

Aos meus pais, Vânia e Carlos Rufino, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos, pelos valores a mim passados, pelo contínuo apoio, pela fundamentação sólida em que fui criada o que possibilitou a minha formação profissional e intelectual.

À minha irmã Iasmin, pela companhia em momentos difíceis, pela torcida, pelo apoio dado ao longo dessa caminhada.

Ao meu noivo Caio, que de uma forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, pela paciência, pela vibração e comemorações a cada conquista, pela compreensão, pelo amor e companheirismo diário, tornando-se parte fundamental para essa conquista!

Em especial, ao meu orientador, professor Rafael, pela oportunidade concedida de trabalhar junto ao seu grupo de pesquisa, pela confiança a mim depositada, por todas as cobranças realizadas das quais se tornaram ensinamentos que jamais esquecerei, pelo tempo e atenção despendidos, pela preocupação dos nossos anseios, por estar sempre disposto a ajudar, por me ensinar a pesquisar e adquirir uma visão crítica, de questionamentos, por ser bastante compreensivo e dividir todos os seus conhecimentos e experiência para que eu cresça intelectualmente tendo-o como exemplo de profissional.

À minha coorientadora, professora Patrícia, pela confiança, pela oportunidade inicial, pela competência, pela contribuição à construção dos meus conhecimentos, e tempo disponível em auxiliar esse trabalho.

Ao grupo de pesquisa Labiclin, pelos ensinamentos e auxílio na execução dos trabalhos teóricos e práticos.

Às minhas queridas professoras e amigas, Eliza e Maria do Carmo, por me inserirem no campo da pesquisa científica, confiarem no meu potencial, incentivarem a todo o momento e vibrarem com as minhas realizações.

Ao professor Sérgio Mortari, por dedicar o seu tempo em me auxiliar no encaminhamento para a pós-graduação, confiando na minha dedicação e comprometimento.

Aos professores Dr. Roberto e Dr. Rodrigo os quais fizeram parte da minha formação acadêmica e hoje disponibilizaram do seu tempo para compor a banca examinadora dessa dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria, que me concedeu a oportunidade de estudar gratuitamente, disponibilizando não somente sua infra-estrutura, mas especialmente os professores que foram responsáveis por parte do conhecimento adquirido. Também agradeço o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por tornar possível a conquista desse título!

Enfim, MUITO OBRIGADA a todos que de diferentes formas contribuíram para que eu concluísse essa etapa na minha vida, sou imensamente grata!

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE FATORES PRÉ-ANALÍTICOS NA MENSURAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO E DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA UMA POPULAÇÃO SAUDÁVEL

AUTORA: TAÍS CORRÊA ALMEIDA
ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
COORIENTADORA: PROF^a. DR^a. PATRÍCIA GOMES

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 07 de janeiro de 2014.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre reativo, que age como uma molécula mensageira, mediando diversas funções, incluindo vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão, atividades antimicrobianas e antitumorais. Em várias condições patológicas, o NO está associado com o aumento da concentração circulatória de citocinas e endotoxinas especialmente em processos inflamatórios. Pelo fato deste radical possuir uma meia-vida curta, a sua determinação torna-se difícil e, conseqüentemente, a mensuração de seus metabólitos nitrito/nitrato (NOx) é mais frequentemente utilizado para avaliar a produção de NO. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito de interferentes pré-analíticos sobre os níveis de NOx, bem como determinar os limites de referência urinária e sérica para uma população saudável. Na simulação da icterícia, lipemia e hemólise em amostras séricas, avaliou-se a interferência pré-analítica na mensuração do NOx. Todas as concentrações utilizadas de bilirrubina (9, 19, 38, 75, 150 and 300 mg/L), de Intralipid[®] (0,67; 1,25; 2,5; 5 e 10 g/L) e de hemoglobina (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 5,0 g/L) resultaram em uma diferença do valor original de NOx, sendo verificada uma porcentagem maior que 10%, sendo assim, considerada uma interferência analítica. Os limites de referência foram avaliados seguindo recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC), sendo os valores urinários de 46,1 µmol/L a 1533,0 µmol/L, e os valores séricos 56,8 µmol/L a 340,3 µmol/L para uma população saudável. Também foi possível concluir que a bilirrubina, lipemia e hemólise causam interferência na mensuração da concentração sérica do NOx.

Palavras-chaves: bilirrubina, hemólise, interferência pré-analítica, limites de referência, lipemia, óxido nítrico.

ABSTRACT

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

EVALUATION OF INTERFERENCE FACTORS IN PRE-ANALYTICAL MEASUREMENT OF METABOLITES OF NITRIC OXIDE AND DETERMINATION OF REFERENCE INTERVALS FOR A HEALTHY POPULATION

AUTHOR: TAÍS CORRÊA ALMEIDA
ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
CO-ADVISOR: PROF^a. DR^a. PATRÍCIA GOMES

Place and Date: Santa Maria, January 07, 2014.

Nitric oxide (NO) is a reactive free radical, that acts as a messenger molecule, mediating several functions, including vasodilation, platelet aggregation inhibition, neurotransmission, antimicrobial and antitumor activities. In several pathological conditions, NO is associated with increased circulatory concentrations of cytokines and endotoxins in inflammatory processes in especially. 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 objective of this study the effect of pre-analytical interferences been investigating on the NO_x and determine the limits of urinary and serum reference for a healthy population. In the simulation of bilirubin, lipemia and hemolysis on serum samples, we evaluated the pre-analytical interference in the measurement of NO_x. All bilirubin concentrations used (9, 19, 38, 75, 150 and 300 mg /L), Intralipid[®] (0.67, 1.25, 2.5, 5 and 10 g/L) and hemoglobin (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 5.0 g/L) resulted in a difference between the original amount of NO_x being checked greater than 10 percent %, thus, considered an analytical interference. The reference limits were evaluated following the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), and urinary values of 46.1 mmol / L to 1533.0 mmol/L, and serum values 56.8 mmol/L at 340, 3 mmol/L for a presumably healthy population. Thus, we conclude that bilirubin, lipemia and hemolysis interfere with the measurement of serum activity of NO_x. The reference limits were evaluated following the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), and urinary values of 46.1 mmol/L to 1533.0 mmol/L, and serum values 56.8 mmol/L at 340, 3 mmol/L for a healthy population. Thus, we conclude that bilirubin, lipemia and hemolysis interfere with the measurement of serum activity of NO_x.

Keywords: bilirubin, hemolysis, lipemia, nitric oxide, pre-analytical interference, reference limits.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intervalos de confiança não paramétricos dos limites de referência.....	48
Tabela 2 - Determinação não paramétrica do intervalo de referência.....	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Síntese do NO catalisada pela NOS.....	19
Figura 2 - Difusão celular do NO dentro de sua meia-vida.....	21
Figura 3 - Os processos celulares no desenvolvimento de uma placa aterosclerótica..	24
Figura 4 - Vasodilatadores derivados do endotélio e vasoconstritores em pacientes saudáveis (à esq.) e em pacientes com diabetes <i>mellitus</i> (à dir.)....	27
Figura 5 - Envolvimento do NO na fisiopatologia do AVC.....	29
Figura 6 - Mecanismos de ação do NO durante o processo cancerígeno.....	32
Figura 7 – Reação do nitrito com o ensaio de Griess.....	37
Figura 8 - Causas da icterícia..	40

MANUSCRITO

Figure 1. Effects of interferents on serum nitrite/nitrate (NOx) measured in non-deproteinized samples. (A) Effect of added bilirubin in different concentrations on analyte results. (B) Effect of added Intralipid® in different concentrations on analyte results. (C) Effect of added hemoglobin in different concentrations on analyte results.....	62
Figure 2. Effects of interferents on serum nitrite/nitrate (NOx) measured in deproteinized samples. (A) Effect of added bilirubin in different concentrations on analyte results. (B) Effect of added Intralipid® in different concentrations on analyte results. (C) Effect of added hemoglobin in different concentrations on analyte results.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST: aspartato aminotransferase
AVC: acidente vascular cerebral
BH4: tetrahydrobiopterina
Ca⁺⁺: íons de cálcio
CK: creatina quinase
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
COX: cicloxigenase
DM: diabetes *mellitus*
EDRF: fator de relaxamento derivado do endotélio
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
EROs: espécies reativas de oxigênio
FAD: dinucleotídeo de flavina-adenina
FBP: frutose-1,6-bisfosfato
FMN: mononucleotídeo de flavina
GC: guanilato ciclase
GCs: guanilato ciclase solúvel
GMPc: monofosfato cíclico de guanosina
HDL: lipoproteína de alta densidade
IC: insuficiência cardíaca
IFCC: *International Federation of Clinical Chemistry*
iNOS: óxido nítrico sintase induzível
LDH: lactato desidrogenase
LDL: lipoproteína de baixa densidade
NAPDH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMDA: *N*-metil D-aspartato
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO[•]: nitroxil
NO: óxido nítrico
NO⁺: nitrozônio
NO₂⁻: nitrito
NO₃⁻: nitrato
NOS: óxido nítrico sintase
NOx: nitrito/nitrato
O₂: oxigênio
O₂⁻: superóxido
ONOO⁻: peroxinitrito
PKGs: proteína-quinases dependentes de GMPc
RNOs: espécies reativas de óxido de nitrogênio
SIRS: resposta inflamatória sistêmica
SNC: sistema nervoso central
TFG: taxa de filtração glomerular
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE ANEXO

Anexo A – Comprovante de submissão do artigo científico.....	80
---	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Óxido nítrico: uma introdução à molécula	17
1.2 Aspectos biológicos do óxido nítrico	20
1.3 Fisiologia do óxido nítrico	22
1.4 Óxido nítrico e sua associação com doenças	23
1.4.1 Aterosclerose	23
1.4.2 Diabetes <i>mellitus</i>	26
1.4.3 Hipertensão arterial.....	27
1.4.4 Acidente vascular cerebral	28
1.4.5 Insuficiência cardíaca	29
1.4.6 Desordens no sistema nervoso central.....	30
1.4.7 Câncer.....	31
1.4.8 Sepsis.....	32
1.5 Óxido nítrico: efeitos protetores ao organismo	33
1.5.1 Sistema cardiovascular	34
1.5.2 Sistema bronco-pulmonar.....	35
1.5.3 Sistema renal	35
1.5.4 Sistema nervoso.....	36
1.6 Análise quantitativa do óxido nítrico	36
1.7 Interferentes laboratoriais	38
1.8 Classificação dos interferentes	38
1.8.1 Icterícia.....	39
1.8.2 Lipemia.....	41
1.8.3 Hemólise.....	42
1.9 Avaliação da interferência <i>in vitro</i>	44
1.10 Estabelecimento de valores de referência	45
1.10.1 Determinação dos limites de valores de referência	46
1.10.2 Método não paramétrico.....	47
1.10.3 Apresentação de um valor observado com relação aos valores de referência.....	50
2 OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo Geral	51
2.2 Objetivos Específicos	51
3 ARTIGO CIENTÍFICO	52
4 CONCLUSÕES	65
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
6 ANEXO	80

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no próprio artigo.

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 catalisada por enzimas denominadas NO sintases (NOS) (AVOGARO et al., 2006). O NO é um radical livre reativo, que age como uma molécula mensageira, mediando diversas funções, incluindo vasodilatação, agregação e inibição plaquetária, neurotransmissão e também apresenta 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). Pode ser mensurado através de seus metabólitos nitrito/nitrato (NOx) em diferentes metodologias, incluindo o método automatizado baseado na reação de Griess previamente descrito e validado pelo nosso grupo de pesquisa (TATSCH et al., 2011a).

Há evidências consolidadas de que, hoje em dia, a maioria dos erros de laboratório está fora da fase de análise e que os processos pré-analíticos são mais vulneráveis a erros do que os processos analíticos (PLEBANI, 2009; SIMUNDIC et al., 2009). O fator pré-analítico mais comum a afetar a aceitabilidade de espécimes para análise é a presença de substâncias interferentes no interior da amostra (KAZMIERCZAK & CATROU, 2000). Assim, os tipos mais frequentes de interferência em testes de rotina em química clínica são causados por icterícia, lipemia e hemólise (FLEMING & SWAMINATHAN, 2001). A presença de substâncias interferentes altera o valor correto do resultado, podendo levar a uma intervenção clínica inapropriada, o que compromete a saúde do paciente (KAZMIERCZAK & CATROU, 2000).

Amostras ictericas de plasma têm uma alta prevalência em pacientes da unidade de terapia intensiva, bem como gastroenterologia, pacientes cirúrgicos e pediátricos (GUDER et al., 2000). Já as amostras lipêmicas são frequentemente encontradas na prática de laboratórios clínicos e podem causar interferências significativas nos resultados analíticos nos diferentes parâmetros bioquímicos. As causas mais comuns de ocorrência de lipemia são: dieta, ingestão de álcool, diabetes *mellitus*, hipertrigliceridemia, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, pancreatite, mieloma múltiplo, cirrose biliar hepática, lúpus eritematoso, nutrição parenteral total, uso de fármacos como inibidores de protease, estrogênio, anticoncepcionais orais, entre

outros (CALMARZA & CORDERO, 2011). Já a hemólise *in vivo* pode ocorrer a partir de uma condição patológica, tal como anemia hemolítica autoimune, pré-eclâmpsia, síndrome hemolítica urêmica ou, até mesmo, por uma reação transfusional (RIOJA et al., 2009). Interferentes exógenos incluem fármacos e aditivos químicos incorporados aos tubos de coleta de sangue para inibir ou promover a coagulação ou para preservar certos constituintes do sangue. Nesse caso, também está inserida a hemólise *in vitro*, a qual possui entre as principais causas a coleta inadequada e o incorreto manuseio ou centrifugação da amostra (KAZMIERCZAK & CATROU, 2000).

Apesar da importância sobre a utilidade da mensuração sérica dos metabólitos nitrito/nitrato (NO_x) em clínicas (WINLAW et al., 1994; HIGASHINO et al., 2007), os intervalos de referência para os valores urinários de NO_x não foram ainda determinados. Um intervalo de referência é o intervalo entre o menor e o maior valor (SOLBERG et al., 1987), e é a ferramenta de tomada de decisão clínica mais utilizada (HORN & PESCE, 2003).

Considerando a importância e o papel fisiológico do NO e da relevância da mensuração de seus metabólitos em diferentes situações é importante que sejam mensurados seus níveis e investigadas as diferentes variáveis pré-analíticas que tenham impacto sobre a sua quantificação, assim como o estabelecimento de intervalos de referência, uma vez que a não identificação de erros pré-analíticos pode resultar em interpretações errôneas dos exames laboratoriais e intervenções clínicas inadequadas.

1.1 Óxido nítrico: uma introdução à molécula

O primeiro indício histórico relacionado à descoberta do NO como um radical livre biologicamente relevante provavelmente se relaciona com o cientista italiano Ascanio Sobrero, o qual foi o descobridor da nitroglicerina em 1847. Sobrero conseguiu obter a nitração da glicerina, tornando-se um verdadeiro pioneiro e prognosticador da aplicação futura (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2011). Ao longo do século XIX, diversos químicos e farmacêuticos europeus descobriram as propriedades vasodilatadoras da nitroglicerina e, até o final do século, a nitroglicerina e seus compostos relacionados foram estabelecidos como medicamentos para a angina de peito (MARSH & MARSH, 2000). A história moderna dos radicais data em meados da década de 70, quando foi demonstrado que a azida de sódio,

nitroglicerina e NO eram capazes de ativar a guanilato ciclase e a geração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (ARNOLD et al., 1977). Em 1980, Furchgott e Zawadzki relataram que as células endoteliais liberam um fator lábil que provoca um relaxamento dos vasos sanguíneos. Apesar da elucidação que o NO era um efetor da guanilato ciclase (GC), a ligação entre o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) e o NO durante o relaxamento vascular ainda não tinha sido esclarecida. Sendo assim, em 1986, foi sugerido por Moncada e seu grupo de pesquisadores, e posteriormente confirmado que o EDRF é de curta duração, gasoso, altamente reativo, sendo identificado como NO (PALMER et al., 1987). De importância para os historiadores da ciência, a descoberta do NO tinha ocorrido em paralelo dentro de um contexto biológico completamente diferente que o da inflamação. O trabalho de diversos laboratórios com interesse na infecção bacteriana e a produção de nitrito/nitrato contribuíram significativamente para a identificação da L-arginina como um substrato para a síntese de NO (HIBBS JR. et al., 1987). A década de 90 trouxe vários marcos para o campo, incluindo a caracterização molecular da família de enzimas do óxido nítrico sintase (NOS) (BRED et al., 1991; XIE et al., 1992), a descoberta do peroxinitrito (ONOO^-) (BECKMAN et al., 1990), a importância do NO mediado por modificações pós-traducionais de proteínas (STAMLER et al., 1992), a regulação da função mitocondrial por NO (CLEETER et al., 1994; SCHWEIZER & RICHTER, 1994) e a explosão da química NO em ambientes biológicos (LANCASTER JR., 1994).

O NO é produzido enzimaticamente por uma complexa família de enzimas NOS. As células dos mamíferos são dotadas de três genes que codificam as isoformas distintas de NOS com diferentes localizações, regulações, propriedades catalíticas e com inibidor de sensibilidade (MONCADA et al., 1991). A isoforma óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (NOS1) foi a primeira a ser purificada e clonada a partir do tecido neuronal e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (NOS3) foi a primeira isoforma encontrada em células endoteliais. A nNOS e a eNOS são também denominadas em enzimas constitutivas uma vez que são expressas de forma contínua em neurônios e células endoteliais, sendo importantes para processos homeostáticos tais como a neurotransmissão e tônus vascular, respectivamente. Além disso, essas isoformas são dependentes de um aumento na concentração de cálcio para a atividade do tecido e, portanto, produzem baixas concentrações transitórias de NO (MONCADA et al., 1991; FLEMING & BUSSI, 2003). Mais recentemente a natureza constitutiva da eNOS alcançou novas dimensões, uma vez que ficou claro que a atividade da enzima pode ser regulada, tanto transcricional com acilação, fosforilação, localização subcelular e interações com proteínas que determinam sua atividade (FLEMING & BUSSI,

2003). A terceira enzima, óxido nítrico induzível (iNOS) (NOS2), normalmente não é expressa, mas é sintetizada em resposta à inflamação. Esta enzima é cálcio-independente e produz grandes quantidades de NO em períodos prolongados (MORRIS JR. & BILLIAR, 1994). Essa enzima é induzível por estímulos imunológicos em praticamente todas as células nucleadas de mamíferos (MONCADA, 1991). Todas as três isoformas são expressas em tecido de pele. A expressão de nNOS tem sido observada em queratinócitos e melanócitos; eNOS podem ser detectados em queratinócitos da camada basal da epiderme, fibroblastos dérmicos, capilares endoteliais e glândulas sudoríparas ecrinas e a iNOS pode ser induzida em queratinócitos, fibroblastos, células de *Langerhans* e células endoteliais. Assim, o NO participa na regulação homeostática da pele, funções como circulação, eritema, queimaduras solares e manutenção da barreira de proteção contra microrganismos (LUO & CHEN, 2005).

In vivo, o NO é sintetizado pelas isoformas de NOS através da oxidação do aminoácido L-arginina que está presente em concentrações elevadas no sangue (60-80 μM) e no fluido extracelular e também em concentrações mais elevadas nas células (ANDREW & MAYER, 1999). As três principais isoformas de NOS catalisam a reação em duas etapas, na presença de oxigênio (O_2), de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e de cofatores, tais como mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD), heme, tetrahydrobiopterina (BH_4) e a enzima NOS catalisam e oxidam o terminal nitrogênio-guanidina do aminoácido L-arginina tendo como produto intermediário a N^G -hidroxi-L-arginina, que será posteriormente convertida em L-citrulina, liberando o NO como subproduto, como pode ser observado na Figura 1 (CALABRESE et al., 2007).

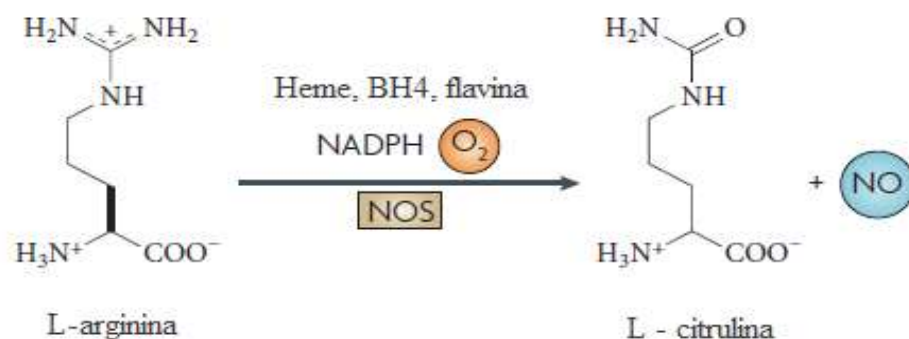


Figura 1 - Síntese do NO catalisada pela NOS. Adaptado de CALABRESE et al., 2007.

1.2 Aspectos biológicos do óxido nítrico

O NO é uma molécula pequena, lipofílica, relativamente estável, gás de radical livre que facilmente se difunde em células e membranas nervosas, onde ele reage com alvos moleculares. Contrariamente às moléculas biosinalizadoras convencionais que atuam por ligação a moléculas receptoras específicas, o NO manifesta suas ações biológicas através de uma ampla gama de reações químicas. As reações precisas dependem da concentração do NO, alcançando uma variação sutil na composição do meio intra e extracelular (MONCADA et al., 1991). O NO desempenha um papel importante como uma molécula de sinalização da célula, como agente anti-infeccioso e como um antioxidante (KORDE et al., 2012).

Em sistemas biológicos, o NO tem uma meia-vida curta, da ordem de segundos, por causa da sua reatividade com a hemoglobina e um amplo espectro de outros componentes biológicos (Figura 2) (GRISHAM et al., 1999; KIM et al., 2001). A química biológica do NO gira em torno do seu elétron não emparelhado no orbital exterior, tornando-se um radical livre que reage com outras moléculas, tais como O_2 , radicais superóxido (O_2^-) ou metais de transição como o ferro, cobalto, manganês ou cobre (MONCADA et al., 1991). Sendo assim, dependendo do meio em que se encontra, o NO pode atuar como oxidante ou redutor, sendo que a sua redução produz nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (GLADWIN et al., 2004). O NO pode ser formado e/ou bioativado como nitroxil (NO^-) ou nitrozônio (NO^+). Estas espécies químicas têm meias-vidas curtas, mas estão estabilizados em complexos biológicos com tióis, nitritos e outros intermediários. A reação de NO, em última análise, conduz à nitração (adição de NO_2), nitroação (adição de NO^+) e nitrosilação (adição de NO) da maior parte das classes biomoleculares (GRISHAM et al., 1999).

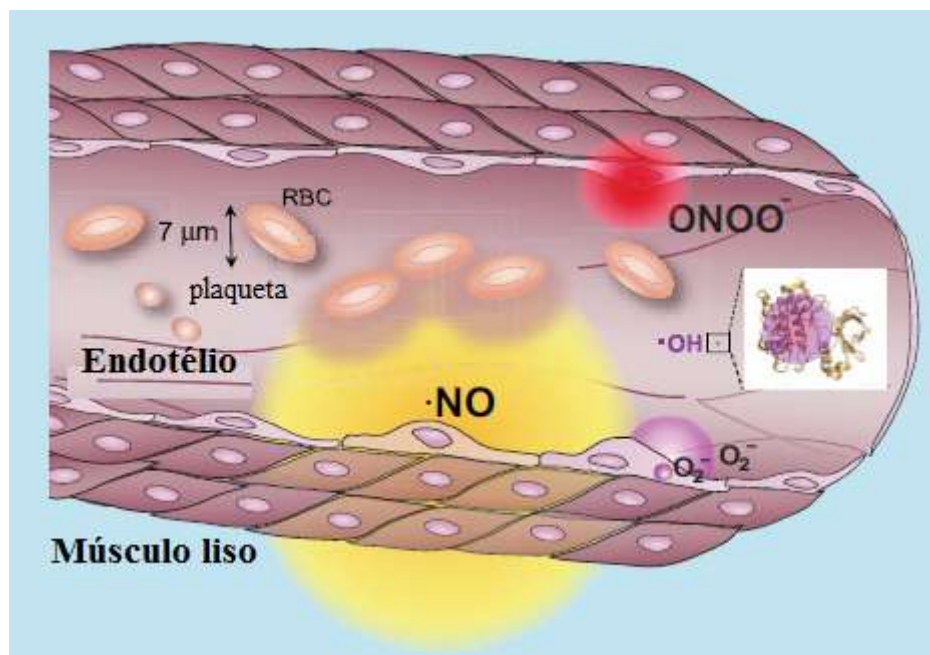


Figura 2 - Difusão celular do NO dentro de sua meia-vida. Adaptado de PACHER et al., 2007.

Um mecanismo importante para a função biológica do NO é a sua reação com íons metálicos carregados positivamente em complexos de enzimas que contêm ferro como o alvo mais frequentemente citado. O controle dos níveis de NO livre pode ser regulado por remoção de NO, o qual ocorre através de uma reação comum direta com a porção heme contendo ferro na hemoglobina (MURAD, 1994). Em muitas células, o NO reage com a GMPc para formar um complexo de ferro-nitrosil (MONCADA et al., 1991; MURAD, 1994). Além disso, o NO reage geralmente, com afinidades diferentes com as isoformas do citocromo P450, podendo ter ações reversíveis ou irreversíveis (WINK et al., 1993a; ALONSO-GALICIA et al., 1997). A inibição reversível ocorre quando o NO liga-se ao heme para evitar a ligação de O₂, inibindo a catalase (WINK et al., 1993a). Já a inibição irreversível é mediada pelas espécies reativas de óxido de nitrogênio (RNOs) formadas a partir da auto-oxidação do NO. Esta inibição é diminuída pela presença de albumina ou glutathiona no soro (WINK et al., 1993a). Estudos realizados por Kim e colaboradores (1995) propõe que a inibição irreversível resulta da remoção da proteína heme. Com base nisso, a inibição do citocromo P450 pelo NO pode exercer importantes sequelas fisiopatológicas. Durante a infecção crônica ou choque séptico, por exemplo, o NO pode ser produzido em grandes quantidades. A inibição do citocromo P450 no fígado, por sua vez, pode reprimir o metabolismo de fármacos utilizados para tratar a infecção, tendo o potencial de comprometer a terapia (KHATSENKO et al., 1993;

STAMLER, 1994). No entanto, nenhuma ligação de citocromo P450 foi apresentada para libertar a molécula de heme que, por sua vez, ativa a heme oxigenase em hepatócitos (KIM et al., 1995). A ativação da heme oxigenase serve como um mecanismo de proteção contra uma variedade de condições patofisiológicas (STOCKER 1990; CHOI & ALAN, 1996). A interação do NO com o citocromo P450, portanto, tem um papel regulador e fisiopatológico (WINK & MITCHELL, 1998). O NO é instável na presença de O_2 e nas espécies reativas de oxigênio (EROs) (WINK et al., 1993b). Sob condições de estresse que se assemelham a certos estados inflamatórios e patológicos, o NO pode combinar-se com O_2^- para formar $ONOO^-$. O $ONOO^-$ pode induzir dano no DNA, peroxidação de lipídios, degradação da proteína e S-nitrosilação dos resíduos de cisteína nas proteínas, podendo levar a danos celulares e, muitas vezes, à apoptose (CROW & BECKMAN, 1995; BECKMAN & KOPPENOL, 1996).

1.3 Fisiologia do óxido nítrico

O NO tem a reputação de estar presente em reações diversas. Efeitos individuais de NO nos processos celulares específicos podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos diretos são aqueles em que o NO interage diretamente com as moléculas biológicas (KORDE et al., 2012). Em contraste, os efeitos indiretos são derivados de reações do NO com o O_2^- ou O_2 , que gera RNOs, que em diversas situações podem induzir a morte celular (WINK & MITCHELL, 1998). Efeitos diretos e indiretos das reações do NO também podem ser separados com base na concentração local de NO produzido endogenamente ou fornecidos exogenamente (KORDE et al., 2012).

Os efeitos diretos são definidos como as reações com rapidez suficiente para ocorrer entre o NO e as moléculas biológicas específicas (KORDE et al., 2012). O NO não reage rapidamente com os tióis ou aminas, no entanto, a reação do NO com alguns complexos de metais e outros radicais livres são fáceis o suficiente para ser biologicamente relevante. Os efeitos diretos ocorrem em baixas concentrações de NO (inferior a 1mM), enquanto que, os efeitos indiretos do NO os quais envolvem a formação de RNOs, torna-se significativo em concentrações elevadas de NO (superior a 1 mM). As interações do NO envolvendo metaloproteínas ou com radicais livres orgânicos representam dois dos melhores efeitos diretos caracterizados do NO em sistemas biológicos. Estas reações contribuem para a

regulação dos efeitos anti-inflamatórios do NO e de suas propriedades oxidantes (WINK & MITCHELL 1998).

Embora efeitos diretos do NO não possam ser ignorados como causadores de situações patológicas, o mecanismo de ação mais aceito é a ação indireta do NO, através da interação deste com as EROs, causando a formação de compostos intermediários que possuem atividade patológica. As reações mais comuns que ocorrem *in vivo* parecem ser entre o NO e O₂ ou O₂⁻, causando os efeitos de estresse oxidativo e nitrosativo, possuindo um papel crítico na citotoxicidade de linfócitos T e de outras reações imunológicas (HIRST & ROBSON, 2010).

1.4 Óxido nítrico e sua associação com doenças

Defeitos na via do NO podem levar ao desenvolvimento de muitas patologias, como aterosclerose, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, desordens do sistema nervoso central, câncer, sepsis, entre outros.

1.4.1 Aterosclerose

A aterosclerose geralmente inicia-se com uma agressão ao endotélio, seguida de uma reação inflamatório-proliferativa na parede vascular, com aderência de elementos celulares e presença de núcleo lipídico com capa fibrosa rica em colágeno (Figura 3).

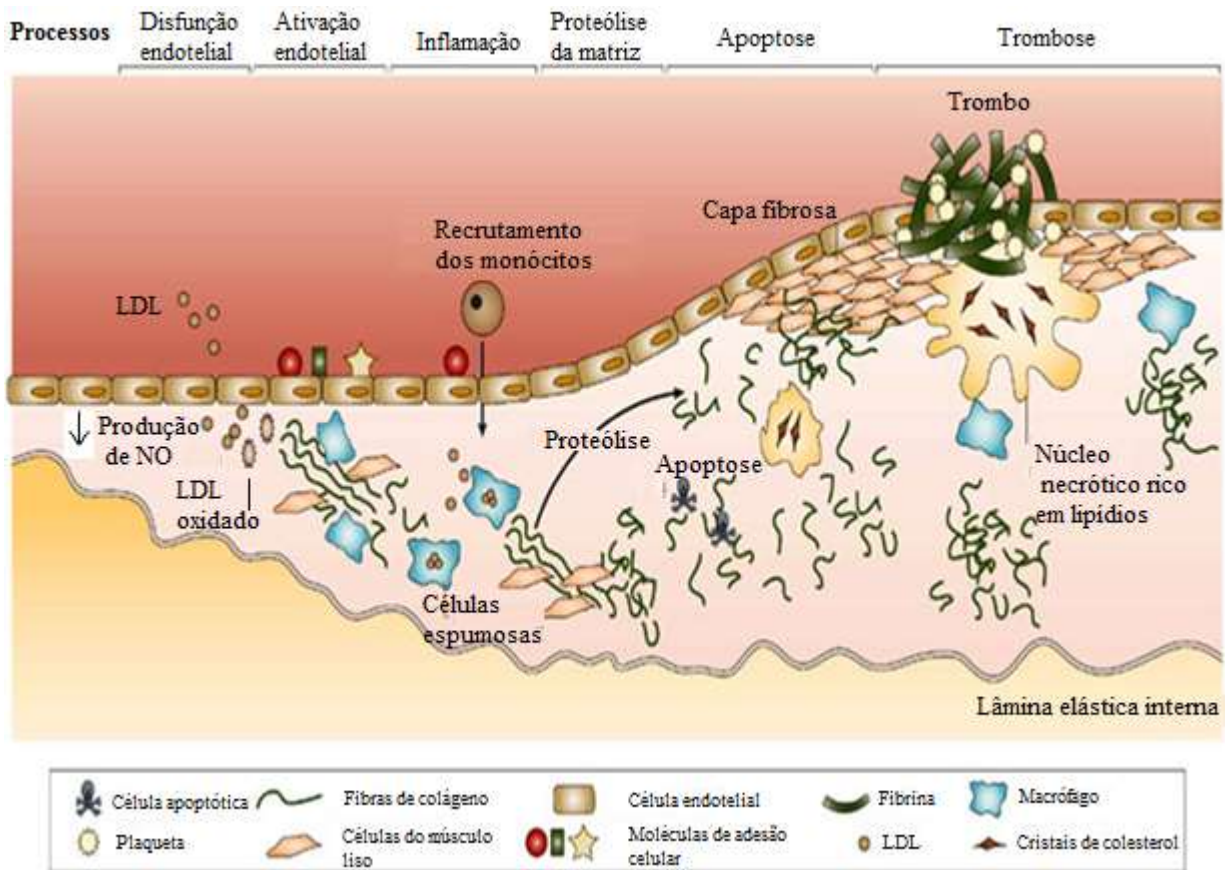


Figura 3 - Os processos celulares no desenvolvimento de uma placa aterosclerótica. Adaptado de WARKINS & FARRAL, 2006.

Um fator agravante desse episódio lesivo é a hipertensão arterial. Sabe-se que tal fator tende a aumentar a produção de O_2^- e radicais livres, reduzindo a produção do eNOS e, dessa forma, facilitando a aderência leucocitária e aumentando a resistência vascular periférica (SPOSITO et al., 2007).

A agressão endotelial permite um depósito de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na parede dos vasos, principalmente na porção denominada túnica íntima que, por apresentar aberturas alongadas, torna-a permeável a essas partículas de LDL. A permeabilidade facilita uma reação imunológica e esta resposta será mais evidente após a disfunção endotelial, iniciando assim, a aterogênese. Nesta fase ocorre a adesão de leucócitos na superfície do endotélio, que atraem monócitos e linfócitos para a parede endotelial, sendo que os monócitos, após se diferenciarem em macrófagos, captam as LDLs e formam as estrias gordurosas, constituindo as lesões macroscópicas da aterosclerose. A placa aterosclerótica contém elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Tudo isso

forma a placa aterosclerótica, o núcleo lipídico rico em colesterol, e a capa fibrosa, rica em colágeno. Quando ocorre o predomínio do colágeno com capa fibrosa espessa, pequeno núcleo lipídico e poucas células inflamatórias têm-se uma placa estável. Já a placa instável apresenta intensa atividade inflamatória, grande atividade proteolítica e um núcleo lipídico proeminente com capa fibrótica tênue. Quando ocorre ruptura dessa capa, há exposição de material lipídico e a consequente formação de trombo, levando a um processo conhecido como aterotrombose, que é um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (SPOSITO et al., 2007).

O tônus vascular é determinado pelo equilíbrio entre as substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. A disfunção endotelial promove maior produção de substâncias vasoconstritoras ou menor produção de substâncias vasodilatadoras, acarretando aumento do tônus com repercussão no sistema cardiovascular. Na membrana das células endoteliais estão presentes as enzimas eNOS que, ao serem estimuladas, sintetizam NO cuja ação nas células musculares ou no lúmen vascular promovem o relaxamento do vaso. Ao penetrar na célula muscular, o NO desencadeia uma série de alterações que resultam na formação de GMPc, essencial para sua ação. Com o aumento do GMPc há uma diminuição da entrada de cálcio (Ca^{++}) na célula e aumento da captura de Ca^{++} pelo retículo endoplasmático promovendo a vasodilatação (DUSSE et al., 2003).

Caso haja inibição da síntese, liberação ou atividade do NO derivado do endotélio, pode ocorrer vasoconstrição e consequente elevação da pressão arterial, que intensifica as forças de cisalhamento do sangue, levando, juntamente com outros fatores, à disfunção endotelial, uma das primeiras alterações que precedem o processo patogênico da aterosclerose (MORIEL et al., 2002).

A produção excessiva ou não compensada de EROs caracteriza o estresse oxidativo e favorece os eventos inflamatórios que ocorrem na placa aterosclerótica. O estresse oxidativo reduz a biodisponibilidade de NO, aumenta a adesão de neutrófilos na parede dos vasos, participa da oxidação LDL e constitui um segundo mensageiro intracelular de fatores de crescimento indutores de proliferação, secreção de matriz extracelular, diferenciação e senescência. Com base nessas informações, sugere-se que o estresse oxidativo participe na ruptura da placa aterosclerótica (SOUZA & LAURINDO, 2002).

1.4.2 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 (CRAIG et al., 2009; ADA, 2010). 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).

Diabetes *mellitus* tipo 2 está associada a complicações micro e macrovasculares levando a complicações tardias da diabetes, incluindo retinopatia, nefropatia, neuropatia, úlceras de pele, doença arterial coronariana e doença arterial periférica. A etiologia da diabetes traz complicações vasculares associadas (MATHER et al., 2001; JANSSON, 2007). A disfunção endotelial é um achado precoce na resistência à insulina e diabetes. Além disso, tem sido demonstrado que a sinalização diminuída de NO está subjacente aos aumentos na resposta vasoconstritora nas arteríolas de ratos pré-diabéticos e diabéticos (LESNIEWSKI et al., 2008).

A insulina tem um efeito vasodilatador sobre o músculo esquelético, promovendo a síntese e/ou liberação do NO a partir das células endoteliais (STEINBERG et al., 1994). O NO é produzido e difunde-se para os tecidos circundantes e células, incluindo o músculo liso (VERSARI et al., 2009) e liga-se à porção heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), resultando em um aumento da produção intracelular de GMPc, que medeia o relaxamento das células musculares lisas (BALAKUMAR et al., 2009). A deficiência de insulina na diabetes *mellitus* tipo 1 e 2 contribui para a disfunção das células endoteliais, tal como o aumento da produção de O_2^- , causando um excesso de consumo de NO para gerar ONOO⁻ (BUERK, 2001). Os baixos níveis de NO em células endoteliais pode potencialmente resultar na supressão ineficaz de EROs, podendo conduzir indiretamente a vasoconstrição reforçada. Estas alterações do metabolismo do NO promovem alterações no estresse oxidativo, especialmente no meio renal (Figura 4).

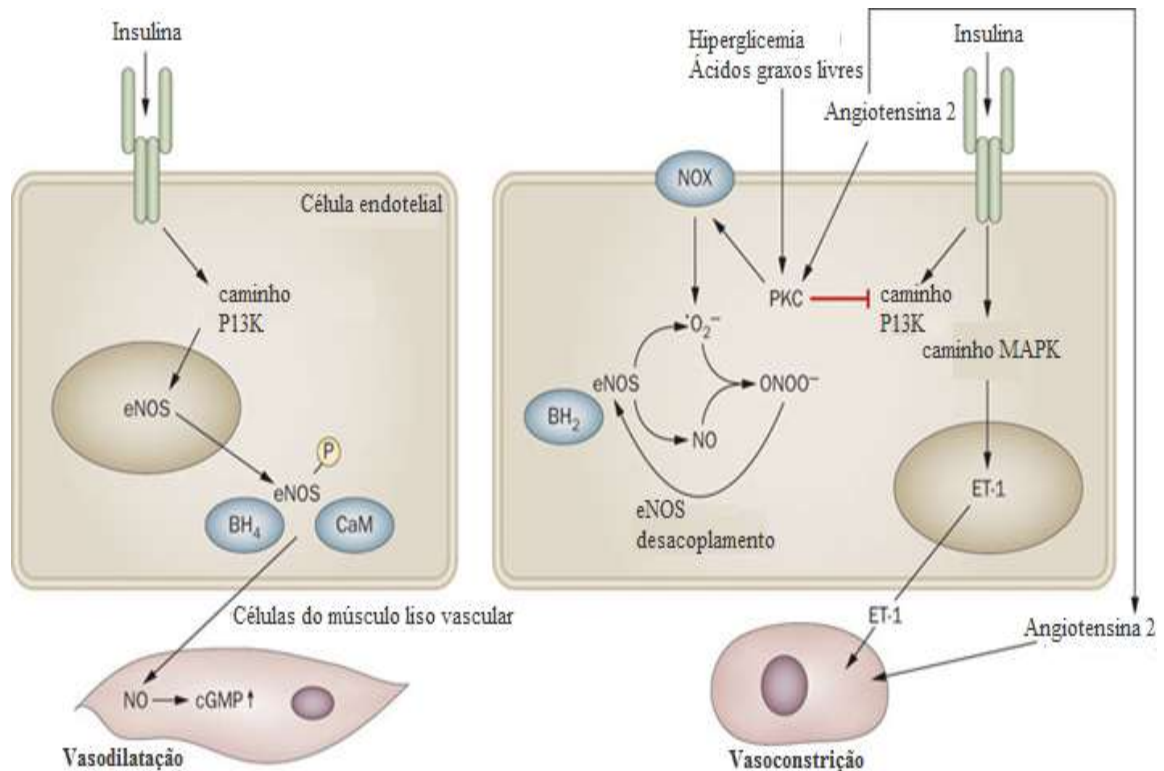


Figura 4 - Vasodilatadores derivados do endotélio e vasoconstritores em pacientes saudáveis (à esq.) e em pacientes com diabetes *mellitus* (à dir.). Abreviações: B₄: tetrahydrobiopterina; CaM: calmodulina; ET-1: endotelina; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; P13K: fosfatidilinositol 3-quinases, PKC: proteína quinase C. Adaptado de SINGH et al., 2011.

1.4.3 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial consiste em uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos alvos (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

O estudo de Uwabo e colaboradores (1998) demonstrou que elevações da pressão sanguínea aumenta a liberação de NO para a circulação. Por outro lado, a queda na pressão sistêmica causa diminuição da produção de NO. A produção de NO e a atividade da NOS tem demonstrado ser maior em um modelo genético de hipertensão em comparação com os controles normotensos. Estes resultados sugerem que a pressão arterial elevada regula a produção de NO. Os mecanismos envolvidos não estão totalmente esclarecidos. No entanto, os resultados sugerem que os efeitos de fluxo de sangue, tensão de cisalhamento e outros

estímulos mecânicos relacionados são responsáveis pelo aumento da produção de NO e a expressão de eNOS (KLAHR, 2001).

A evidência do papel do NO foi fornecida através dos resultados em que a disrupção do gene NO em camundongos levaram à hipertensão (FORTE et al., 1997). Além disso, em animais normais, a administração aguda dos antagonistas da L-arginina causa uma rápida elevação acentuada da pressão sanguínea e o decréscimo da taxa de filtração glomerular (TFG) e do fluxo plasmático renal. Além disso, vários estudos demonstraram que o NOS está presente na área específica do cérebro responsável pelo controle neurogênico da pressão arterial (BREDT et al., 1990; VINCENT & KIMURA, 1992).

1.4.4 Acidente vascular cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC) ocorre quando a quantidade de O₂ e outros nutrientes fornecidos pelo fluxo sanguíneo são insuficientes para atender às demandas metabólicas do tecido cerebral. No AVC, o suprimento de sangue para o cérebro é interrompido por uma doença cerebrovascular. Durante décadas, extensas abordagens de pesquisa e clínicas para combater AVC têm-se centrado nos aspectos vasculares de isquemia cerebral. Os avanços terapêuticos, incluindo a terapia trombolítica, a anticoagulação para AVC cardiogênico, agentes antiplaquetários e o tratamento dos fatores de risco, como hipertensão e hiperlipidemia, tiveram efeitos significativos sobre a morbidade e mortalidade do AVC. O evento final do AVC é a morte dos neurônios, resultando na perda irreversível da função neurológica. A compreensão dos mecanismos pelos quais a morte de células neuronais ocorre resultou em certo número de estratégias terapêuticas destinadas a prevenir alterações bioquímicas secundárias e, portanto, diminuir o dano que resulta de isquemia cerebral. Estes mecanismos básicos também podem ter relevância para outras doenças neurodegenerativas associadas com a morte neuronal excessiva (GRAHAM & HICKEY, 2003).

O AVC induz a múltiplas e distintas variações na sinalização e no teor de NO cerebral (Figura 5). Oclusão da artéria cerebral média resulta em um aumento de 20 vezes na produção de NO em até 30 minutos, provavelmente devido a maior disponibilidade de Ca⁺⁺ e ativação do NO (KADER et al., 1993). A concentração de cálcio intracelular pode ativar isoformas cálcio-dependentes de NOS para produzir NO (VANE et al., 1994). O NO combina-se com o O₂⁻ produzido como subproduto da cicloxigenase (COX), xantina oxidase ou outra fonte para

formar ONOO^- , o que agrava o dano tecidual (BECKMAN et al., 1996). Portanto, a elevação de aminoácidos excitatórios mediada das concentrações intracelulares de Ca^{++} ativa tanto a COX quanto a NOS contribuindo sinergicamente para a lesão isquêmica cerebral (NOGAWA et al., 1998). No entanto, após sete dias no tecido cerebral, o NO é reduzido abaixo dos níveis detectáveis indicando uma deficiência de NO duradoura no cérebro isquêmico (NIWA et al., 2001).

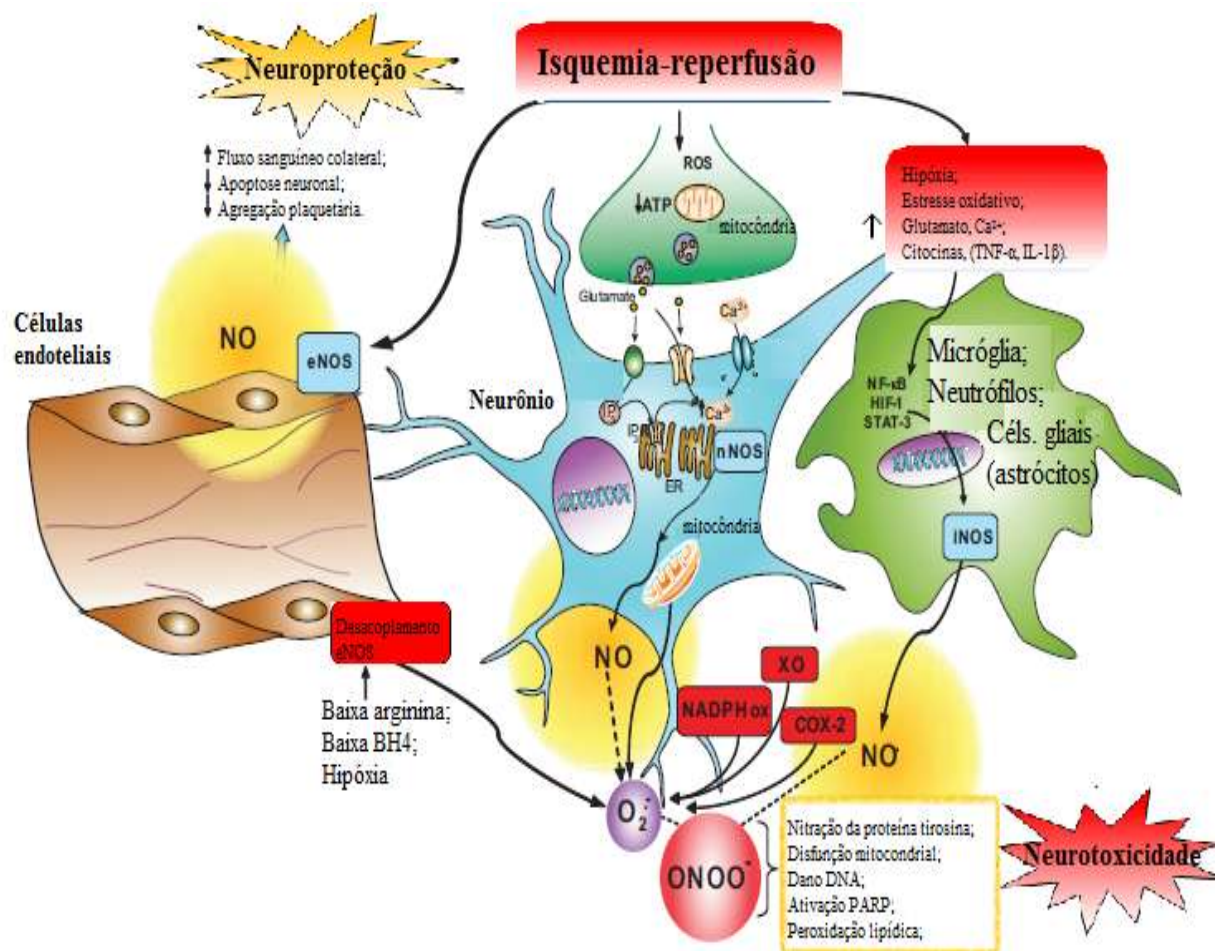


Figura 5 - Envolvimento do NO na fisiopatologia do AVC. Adaptado de PACHER et al., 2007.

1.4.5 Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome complexa de caráter sistêmico, definida como disfunção cardíaca que ocasiona inadequado suprimento sanguíneo para atender

necessidades metabólicas tissulares, na presença de retorno venoso normal, ou fazê-lo somente com elevadas pressões de enchimento. As alterações hemodinâmicas comumente encontradas na IC envolvem resposta inadequada do débito cardíaco e elevação das pressões pulmonar e venosa sistêmica. Na aferida em avaliação de pacientes, sua determinação serve para avaliar resposta terapêutica e contribuir para a determinação do melhor momento para intervenções (BOCCHI et al, 2009).

O NO pode modular a maioria das grandes intervenções inotrópicas e praticamente todas as medidas regulamentares de acoplamento excitação-contração. No decurso da descompensação cardíaca, provavelmente várias influências das características centrais que compõe a insuficiência cardíaca como a dilatação das cavidades e defeito na resposta adrenérgica levam a alterações inotrópicas e propriedades lusitrópicas e arritmogênese (HOSHIJIMA et al., 2002). A descoberta da modulação da contratilidade cardíaca pelo NO tem despertado interesse considerável e de esperança na possibilidade de reverter a disfunção cardíaca com inibidores da NOS. No entanto, isso não pode ser facilmente alcançado porque a influência do NO endógeno não é unidirecional, mas complexa e varia de acordo com a etiologia e estágio da doença e, acima de tudo, a inibição iNOS negligencia a especialização e confinamento espacial de sinalização por cada isoforma do NOS tanto no músculo cardíaco e quanto na vasculatura (MASSION et al., 2003).

1.4.6 Desordens no sistema nervoso central

Em doenças neurodegenerativas, o NO é produzido em excesso por indução de iNOS devido à resposta pró-inflamatória, que é uma característica comum em desordens neurodegenerativas. Além disso, o NO é muito mais prejudicial em condições patológicas que envolvem EROs, tais como O_2^- e a formação de $ONOO^-$ (GUIX et al., 2005; PACHER et al., 2007). A formação de nitrotirosina, um marcador de estresse nitrosativo, tem sido documentada em pacientes com as doenças de Alzheimer e de Parkinson (GOOD et al., 1998; SULTANA et al., 2006). Além disso, o NO ativa a isoforma constitutiva e indutível da COX, a qual é supra-regulada em células cerebrais em condições pró-inflamatórias (MOLLACE et al., 2005). Durante o ciclo catalítico da COX ocorre a liberação de radicais livres e a formação de prostaglandinas, dois eventos que estão intimamente relacionados com o desenvolvimento da neuroinflamação (MANCUSO et al., 2007). Curiosamente, a COX indutível é regulada

positivamente em cérebro de pacientes afetados com a doença de Alzheimer e é considerado um marcador de progressão de demência da doença (MOLLACE et al., 2005; MANCUSO et al., 2007). Com base nisso, a ativação da COX induzida pode ser considerada como uma forma indireta do NO exercer a neurotoxicidade.

1.4.7 Câncer

O NO parece exercer uma dicotomia de efeitos em diversos estágios do câncer. Os primeiros estudos apresentam o NO como um potente indutor da citotoxicidade mediada por macrófagos (HIBBS JR. et al., 1987). Em muitos casos o NO parece realmente aumentar a proliferação de células cancerígenas (ENGIN, 2011). Uma ideia comum entre os estudos recentes relacionados ao câncer e o NO é que a capacidade do NO em aumentar ou inibir a proliferação do tumor é dependente da concentração de NO. Maiores níveis de NO estão correlacionados com a indução de apoptose de células tumorais, enquanto níveis mais baixos têm sido correlacionados com a sobrevivência do tumor avançado (ENGIN, 2011). Além disso, elevadas concentrações de NO têm sido associados a elevados níveis de p53, capaz de provocar apoptose. Por outro lado, sugere-se que as concentrações mais baixas de NO levam a alterações do gene p53 e, conseqüentemente, a sobrevivência das células. Além da concentração de NO, acredita-se que o tipo de célula e o respectivo padrão de expressão de proteínas afetam significativamente o impacto do NO sobre a sobrevivência e proliferação celular (ARANDA et al., 2012; INADOMI et al., 2012; KORiyAMA et al., 2012).

O NO promove a progressão do tumor e a metástase (Figura 6), mantendo o fluxo sanguíneo do tumor através da angiogênese, a maturação e dilatação dos vasos. O NO induz a migração e proliferação de células do endotélio vascular, o recrutamento das células derivadas da medula óssea e das células perivasculares. A indução da hiperpermeabilidade vascular por NO contribui para a formação da matriz extracelular do tumor e aumenta a angiogênese e o crescimento tumoral. A diminuição da adesão de leucócitos e os efeitos citotóxicos do NO pode permitir que os tumores escapem do ataque de células imunes. Aliado a isso, a linfangiogênese e a manutenção do fluxo de linfa podem também contribuir para a metástase linfática. Por outro lado, os efeitos citotóxicos do NO reduzem os níveis de vários fatores de promoção de crescimento, que são derivados de células do estroma não neoplásicos e podem, portanto, resultar na regressão do tumor. Como a agregação de plaquetária contribui para a

metástase, a sua redução pelo NO também pode inibir a metástase (FUKUMURA et al., 2006).

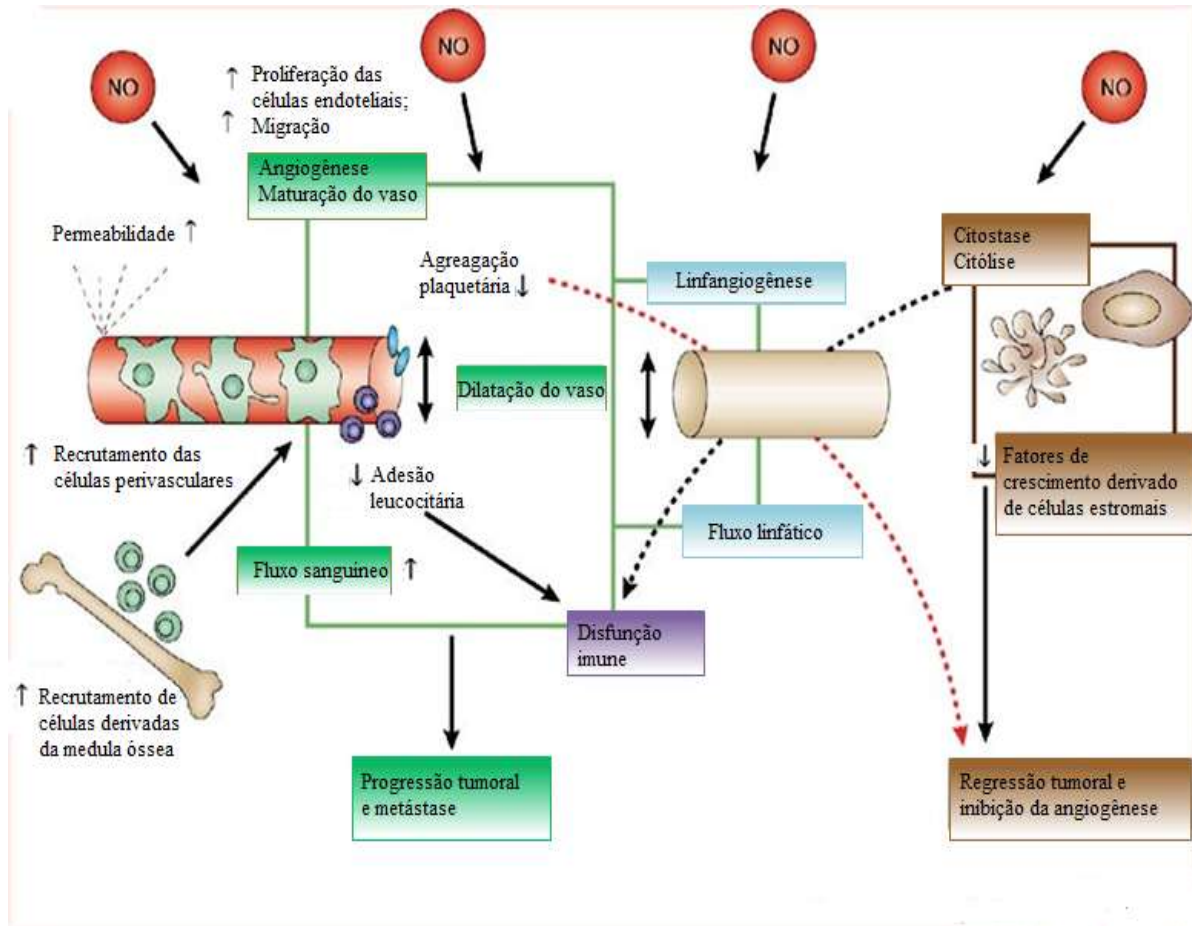


Figura 6 - Mecanismos de ação do NO durante o processo cancerígeno. Adaptado de FUKUMURA et al., 2006.

1.4.8 Sepsis

O conceito de sepsis abrange as situações nas quais se estabelece síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) desencadeada por infecção suspeita ou confirmada (MARTIN, 2006). Do ponto de vista clínico, a apresentação da sepsis se relaciona a múltiplas possibilidades de interação entre homem e microrganismo. Sepsis, sepsis grave e choque séptico são estágios evolutivos de uma mesma condição, com progressivo aumento da disfunção/falência orgânica e mortalidade (BATISTA et al., 2011).

A sepse é frequentemente associada a uma alteração no balanço entre o O₂ disponível e o seu consumo, com uma redução na extração de O₂ pelos tecidos associada a uma alteração importante na regulação da microcirculação devido à invasão de parasitas ou endotoxinas na circulação sanguínea. Além dessas alterações, o choque séptico é caracterizado pela presença de uma vasodilatação periférica acentuada que não responde à terapia vasoconstritora, do ponto de vista hemodinâmico, é evidenciado por uma baixa resistência vascular sistêmica e pela falência de pelo menos um órgão, (AKAMINE et al., 1994).

Atualmente, está bem estabelecido que o NO exerce um papel fundamental da etiopatogenia das anormalidades fisiopatológicas que caracterizam a sepse (MONCADA et al., 1991). Também é conhecido que na sepse existe alteração na concentração de O₂, que não é a mesma em todos os órgãos. Os leitos vasculares destes órgãos estão comprometidos, não respondendo adequadamente a estímulos vasodilatadores dependentes do endotélio (PETROS et al., 1991). Diferentes explicações podem ser sugeridas para o efeito ambíguo do NO durante o choque séptico. Em primeiro lugar, não há dúvida sobre o efeito prejudicial do NO em excesso como o vasorelaxamento, hipotensão e choque. A hipotensão mediada pelo NO leva à hipóxia grave em órgãos vitais periféricos, resultando em falha progressiva dos órgãos.

Devido ao fato do aumento do número de pacientes com infecções na corrente sanguínea, a sepse tem sido alvo de diversos estudos. Em camundongos com infecção sanguínea induzida pela *C. albicans* os quais foram tratados com a frutose-1,6-bisfosfato (FBP), observou-se a diminuição da expressão de iNOs, com a respectiva redução do NOx, conseqüentemente, houve uma maior sobrevivência desses animais (SANTOS et al., 2012). O NO também pode contribuir diretamente para lesões de tecido e de órgãos, devido os efeitos diretos mediados pelo ONOO⁻ citotóxicos. Acredita-se que o NO pode causar o relaxamento de vasos sanguíneos através da ativação do GMPc que conduz à ativação das proteínas quinases dependentes de GMPc (PKGs) (LUCAS et al., 2000).

1.5 Óxido nítrico: efeitos protetores ao organismo

O NO é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. O mecanismo de sinalização intercelular é, em geral, realizado através de receptores de membrana na célula alvo. Estes receptores são, habitualmente, transmembranosos, tendo contato com citoplasma e desencadeando uma “cascata” de sinais intracelulares que

finalizarão em uma mudança na célula. Pelas suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos. Devido à sua penetração intracelular sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida (BRYAN, 2006).

O NO também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poderes bactericidas (LU et al., 2013), antiparasitário (ASCENZI et al., 2003) e antiviral (MEHTA et al., 2012). Nestes casos, o NO atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos microrganismos invasores. Existe um limite tênue de concentração tissular entre a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação anti-microbiana. No caso de doenças auto-imunes e situações de sobrecarga exageradas do organismo, o NO encontra-se em concentrações tóxicas para as células do organismo. Portanto, o NO atua como toxina conforme a concentração e o tecido em questão, devendo ainda ser considerada a capacidade de depuração tecidual. A determinação destas concentrações tissulares relativas ainda permanece desconhecida. Além de manter a tonalidade vasodilatador basal, o NO tonicamente inibe a agregação de plaquetas, adesão de leucócitos, e a proliferação do músculo liso, modula a respiração, e exerce atividade antioxidante e anti-inflamatória (BRYAN, 2006).

1.5.1 Sistema cardiovascular

Devido aos estudos pioneiros do EDRF por Furchgott (1984), a ação vasoprotetora do NO é bem conhecida. O NO antagoniza as contrações da musculatura lisa vascular e inibe a ativação plaquetária. Atuando nas integrinas, o NO modifica a adesividade leucocitária e a diapedese dos neutrófilos (FURCHGOTT et al., 1984). No endotélio vascular ocorre liberação continuada de NO, responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo tecidual e controle do extravasamento tecidual. O NO-mensageiro produzido no endotélio tem função vasodilatadora fisiológica. Assim, durante exercício físico ocorre aumento do débito cardíaco e redistribuição do fluxo sanguíneo para musculatura esquelética e circulação coronariana. Este mecanismo é mediado pela eNOS, cuja expressão genética pode ser potencializada com exercícios aeróbios regulares (SHEN et al., 1995). Entretanto, a função principal do NO é a exercida no controle de adesão dos elementos sanguíneos (leucócitos e plaquetas) ao

endotélio (KUBES et al., 1991). Por este mesmo mecanismo, o NO diminui a permeabilidade vascular.

1.5.2 Sistema bronco-pulmonar

Considera-se o NO-mensageiro produzido a partir da eNOS como responsável pela homeostase das vias aéreas. O NO mantém o calibre brônquico e regula a frequência dos movimentos ciliares, na circulação pulmonar, equilibrando a relação ventilação-perfusão. A iNOS epitelial bronquial é responsável pela defesa imunológica a agentes externos inalados, principalmente pelo recrutamento de macrófagos epiteliais e subepiteliais (NATHAN, 1995). Isto é configurado pela queda da resistência às infecções bronco-pulmonares com administração de análogos da L-arginina *in vitro* e *in vivo* (HIBBS et al., 1987).

1.5.3 Sistema renal

O NO-mensageiro é sintetizado fisiologicamente nos rins, exercendo importantes funções de homeostase no fluxo sanguíneo e excreção renal. O bloqueio experimental da produção do NO-mensageiro leva à diminuição da irrigação renal e queda da eliminação de sódio (BACHMANN et al., 1995).

Nos rins foram isoladas as três isoformas da NOS. Na mácula densa constatou-se forte presença da isoforma nNOS e nas arteríolas glomerulares foram encontradas as isoformas nNOS e eNOS nos ramos aferentes e eferentes, com maior concentração nas arteríolas eferentes. A presença da isoforma nNOS é importante nos vasos aferentes pré-glomerulares pela estreita correlação com liberação de renina (BACHMANN et al., 1995). A ação do NO-mensageiro sobre a secreção do sistema renina-angiotensina tem óbvias implicações terapêuticas, porém os achados ainda são discrepantes.

1.5.4 Sistema nervoso

O NO é um poderoso vasodilatador cerebral mantendo o fluxo cerebral basal e levando a aumento do fluxo sanguíneo sob atividade neuronal intensa (IADECOLA, 1993). O NO-mensageiro é considerado um neurotransmissor. No sistema nervoso central (SNC) a primeira evidência do papel do NO como neurotransmissor foi demonstrada pela liberação de uma molécula difusível, com propriedades semelhantes às produzidas pela EDRF após a estimulação dos receptores de *N*-metil D-aspartato (NMDA) pelo glutamato (GARTHWAITE & BOULTON, 1995). Atualmente, o papel do NO no SNC está sendo alvo de um grande número de estudos, que evidenciam sua participação em funções cognitivas, plasticidade sináptica, no controle do sono, apetite, temperatura corporal e neurosecreção (GUIX et al., 2005; CALABRESE et al., 2007).

1.6 Análise quantitativa do óxido nítrico

O NO tem uma meia-vida biológica curta (milissegundos ou menos, dependendo do ambiente), que faz a sua determinação direta *in vivo* difícil (ROMITELLI et al., 2007). Portanto, a avaliação de NO_2^- e NO_3^- (NOx) em fluidos biológicos, nomeadamente no plasma, soro e urina, é o método mais adequado para avaliar a síntese indireta de NO *in vivo* (LEONE et al., 1994; TSIKAS, 2000; ROMITELLI et al., 2007). NO_2^- e NO_3^- são os principais metabólitos estáveis de NO endógeno e são acessíveis à análise quantitativa (ROMITELLI et al., 2007).

O método mais utilizado para a análise de NOx é baseado na reação de Griess, (TSIKAS, 2000; ROMITELLI et al., 2007). Este é um método simples, barato e rápido para quantificação de NOx, tornando seu uso popular, especialmente em ambientes clínicos (SASTRY et al., 2002; ROMITELLI et al., 2007). Desenvolvido pela primeira vez em 1879, por Johan Peter Griess, o ensaio de Griess mede indiretamente o NO como nitrito, um produto da auto-oxidação do NO (GRIESS, 1879; TSIKAS, 2000; MIRANDA et al., 2001; ROMITELLI et al., 2007). Como apresentado na Figura 7, o NO é liberado a partir da amostra sendo convertido em nitrito, este reage com a sulfanilamida para formar um sal de diazônio intermediário, que subsequentemente reage com *N*- (1-naftil) – etilenodiamina para

formar um corante azo. A formação do corante azo é então monitorada espectrofotometricamente a 540-550 nm.

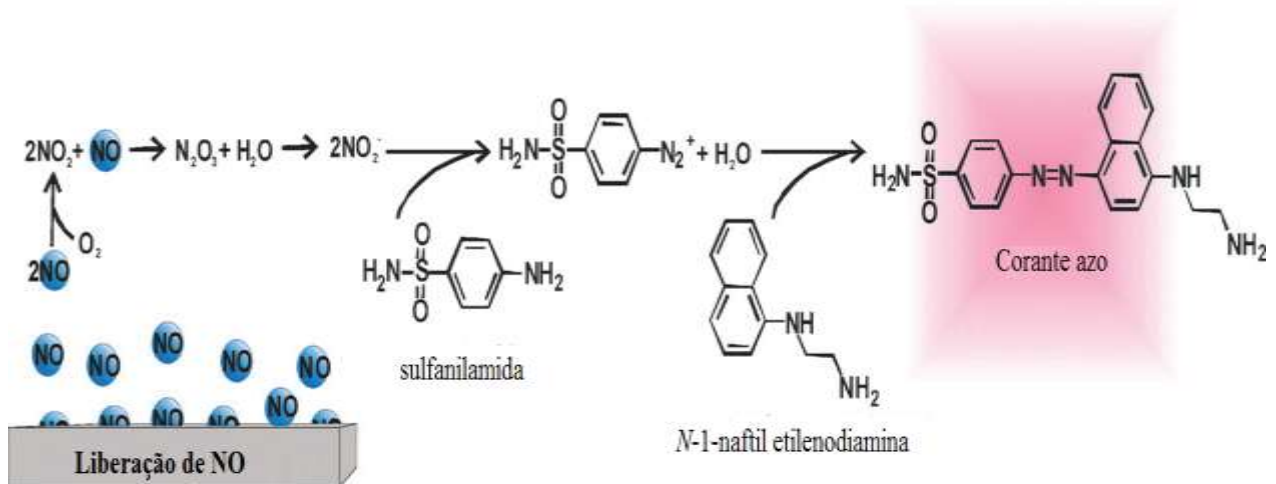


Figura 7 – Reação do nitrito com o ensaio de Griess. Adaptado de CONESKI & SCHOENFISH, 2012.

As proteínas interferem com a determinação de NO_2^- e NO_3^- no ensaio de Griess (TSIKAS, 2000) e, por conseguinte, a desproteinização da amostra é indispensável para evitar interferências em leituras espectrofotométricas a 540-550 nm (DUSSE et al., 2005; MOSHAGE et al., 1995). A remoção incompleta de proteínas em amostras de soro pode ser a causa de interferências consideráveis no ensaio de Griess (ROMITELLI et al., 2007).

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 os anticoagulantes citrato e o EDTA (BRYAN & GRISHAM, 2007). Para Ricart-Jané e colaboradores (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 mantidas à -20°C pelo período de quatro meses (TATSCH et al., 2011b)

1.7 Interferentes laboratoriais

Os erros pré-analíticos ainda representam cerca de 60% a 70% de todos os erros que ocorrem em diagnóstico laboratorial. A maioria desses erros é atribuível ao manuseio incorreto durante a coleta e a preparação das amostras para os testes laboratoriais (LIPPI & SIMUNDIC, 2010; LIPPI et al., 2006a, LIPPI et al., 2011). Embora a maioria desse tipo de erro possa ser “interceptado” por profissionais de laboratório, em aproximadamente um quinto dos casos, esses erros podem estar associados com investigações incorretas, aumento injustificável de custo e em especial, em 6,4% dos casos, podem ser a causa de cuidados impróprios ou modificações inadequadas na terapia (LIPPI et al., 2011). A principal razão pela alta prevalência de erros nesta etapa crucial do processo consiste na dificuldade de controlar todas as variáveis, especialmente quando não estão sob a supervisão direta, como no caso da flebotomia. Outros fatores pré-analíticos comuns que resultam em erros de mensuração laboratorial incluem a utilização de materiais de coleta inapropriados, excessivo tempo de espera entre a coleta e análise da amostra, armazenamento da amostra em temperatura inadequada antes da análise, entre outros (LIPPI et al. 2006a; LIPPI et al., 2011).

Apesar de esses fatores serem responsáveis por alguns tipos de erros de medição, a presença de substâncias interferentes na amostra constitui a maior causa de rejeição de amostras em laboratórios clínicos (KAZMIERCZAK & CATROU, 1998). De acordo com Kroll & Elin (1994), substâncias interferentes são definidas como “efeito de uma substância presente na amostra que altera o valor correto do resultado”. Com base nisso, os interferentes podem levar a testes inadequados, diagnósticos incorretos e tratamentos com resultados potencialmente desfavoráveis aos pacientes. Considerando esses fatores, seria de fundamental importância dispor de informações específicas a respeito do impacto que as interferências provocam nos resultados de diferentes dosagens bioquímicas.

1.8 Classificação dos interferentes

Os interferentes são classificados de acordo com a fonte de interferência. A concentração excessiva ou a atividade da substância na amostra pode surgir a partir de fontes endógenas ou exógenas. A interferência endógena origina-se a partir de substâncias que

ocorrem naturalmente na amostra do paciente. Estas podem ser substâncias naturais ou fatores relacionados com a saúde como a icterícia, lipemia e hemólise (KROLL & ELIN, 1994; KAZMIERCZAK & CATROU, 1998). Os resultados de interferência relacionados a substâncias exógenas não são encontrados naturalmente na amostra do paciente. Incluem-se nessa categoria fármacos, venenos, produtos naturais, substâncias utilizadas como terapia (anticorpo, por exemplo). Também pode resultar em componentes presentes em tubos de coleta para promover ou inibir a coagulação sanguínea ou preservar certos constituintes (DIMESKI, 2008).

1.8.1 Icterícia

A bilirrubina é o principal produto final de degradação da porção heme da hemoglobina e de outras hemoproteínas em mamíferos (BRITO et al., 2006). O metabolismo da bilirrubina inicia no sistema retículo endotelial, principalmente no fígado e baço, com a remoção dos eritrócitos velhos ou anormais da circulação. O catabolismo resultante divide a molécula de hemoglobina em heme e globina. O heme é convertido para a forma não-conjugada da bilirrubina, o qual é liberado para o plasma (REISER, 2004). A bilirrubina não-conjugada é transportada no sangue ligada à albumina e sofre a biotransformação necessária para a sua excreção (BRITO et al., 2006). A bilirrubina não-conjugada é lipossolúvel e tóxica para os tecidos. A sua deposição na pele e nas membranas mucosas constitui-se na condição fisiológica conhecida como icterícia. A icterícia torna-se clinicamente visível a níveis de bilirrubina sérica a partir de 5-7 mg/dL (REISER, 2004). Devido à hemólise aumentada e à imaturidade dos mecanismos de disposição de bilirrubina no período neonatal, praticamente todos os recém-nascidos têm níveis séricos de bilirrubina não-conjugada moderadamente elevados nos primeiros dias de vida, uma condição conhecida como icterícia fisiológica do recém-nascido (BRITO et al., 2006). Além disso, o desequilíbrio entre produção e excreção de bilirrubina pode ser observado em qualquer tipo de hemólise, seja congênita (esferocitose hereditária, por exemplo) ou adquirida, como a malária (GILMORE & GARVEY, 2008). Sendo assim, as causas da icterícia podem ser diversas, podendo ser de ordem hematológica, falha de captação hepática devido a fármacos ou algum tipo de obstrução hepática, conforme pode ser observado na Figura 8.

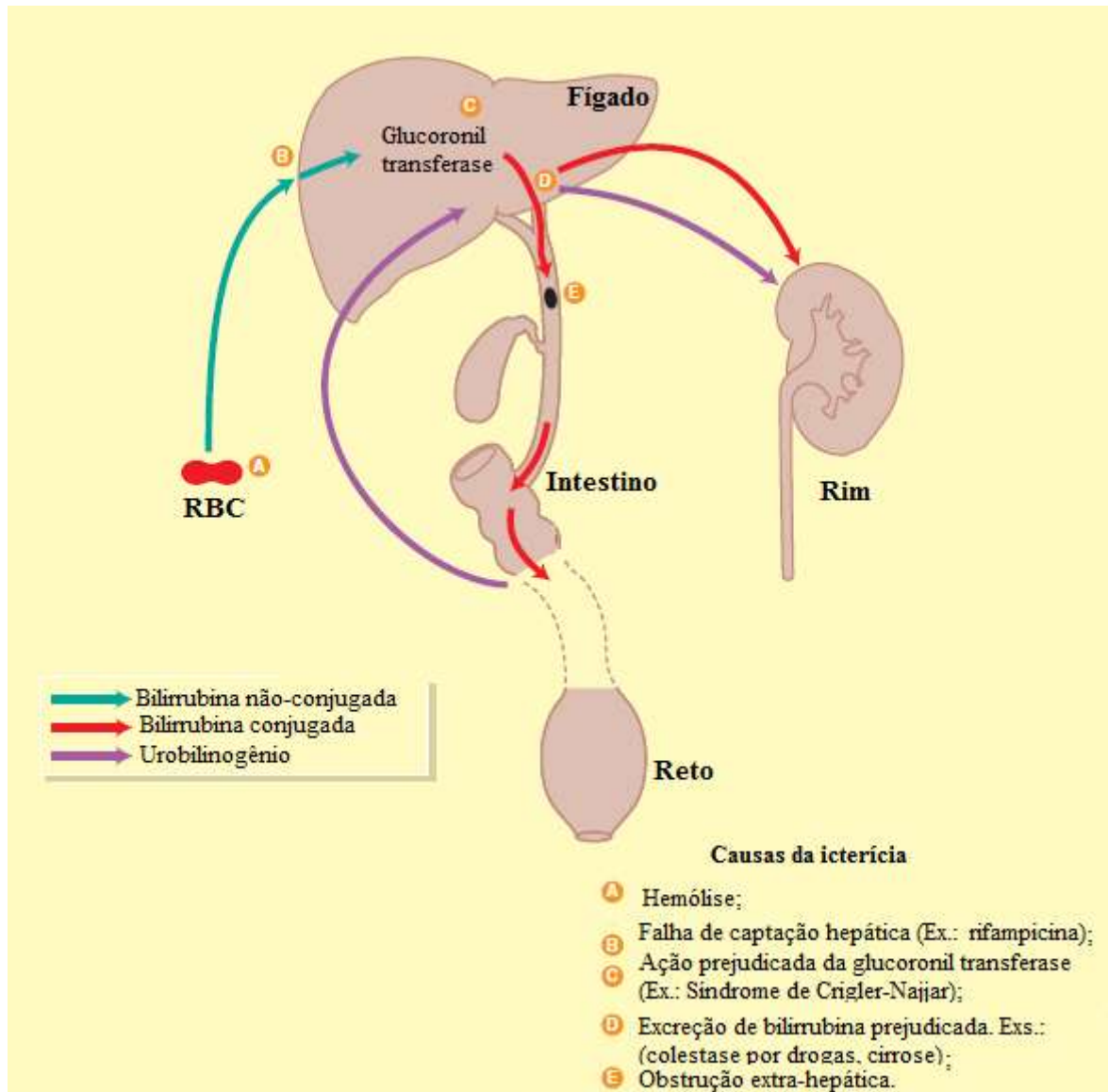


Figura 8 - Causas da icterícia. Adaptado de GILMORE & GARVEY, 2007.

Após a centrifugação da amostra, a icterícia pode ser visível no soro ou no plasma. Contudo, a avaliação visual não é sensível e pode não ser confiável quando comparada à detecção por espectrofotometria (PIYOPHIRAPONG et al., 2010). Estudos anteriores indicam que a bilirrubina interfere nas dosagens de creatinina, glicose, colesterol, triglicérides, fósforo, ácido úrico e na mensuração das proteínas totais (KROLL & ELIN, 1994; PIYOPHIRAPONG et al., 2010). Além disso, têm sido relatados os efeitos da interferência da bilirrubina no método de *Jaffé* utilizado na medição de creatinina (DIMESKI, 2008, PIYOPHIRAPONG et al., 2010). Parte da interferência surge a partir das propriedades

espectrais da bilirrubina; outra parte da capacidade que a bilirrubina tem em reagir quimicamente com os reagentes (SAIBABA, 1998; PIYOPHIRAPONG et al., 2010).

1.8.2 Lipemia

A lipemia representa a turbidez em amostras biológicas, como o soro ou plasma, a qual, muitas vezes, é visível antes do processo de análise. A causa principal consiste nas partículas de quilomícrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) que ficam em suspensão, provocando a dispersão da luz, interferência de turvação ou deslocamento de volume (KROLL & ELIN, 1994; SAIBABA, 1998; MEANY et al., 2008; PIYOPHIRAPONG et al., 2010; JI & MEN 2011). Assim, a lipemia é geralmente reconhecida quando as concentrações de triglicerídeos estão acima de 300 mg/dL (PIYOPHIRAPONG et al., 2010). A prevalência da lipemia é menor do que a de outros interferentes, tais como à hemolise, mas ainda aparece em cerca de 1% das amostras. Amostras lipêmicas são frequentemente encontradas na prática de laboratórios de análises clínicas e podem causar interferências significativas nos resultados analíticos de diferentes parâmetros bioquímicos (RYDER et al., 1993; KROLL & ELIN, 1994). As causas mais comuns da ocorrência de lipemia são dieta, ingestão de álcool, diabetes *mellitus*, hipertrigliceridemia, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, pancreatite, mieloma múltiplo, cirrose biliar primária, lúpus eritematoso, uso de fármacos tais como inibidores de protease (HIV), o estrogênio e anticoncepcionais orais (CALMARZA & CORDERO, 2011). Além de condições fisiopatológicas, os erros pré-analíticos são responsáveis por uma grande proporção de amostras lipêmicas (isto é, tempo indevido de amostragem após uma refeição ou após a infusão intravenosa de triglicerídeos ricos em emulsões para nutrição parenteral) e, como tal, pode ser evitada (LIPPI et al., 2011).

Interferências lipêmicas encontradas em exames de rotina de bioquímica clínica podem interferir em praticamente todos os testes que utilizam a transmissão de luz como parte do sistema de medição (PIYOPHIRAPONG et al., 2010; CALMARZA & CORDERO, 2011). A interferência lipêmica decorre principalmente de três mecanismos distintos: dispersão de luz, aumento da fase não aquosa e os efeitos de partição entre as fases polares e não polares (CALMARZA & CORDERO, 2011). Com isso, a turbidez pode afetar a absorvância em espectrofotometria em quase todos os comprimentos de onda e, portanto, os valores analíticos

podem não estar corretos (KROLL & ELIN, 1994; PIYOPHIRAPONG et al., 2010). O grau de interferência lipêmica é relacionado com o tamanho e número de partículas de lipoproteína de amostra. Nos métodos eletroforéticos e cromatográficos, o aumento da proporção de lipoproteínas pode causar picos adicionais ou ruído de fundo. Ao medir a concentração de eletrólitos por fotometria de chama, há uma falsa diminuição das concentrações observadas devido à redução do volume de fase aquosa da amostra. Após a centrifugação, as amostras lipêmicas não são homogêneas, o que resulta em uma falsa diminuição das concentrações de constituintes solúveis em água na camada lipídica superior (CALMARZA & CORDERO, 2011). Com isso, a lipemia não somente pode influenciar as medições de fósforo, glicose, bilirrubina total, ácido úrico e proteína total, mas também causa um falso aumento do colesterol total e da lipoproteína de alta densidade (HDL) (KROLL & ELIN, 1994; SAIBABA, 1998; PIYOPHIRAPONG et al., 2010).

De acordo com as recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), vários protocolos têm sido propostos a fim de eliminar a lipemia antes da mensuração dos testes laboratoriais. A ultracentrifugação deve ser considerada como a abordagem preferida. No entanto, uma vez que este tipo de equipamento não está disponível na maioria dos laboratórios devido aos custos elevados, a microcentrifugação em alta velocidade pode, contudo, ser considerada como eficiente quando lipemia é predominantemente devido à quilomícrons (DIMESKI & JONES, 2011). Vários outros métodos baseiam-se igualmente na remoção física da camada de lipoproteína (a extração com solventes hidrofóbicos ou precipitação). No entanto, deve se ter atenção quando se avalia a concentração de componentes hidrofóbicos nestas amostras, porque, como resultado da remoção de lipoproteína, a sua concentração é então falsamente reduzida na fase aquosa (BORNHORST et al., 2004).

1.8.3 Hemólise

A hemólise é uma preocupação crescente nos laboratórios clínicos, sendo uma ocorrência muito frequente, com uma prevalência alta (3,3%) de todas as amostras submetidas a um laboratório clínico (CARRARO et al., 2000). A hemólise é definida como a liberação dos componentes intracelulares de eritrócitos, trombócitos e leucócitos no fluido extracelular, ou seja, no plasma ou soro (KIRSCHBAUMWEG & DEUTSCHLAND, 2002;

PIYOPHIRAPONG, et al., 2010). Constitui-se hemólise uma coloração vermelha no plasma ou soro após a centrifugação, com os níveis de hemoglobina livre em torno 300 mg/L, concentração mínima para a detecção visual da hemólise (KIRSCHBAUMWEG, 2002; RIOJA et al., 2009; PIYOPHIRAPONG, et al., 2011). No entanto, na prática, a variedade de coloração do plasma/soro normal, devido à presença de outros pigmentos (bilirrubina, carotenos), torna muito difícil a detecção confiável da hemoglobina da forma visual quando a sua concentração é menor que 200 mg/L (RIOJA et al., 2009). A destruição das células vermelhas do sangue com posterior liberação de hemoglobina e outros conteúdos intracelulares para o plasma pode ocorrer tanto no interior dos vasos sanguíneos devido a condições patológicas (ou seja, hemólise '*in vivo*') ou durante a coleta, manuseio e processamento das amostras anteriormente das medições analíticas constituindo a hemólise "*in vitro*" (GUDER et al., 2000).

A hemólise *in vivo* pode ser provocada por um grande número de condições clínicas, incluindo severas infecções bacterianas (especialmente as causadas por bactérias Gram-positivas, tais como *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp. ou *Staphylococcus* sp) ou parasitárias, como as espécies de *Plasmodium*, responsáveis pela transmissão da malária, a qual provoca hemólise intracelular. Um caso adicional de hemólise *in vivo* são os auto-anticorpos, ou um evento de sensibilização secundária, como a incompatibilidade de grupos sanguíneos ou a anemia hemolítica auto-imune. Outras causas frequentes de hemólise *in vivo* incluem hereditariedade, condições iatrogênicas, hemoglobinopatias, drogas, coagulação intravascular disseminada, outras reações transfusionais menos comuns, válvulas cardíacas e a síndrome HELLP (hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetopenia). A hemólise *in vivo* é um dos principais desafios para os laboratórios clínicos, uma vez que é independente da técnica utilizada para a coleta sanguínea de sangue e, por conseguinte, acaba sendo inevitável e potencialmente intransponível (LIPPI et al., 2008). Por outro lado, a hemólise *in vitro* depende principalmente da técnica de coleta sanguínea e também pode ocorrer devido ao manuseio, armazenamento e processamento das amostras (KROEBKE et al., 1983). No entanto, as fontes de hemólise *in vitro* associadas com a punção venosa são as mais prevalentes (LIPPI et al., 2006b). Sangue forçado por uma agulha muito fina produz frequentemente dano ou rompimento das células sanguíneas. Além disso, a localização incomum da punção venosa, antissépticos incomuns utilizados anteriormente à flebotomia, longa aplicação de torniquete, mistura muito vigorosa ou nenhuma mistura dos tubos primários, tubos ou seringas com muito volume, são as causas mais importantes (CARRARO et al., 2000).

Após a coleta das amostras de sangue, pelo menos outros três fatores presentes na fase pré-analítica devem ser cuidados a fim de evitar a deterioração: transporte, centrifugação e armazenamento. Transporte realizado através do correio, especialmente por muito tempo ou sob temperaturas e condições extremas, pode danificar as células no interior dos tubos, provocando a sua ruptura. A centrifugação pré-transporte também aumenta o percentual de amostras hemolisadas. O transporte pneumático também tem sido implicado na hemólise *in vitro* (SODI et al., 2004). Finalmente, as condições inadequadas (ou seja, tempo, temperatura) de armazenamento podem afetar negativamente a integridade das amostras. Como tal, o grande número e a complexidade de todas essas possíveis causas de hemólise *in vitro* destaca a importância da educação e treinamento do pessoal envolvido na coleta sanguínea.

Aliado a isso, a hemólise pode interferir em parâmetros bioquímicos, causando um aumento da aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), lipase, magnésio, fósforo, potássio, uréia, fosfatase alcalina, bilirrubina, glicose e sódio. A interferência pode ser causada quimicamente por alguns componentes intracelulares que são liberados a partir de células vermelhas do sangue ou opticamente devido ao efeito de coloração de hemoglobina (PIYOPHIRAPONG et al., 2010). O estudo de Bateman e colaboradores (2001) demonstra que o método de quimiluminescência também sofre interferência da hemólise durante a mensuração do NOx. No entanto, não foi investigado o impacto dessa interferência em amostras não-desproteinizadas.

1.9 Avaliação da interferência *in vitro*

Os estudos de interferência *in vitro* são realizados utilizando matrizes de amostras que são equivalentes às amostras de pacientes. Com base nisso, alguns protocolos têm sido implementados com o objetivo de investigar a suspeita de interferentes. Sendo assim, o método mais citado entre os autores e recomendado pela CLSI C56 (2012) é o que realiza a adição de substâncias exógenas, simulando o efeito do interferente nas amostras. Para isso, a triagem dos efeitos de interferências pode ser simulada com as substâncias do tipo Intralipid[®], hemoglobina purificada e bilirrubina bovina não-conjugada (KAZMIERCZAK et al.; 1998). Em especial, para a realização da avaliação dos interferentes nos parâmetros de icterícia, lipemia e hemólise são previstos o uso de diferentes concentrações dos analitos a partir da

aplicação de uma curva contendo no mínimo quatro tipos de concentrações diferentes (GLICK, et al., 1986).

1.10 Estabelecimento de valores de referência

O objetivo principal do laboratório clínico é a detecção de mudanças em vários constituintes, tanto de origem endógena e exógena, por circunstâncias fisiológicas ou patológicas, oferecendo uma série de valores quantitativos, com fins preventivos, de diagnóstico e de controle de tratamento (SOLBERG, 1987). Estes valores devem ser interpretados em relação a valores semelhantes obtidos em condições fisiológicas. Os valores obtidos em condições fisiológicas podem ser sujeitos a variação genética, a origem constitucional ou ambiental, bem como aquelas introduzidas pela administração de fármacos ou outros agentes terapêuticos. É de competência do laboratório clínico a produção e interpretação dos valores analíticos, assim como, o estabelecimento de valores de referência com base na população que utiliza os seus serviços e na metodologia empregada no laboratório (ALBERT, 1990).

O conceito de valores de referência foi formulado pelo painel de especialistas da *International Federation of Clinical Chemistry – IFCC* (SOLBERG, 1987), definindo-o como resultado analítico obtido com um indivíduo de referência. Este indivíduo é uma pessoa que pertence à comunidade que serve o laboratório em questão, e que se caracteriza principalmente por desfrutar de um estado de saúde definida pelo pesquisador, e não sendo um estado de saúde “absoluto”. Essa flexibilidade na definição de indivíduo de referência permite estabelecer valores de referência utilizando grupos peculiares tanto por seu estado fisiológico (mulheres grávidas, por exemplo) patológico (insuficiência renal em tratamento com diálise) história farmacológica (mulheres que fazem uso de contraceptivos orais), sem prejuízos na teórica. Todos os indivíduos que satisfaçam as condições de inclusão definidos pelo pesquisador constituem na população de referência. O número de pessoas dentro da população de referência muitas vezes é imenso, e, portanto, impossível de se obter. Por esta razão, utiliza-se a teoria de amostragem estatística definindo a amostra de referência como um grupo representativo da população de referência sobre as determinações analíticas analisadas e sobre os dados obtidos definindo os parâmetros da população (FRIEDBERG, 2007).

De acordo com a IFCC (1987), os valores de referência com base na população são obtidos a partir de um grupo de indivíduos-referência sistematicamente definido, com no mínimo 120 pacientes para obter estimativas confiáveis. Sendo assim, a IFCC padroniza um protocolo o qual estabelece todos os procedimentos para a realização do intervalo de referência, desde os critérios de seleção dos indivíduos-referência até a forma de calcular e determinar os limites de referência.

1.10.1 Determinação dos limites de valores de referência

Na prática clínica, um valor observado de um paciente geralmente é comparado com o intervalo de referência correspondente, o qual é limitado por um par de limites de referência. Esse intervalo, o qual pode ser definido de diferentes maneiras, é uma condensação útil da informação carregada pelo grupo total de valores de referência. As categorias de intervalos de referência incluem intervalo de tolerância, intervalo de predição e intervalo interpercentil. Na prática, o mais utilizado é o intervalo interpercentil, por ser simples de se estimar, mais comumente utilizado e recomendado pela IFCC. Esse intervalo é definido como um intervalo limitado por dois percentis de distribuição de referência. Um percentil denota um valor que divide a distribuição de referência de modo que uma porcentagem específica desses valores tenha magnitudes menores ou iguais ao valor limitante (SOLBERG, 2008).

A definição do intervalo de referência com um intervalo central de 95% limitado pelos percentis 2,5 e 97,5 é uma arbitrariedade, isto é, 2,5% dos valores são cortados em ambas as caudas da distribuição de referências. A precisão de um percentil como estimativa de um valor de população depende do tamanho do subgrupo e é menos preciso quando o número de observações é baixo. Caso a realização de uma amostragem aleatória for assumida, é possível determinar o intervalo de confiança do percentil (isto é, os limites dentro dos quais o verdadeiro percentil está localizado com um grau de confiança específico) (SOLBERG, 2008).

Teoricamente, o tamanho mínimo requerido de amostras para a estimativa de percentis 2,5 e 97,5 é de 40 valores. No entanto, 120 valores de referência são necessários para se obterem estimativas confiáveis. O intervalo interpercentil tem sido determinado tanto por métodos estatísticos paramétricos como não paramétricos. O método paramétrico para a determinação de percentis e de seus intervalos de confiança assume um certo tipo de

distribuição e isso se faz com base na estimativa de parâmetros da população, como a média e o desvio-padrão (DP). Em sua maioria, os métodos paramétricos são, de fato, baseados na distribuição gaussiana. Caso a distribuição de referência tenha outra forma, podem ser usadas funções matemáticas que transformam os dados para uma forma mais aproximada da gaussiana. O método não paramétrico não assume nada a respeito do tipo de distribuição e não usa estimativas de parâmetros de distribuição. Os percentis são determinados simplesmente pelo corte de uma porcentagem necessária de valores em cada cauda do subgrupo da distribuição de referência. Quando os resultados obtidos por esses dois métodos são comparados, as estimativas dos percentis quase sempre são muito semelhantes. Geralmente prefere-se um método não paramétrico simples e confiável, especialmente em versão autossuficiente, do que o método paramétrico (SOLBERG, 2008).

1.10.2 Método não paramétrico

Existem diversos métodos não paramétricos disponíveis, mas os baseados em dados ordenados são simples e confiáveis e permitem a estimativa não paramétrica dos intervalos de confiança dos percentis. Os passos em um procedimento não paramétrico descritos por Solberg (2008), são os seguintes:

- 1.** Dispor “n” valores de referência em ordem crescente de magnitude e ordenar os valores. O valor mínimo tem número 1 na classificação, o próximo valor tem número 2 e assim por diante até o valor máximo da classificação número n, ser atingido. Atribui-se então números de classificação consecutivos para dois ou mais valores idênticos (empate de dados).
- 2.** Computar os números classificados dos percentis 2,5 e 97,5 como $0,025(n+1)$ e $0,975(n+1)$, respectivamente.
- 3.** Determinar os percentis encontrando os valores de referência originais que correspondem aos números classificados computados, desde que os números classificados sejam inteiros. Do contrário, é necessária a interpolação entre os dois valores limitantes.
- 4.** Finalmente, determinar o intervalo de confiança de cada percentil por meio da distribuição binomial. A tabela 1 a seguir facilita esse passo para o intervalo de confiança de 0,90 de percentis 2,5 e 97,5. A tabela 2 mostra um exemplo de determinação não paramétrica de percentis utilizando valores de triglicérides séricos.

Tabela 1- Intervalos de confiança não paramétricos dos limites de referência*

Tamanho da amostra	POSIÇÃO DOS NÚMEROS		Amostragem	POSIÇÃO DOS NÚMEROS	
	Inferior	Superior		Inferior	Superior
119-132	1	7	566-574	8	22
133-160	1	8	575-598	9	22
161-187	1	9	599-624	9	23
188-189	2	9	625-631	10	23
190-218	2	10	632-665	10	24
219-248	2	11	666-674	10	25
249-249	2	12	675-698	11	25
250-279	3	12	699-724	11	26
280-307	3	13	725-732	12	26
308-309	4	13	733-765	12	27
310-340	4	14	766-773	12	28
341-363	4	15	774-799	13	28
364-372	5	15	800-822	13	29
373-403	5	16	823-833	14	29
404-417	5	17	834-867	14	30
418-435	6	17	868-871	14	31
436-468	6	18	872-901	15	31
469-470	6	19	902-919	15	32
471-500	7	19	920-935	16	32
501-522	7	20	936-967	16	33
523-533	8	20	968-970	17	33
534-565	8	21	971-1000	17	34

*A tabela mostra a posição dos números do intervalo de confiança de 0,90 do percentil 2,5 para amostras com 119 a 1000 valores. Para obter a posição correspondente dos números do percentil 97,5, subtrair os números de (n1), onde n é o tamanho da amostra. Reproduzido de SOLBERG, 2008.

Tabela 2 - Determinação não paramétrica do intervalo de referência*

Valores sorteados e posicionados de triglicerídeos séricos na cauda esquerda da distribuição										
Valores:	0,41	0,43	0,45	0,46	0,47	0,49	0,51	0,55	0,55	0,55
Posição:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Valores:	0,56	0,58	0,58	0,61	0,61	0,62	0,64	0,64	0,65	0,65
Posição:	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Valores:	2,21	2,22	2,26	2,27	2,27	2,28	2,3	2,31	2,34	2,35
Posição:	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
Valores:	2,48	2,5	2,55	2,62	2,63	2,65	2,72	2,78	2,90	2,91
Posição:	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500

Valores sorteados e posicionados de triglicerídeos séricos na cauda direita da distribuição										
Valores:	2,21	2,22	2,26	2,27	2,27	2,28	2,3	2,31	2,34	2,35
Posição:	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
Valores:	2,48	2,5	2,55	2,62	2,63	2,65	2,72	2,78	2,90	2,91
Posição:	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500

Cálculo da posição dos números dos percentis:

Inferior: $0,025(500+1) = 12,5$
 $0,975(500+1) = 488,5$

Encontro dos valores originais correspondentes à posição desses números:

Limite de referência inferior (percentil 2,5): 0,58

Limite de referência superior (percentil 97,5): 2,32 (por interpolação)

Posição dos números e valores do limite de confiança de 0,90 do limite de referência inferior

Posição dos números (ver tabela 1): 7 e 19

7

Limites de confiança: 0,51 e 0,65

Posição dos números e valores do limite de confiança de 0,90 do limite de referência superior

Posição dos números (ver tabela 1): $500 + 1 - 19 = 482$

$500 + 1 - 7 = 494$

Limites de confiança: 2,22 e 2,62

Resumo:

Limite de referência inferior: 0,58 [0,51-0,65] mmol/L

Limite de referência superior: 2,32 [2,22-2,62] mmol/L

*A tabela mostra um exemplo usando as 500 concentrações de triglicerídeos séricos dispostos. A unidade de todas as concentrações na tabela é de mmol/L. Reproduzido de SOLBERG, 2008.

1.10.3 Apresentação de um valor observado com relação aos valores de referência

Um valor observado (valor do paciente) pode ser comparado com os valores de referência. Essa comparação é frequentemente semelhante ao teste de hipótese, mas raramente é testado estatisticamente no sentido restrito. É aconselhável considerar os valores de referência como um critério para uma avaliação menos formal do que o teste de hipótese. Esse valor pode ser classificado como baixo, normal ou alto (três classes), dependendo de sua localização com relação ao intervalo de referência. Nos relatórios, uma prática conveniente é destacar resultados não usuais (por exemplo, mediante o uso de letras B ou A, para baixo e alto, respectivamente) (SOLBERG, 2008).

Outro método de classificação é a expressão do valor observado em uma medida de distância estatística. Por exemplo, a bem conhecida DP, ou a de desvio normal equivalente, é um tipo de medida e é calculada pela diferença entre o valor observado e a média dos valores de referência dividida por seu DP. Essa medida, contudo, não será confiável se a distribuição dos valores for inclinada (SOLBERG, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a interferência das variáveis icterícia, lipemia e hemólise sobre a concentração sérica dos metabólicos do NO (nitrito/nitrato, NOx), bem como estabelecer valores de referência para NOx em amostras de soro e urina obtidas de uma população saudável.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a interferência pré-analítica da bilirrubina, lipídios e hemólise na mensuração dos níveis metabólicos do NOx;
- Investigar se a desproteinização prévia da amostra é capaz de reduzir o grau de interferência provocada pela icterícia, lipemia e hemólise;
- Determinar os limites de valores de referência para NOx em amostras de soro e urina de acordo com o método não paramétrico e seguindo as recomendações da IFCC.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

As seções “Materiais e Métodos”, “Resultados” e “Discussão” estão apresentadas no próprio manuscrito, o qual foi submetido para publicação no periódico *Biochemia Medica*.

MANUSCRITO

Original Research Communications

Reference values for urinary nitric oxide metabolites and assessment of the interference of preanalytical factors on Griess method

Taís Corrêa Almeida^{a,b}, Carine Lima Hermes^{a,b}, Etiane Tatsch^{a,b}, Bruna dos Santos Hausen^{a,b}, José Antonio Mainardi de Carvalho^{a,b}, Patrícia Gomes^c, Rafael Noal Moresco^{a,b*}

^aResearch Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, RS, Santa Maria, Brazil

^bPostgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, RS, Santa Maria, Brazil

^cPostgraduate Program in Nanosciences, Franciscan University Center, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author: Rafael Noal Moresco

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.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018.

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

Abstract

Objectives: This study aims to establish reference intervals for urinary and serum nitrite/nitrate (NO_x) in a healthy population and to evaluate the interference of bilirubin, lipids and hemolysis on NO_x levels measured using an automated clinical chemistry analyzer.

Design and methods: NO_x concentrations were measured in serum from 152 healthy individuals and in urine from 144 healthy individuals to determine the reference intervals. The evaluation of the *in vitro* interference of bilirubin was performed by addition of bilirubin to serum pool at following final concentrations: 9, 19, 38, 75, 150 and 300 mg/L. The turbidity of lipemia was simulated by addition of Intralipid[®] to serum pool at following final concentrations: 0.67, 1.25, 2.5, 5, and 10 g/L. Hemolysate was added to serum pools for obtaining final concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 5.0 g/L. NO_x levels were measured by the modified Griess assay using the Cobas Mira[®] analyzer.

Results: Serum NO_x was affected by bilirubin, lipids and hemolysis in all tested concentrations in both non-deproteinized and deproteinized serum samples. Urinary NO_x values were 46.1 μmol/L (39.6–78.9 μmol/L) for the lower reference limit and 1533.0 μmol/L (1174.3–1840.9 μmol/L) for the upper reference limit, and reference intervals for serum NO_x were 56.8 μmol/L (53.1–72.1 μmol/L) for the lower reference limit and 340.3 μmol/L (289.4–385.3 μmol/L) for the upper reference limit.

Conclusions: NO_x concentrations were affected by bilirubin, lipids and hemolysis. This study reported at first time a reference range for NO_x in urine samples from healthy individuals.

Keywords: Nitric oxide metabolites, reference interval, bilirubin, lipids, hemolysis.

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is a reactive molecule synthesized from L-arginine by at least isoforms of the NO synthase (NOS) [1]. This is an important mediator of both physiological and pathophysiological processes, is produced in all tissues and plays several numerous important roles in almost every biological system and whole-body homeostasis [2]. Its biological relevance in neurotransmission, anti-inflammation, vascular dilations, heart failure, sepsis, and liver cirrhosis justify its measurement in clinical and experimental fields [3]. NO has a short biological half-life, making difficult its direct determination. Therefore, assessment of nitrite/nitrate (NO_x) in biological fluids, notably plasma, serum, and urine, is the most suitable method to assess NO synthesis *in vivo* [1]. Presently, nitrite and nitrate can be quantified in plasma, serum and urine by various methods based on different analytical principles. Nevertheless the simplicity, rapidity, and cost-effectiveness of the Griess assay have made this method more popular than others [1,4]. It is recognized among researchers that deproteinization of samples is an important step to eliminate interferences during the measurement of NO_x levels by Griess method in serum and plasma samples [1,4]. However, it has been suggested that the deproteinization can be performed or not for urine samples [5,6].

There is consolidated evidence that currently most laboratory errors fall outside the analytical phase and that pre-analytical processes are more vulnerable to error than analytical processes [7]. The most common pre-analytical factor which affects the acceptability of specimens for analysis is the presence of interfering substances in the sample [8]. The most frequent types of interference in routine tests in clinical chemistry are caused by bilirubin, lipids and hemoglobin [9]. The presence of interfering substances alters the correct value of the measured result and may lead to clinical inappropriate intervention and unfavorable outcome for the patients [8]. Furthermore, the establishment of the reference range for healthy individuals has been widely used in medical practice, and its determination allows evaluating the health status of individuals and contributing to medical decision [10]. Although there are reference values for serum NO_x [11], reference values for NO_x in urine samples has not been established. Therefore, this study aims to establish reference intervals for urinary and serum NO_x in a healthy population and to evaluate the interference of bilirubin, lipids and hemolysis, as well as deproteinization, on NO_x levels measured by an automated method.

2. Material and methods

2.1. Assessment of the *in vitro* effect of bilirubin, lipids and hemolysis

Initially pools of serum were prepared from 30 blood samples of healthy individuals. The population was selected among individuals who perform check-up, and as inclusion criteria the absence of changes in biochemical screening tests. Blood samples were collected from subjects after an overnight fast into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with no anticoagulant, and specimens were centrifuged at 2500 x g for 15 minutes to separate the serum. This study protocol was approved by the local research ethics committee (number 12303113.0.0000.5346). Serum pools for the studies were prepared by the method adapted of Glick [14]. Icteric sample were obtained with the suspended 6 mg of bilirubin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in 0.1 mL of dimethyl sulfoxide (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), then added 0.2 mL of sodium carbonate solution (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), 0.1 mol/L. This solution was added slowly, with continuous mixing, to 9.4 mL of serum pool; then 0.2 mL of 0.1 mol/L hydrochloric acid (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) solution was added. We also added proportional amounts of dimethyl sulfoxide, sodium carbonate, and hydrochloric acid to another aliquot of the same serum; thus producing a “diluent serum” that was similar to the bilirubin-enriched serum. These serum pools were then mixed to make specimens with added bilirubin concentrations of 9, 19, 38, 75, 150 and 300 mg/L. The turbidity of lipemia was simulated by adding 0.1 mL of Intralipid[®] 20% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to 1.9 mL serum pool. To an aliquot of the same serum we added an equal proportion of water, to simulate the dilution for the added lipids. Admixture of the supplemented and diluted sera produced specimens containing added Intralipid[®] 20% in concentrations of 0.67, 1.25, 2.5, 5 and 10 g/L. Hemolysates were prepared by use of the osmotic shock procedure as previously reported by Meites [15]. Briefly, 5 mL of heparinized blood was obtained and centrifuged at 3000 x g for 10 min. Plasma was discarded and replaced by 10 mL of isotonic saline, and tube was slowly inverted for ten times. The tube was centrifuged for 10 minutes and saline was discarded. The washing with isotonic saline was repeated twice again. Subsequently, the cells were diluted with an equal volume of distilled water. The tube was inverted and mixed well for ten times. The sample was frozen overnight at -20°C. After the cells were thawed at room temperature and centrifuged at 3000 x g for 30 min to remove the stroma. Hemoglobin content was determined in the supernatant (hemolysate) by use of hemoglobincyanide (HiCN) method (Labtest[®], Lagoa Santa, MG, Brazil). Hemolysate was added to serum pools for obtaining final concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 5.0 g/L. Then NO_x concentration was measured by the modified Griess assay using the Cobas Mira[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer [13]. The intra-assay coefficients of variation (CVs) were 8.3% at 50 µmol/L and 9.1% at 100 µmol/L.

Inter-assay CVs were 3.8% at 50 $\mu\text{mol/L}$ and 7.4% at 100 $\mu\text{mol/L}$. In samples with and without deproteinization. The removal of the proteins in samples was performed by adding zinc sulfate 30% followed by centrifugation of 2500 x g for 15 min [12].

2.2. Determination of the reference interval for NO_x in serum and urine samples

NO_x concentrations were measured in serum from 152 presumably healthy individuals (63 men and 89 women, mean age \pm SD, 47.0 \pm 13.6 years) and in urine from 144 presumably healthy individuals (56 men and 88 women, mean age \pm SD, 41.81 \pm 15.55 years). Individuals were recruited in Santa Maria city, Rio Grande do Sul, Brazil. The population was selected among individuals who perform check-up, and as inclusion criteria the absence of changes in biochemical tests of blood and urine screening. Blood samples were collected from subjects after an overnight fast into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with no anticoagulant. Urine samples were collected in sterile receptacles. Specimens were centrifuged at 2500 x g for 15 minutes and immediately kept frozen at -80°C until analysis. Deproteinization of serum and urine was performed by adding zinc sulfate 30% followed by centrifugation of 2500 x g for 15 min [12]. Urine samples were again centrifuged after defrosting. NO_x concentration was measured by the modified Griess assay using the Cobas Mira[®] automated analyzer [13]

2.3. Statistical analysis

Significant interference was defined when the change of the analyte value exceeded 10% of the baseline value [8]. The percent change was calculated as: $\text{Interference\%} = 100 \times (\text{measured value} - \text{true value})/\text{true value}$, where the measured value is the apparent analyte concentration in the presence of interferent, and the true value is the analyte concentration in the baseline without any addition of interferent. The reference interval for NO_x in serum and urine samples was determined according the Approved Recommendation on the Theory of Reference Values of International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) [10] by use of non-parametric method.

3. Results

The interferences of bilirubin, lipids and hemolysis on serum NO_x measured in non-deproteinized and deproteinized samples were plotted on interferogram as follows in Figures 1 and 2, respectively. Serum NO_x was affected by bilirubin, lipids and hemolysis in all tested concentrations in both non-deproteinized and deproteinized serum samples. Reference

intervals for serum NO_x in healthy volunteers were 56.8 μmol/L (53.1–72.1 μmol/L with a confidence level of 90%) for the lower reference limit and 340.3 μmol/L (289.4–385.3 μmol/L with a confidence level of 90%) for the upper reference limit. Urinary NO_x values were 46.1 μmol/L (39.6–78.9 μmol/L with a confidence level of 90%) for the lower reference limit and 1533.0 μmol/L (1174.3–1840.9 μmol/L with a confidence level of 90%) for the upper reference limit. The sample size of this study was in accordance with the Approved Recommendation on the Theory of Reference Values of International Federation of Clinical Chemistry [10] for determining laboratory reference ranges, which recommends a minimum of 120 subjects for a 90th percentile clinical reference range determination with 90% confidence intervals for each partition group.

4. Discussion

The presence of bilirubin, lipids and hemolysis in a specimen can cause a positive or negative interference in the measurement result of many analytes. Depending on the magnitude of this interference, the results may lead to wrong interpretation and inappropriate intervention. These errors might be associated with further inappropriate investigations and unjustifiable increase in costs [16]. Therefore, it is of interest to investigate the potential interference of some variables on biochemical parameters. In this way, in this study we investigated the interference of bilirubin, lipids and hemolysis, as well as the influence of deproteinization on NO_x levels. We also established reference interval for NO_x in serum and urine samples.

In this present study, bilirubin caused negative interference at low concentration and positive interferences at high concentration in both non-deproteinized and in deproteinated samples. Through this study it is noticed that bilirubin is an endogenous source of interference for the method of NO_x. This interference arises from spectral properties related to the bilirubin strong absorbance between 400 and 540 nm [17]. This spectral property may have compromised the automated analysis of NO_x since this technique has wavelength of 550 nm. Lipemic sera are often found in the practice of clinical laboratories and can cause significant interferences in the analytical results of different biochemical parameters [18]. In this regard, the present study demonstrated that the lipids interfered positively in the evaluation of NO_x levels. This interference is due to the fact that in lipemic samples the chylomicrons and VLDL particle disperse cause turbidity due to electromagnetic energy scattering and volume displacement [9]. Thus, lipemia may interfere in any assay that uses the transmission of electromagnetic energy as part of the detection scheme, including in the NO_x technique using colorimetric assay. Hemolysis is the most common cause of blood sample inadequacy and

interferes in different ways with several assays [16]. *In vitro*, this process may occur during phlebotomy, transport, or force exerted during the ejection of blood, making hemolysis the most frequent reason for specimen rejection [16]. In this study we evaluated the impact of hemoglobin (main molecule released during intra-erythrocyte hemolysis) in dosages of NO_x levels observing the positive interference at all points of the curve. The interference from hemolysis is mostly due to hemoglobin, which has broad and intense absorbance in the ultraviolet and visible regions of the spectrum. According to studies by Dimeski [19], hemoglobin shows strong peaks of absorbance in wavelengths of 415, 540 and 570 nm. Thus, we believe that the interference of hemolysis in our study is of spectral character.

Although reference values for serum NO_x have already been previously described [11], to our knowledge, this is the first report establishing a reference range for NO_x in urine samples by use of an automated analyzer based on Griess method. In this study, urinary NO_x values were 46.1 µmol/L (39.6–78.9 µmol/L) for the lower reference limit and 1533.0 µmol/L (1174.3–1840.9 µmol/L) for the upper reference limit. Guevara et al. [20] assessed the levels NO_x in seven deproteinized urine samples from healthy individuals, and results ranged from 370.0 to 2520.0 µmol/L. It has been assumed that plasma nitrate is freely filterable, and thus urinary levels of nitrate are an accurate reflection of systemic [21]. In relation to reference values for serum NO_x, in the current study NO_x values for healthy volunteers were 56.8 µmol/L (53.1–72.1 µmol/L) for the lower reference limit and 340.3 µmol/L (289.4–385.3 µmol/L) for the upper reference limit. These values are in agreement with the results from another study [13] conducted previously by our team, which serum levels of NO_x were measured by the same automated method, and NO_x values for healthy subjects were 116.2 ± 53.4 µmol/L.

Some limitations in this study occurred since this is a simulation induced *in vitro* and may not be completely comparable to *in vivo* interference. Therefore, the degree of interference observed might not exactly represent what might occur endogenously. Nevertheless, these data still provide useful information as to the degree of analyte change influenced by bilirubin, lipids and hemoglobin.

5. Conclusions

Serum NO_x measured by Griess method was affected by bilirubin, lipids and hemolysis in all tested concentrations in both non-deproteinized and deproteinized serum samples. It is well documented that deproteinization is an important step to reduce interferences, but it is not completely effective in eliminating interference caused by bilirubin, lipids and hemolysis. This study also established a reference range for NO_x in urine samples, which may be useful

for further studies that aim to investigate urinary levels of NO_x in different diseases associated with NO metabolism.

Conflicts of interest statement

None of the authors have conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for providing fellowships. R.N. Moresco is recipient of CNPq Research Fellowship (304349/2011-9).

References

- [1] F. Romitelli, S.A. Santini, E. Chierici, D. Pitocco, B. Tavazzi, A.M. Amorini, et al. Comparison of nitrite/nitrate 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.* 851 (2007) 257-267.
- [2] H. Higashino, M. Tabuchi, S. Yamagata, T. Kurita, H. Miya, H. Mukai, et al. Serum nitric oxide metabolite levels in groups of patients with various diseases in comparison of healthy control subjects. *J. Med. Sci.* 10 (2010) 1-11.
- [3] D. Ricard-Jané, M. Llobera, M.D. López-Tejero, Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method, *Nitric Oxid* 6 (2002) 178-185.
- [4] S. Z. Asl, A. Ghasemi, F. Azizi, Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 1342-1347.
- [5] P.J.R. Phyzackerley, S.A. Dabbagh, The estimation of nitrate and nitrite in saliva and urine, *Anal. Biochem.* 131 (1983) 242-245.
- [6] G.H. Rabbani, S. Islam, A.K. Chowdhury, A.K. Chowdhury, A.K. Mitra, M.J.S. Miller, G. Fuchs, Increased nitrite and nitrate concentrations in sera and urine of patients with Cholera or Shigellosis, *Am. J. Gastroenterol.* 96 (2001) 467-472.
- [7] M. Plebani, Laboratory errors: How to improve pre- and post-analytical phases? *Biochem. Med.* 17 (2007) 5-9.

- [8] J.Z. Ji, Q.H. Meng, Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 1500-1556.
- [9] J. Fleming, S. Swaminathan, Interference in autoanalyzer analysis, *Indian J. Clin. Biochem.* 16 (2001) 22-30.
- [10] H.E. Solberg, International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values: Part 1. The concept of reference values, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25 (1987) 337-342.
- [11] A. Ghasemi, S. Zahediasl, F. Azizi, Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population, *Clin. Biochem.* 43 (2010) 89-94.
- [12] H. Moshage, B. Kok, J. Huizenga, P.L.M. Jansen, Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation, *Clin. Chem.* 41 (1995) 892-896.
- [13] E. Tatsch, G.V. Bochi, R.S. Pereira, H. Kober, V.A. Agertt, M.M.A. Campos, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 348-350.
- [14] M.R. Glick, K.W. Ryder, S.A. Jacson, Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation, *Clin. Chem.* 32 (1986) 470-475.
- [15] S. Meites, Reproducibly simulating hemolysis for evaluating its interference with chemical methods, *Clin. Chem.* 19 (1973) 1319.
- [16] G. Lippi, G. C. Mattiuzzi, M. Plebani, Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing, *Clin. Chem. Lab. Med.* 44 (2006) 358-365.
- [17] K.S.S. Saibaba, Interferences in clinical chemistry analysis, *Indian J. Clin. Biochem.* 13 (1998) 55-62.
- [18] P. Calmarza, J. Cordero, Lipemia interferences in routine clinical biochemical tests, *Biochem. Med.* 21 (2011) 160-166.
- [19] G. Dimeski, Interference testing, *Clin. Biochem. Rev.* 29 (2008) S43-S48.
- [20] I. Guevaraa, J. Iwanejkoa, A. Dembinska-Kiec, J. Pankiewicz, A. Wanat, P. Anna, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, *Clin. Chim. Acta*, 274 (1998) 177-188.
- [21] K. Joharchi, M. Masoumeh, A rapid, simple method for nitrite and nitrate measurement in rat urine, *Nitric Oxide*, 19 (2008) S43.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of interferences on serum nitrite/nitrate (NO_x) measured in non-deproteinized samples. (A) Effect of added bilirubin in different concentrations on analyte results. (B) Effect of added Intralipid[®] in different concentrations on analyte results. (C) Effect of added hemoglobin in different concentrations on analyte results.

Figure 2. Effects of interferences on serum nitrite/nitrate (NO_x) measured in deproteinized samples. (A) Effect of added bilirubin in different concentrations on analyte results. (B) Effect of added Intralipid[®] in different concentrations on analyte results. (C) Effect of added hemoglobin in different concentrations on analyte results.

Figure 1

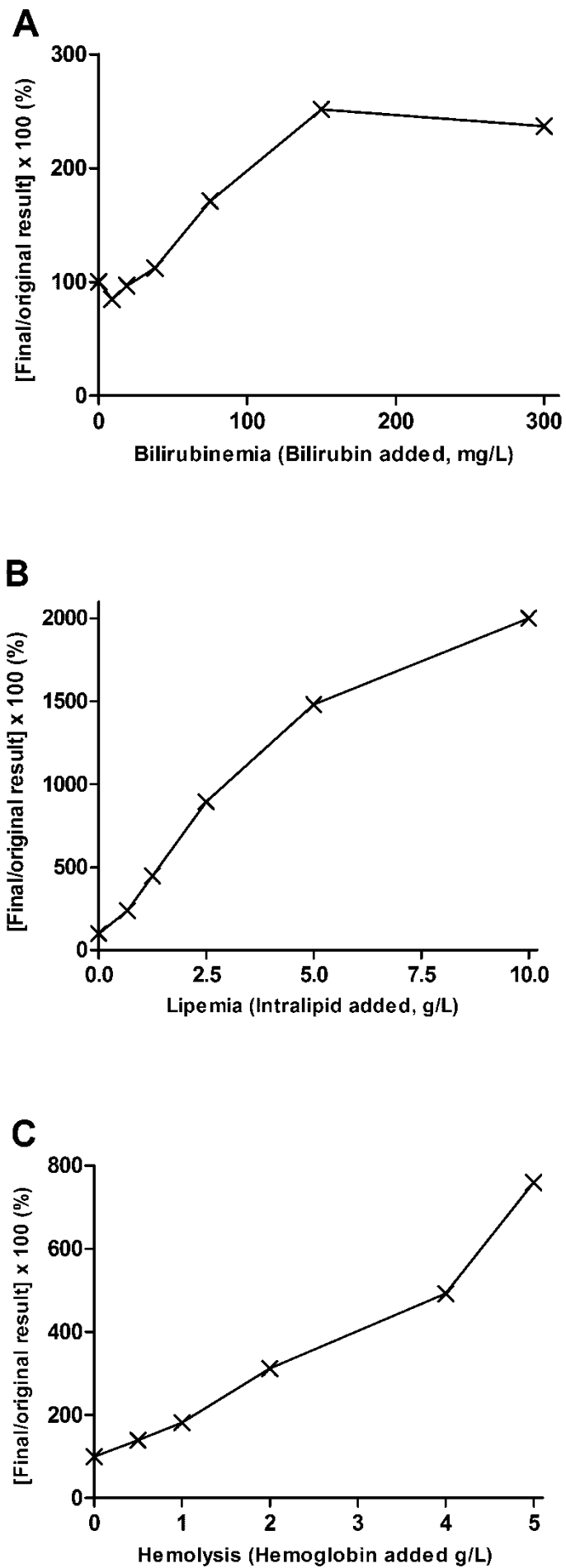
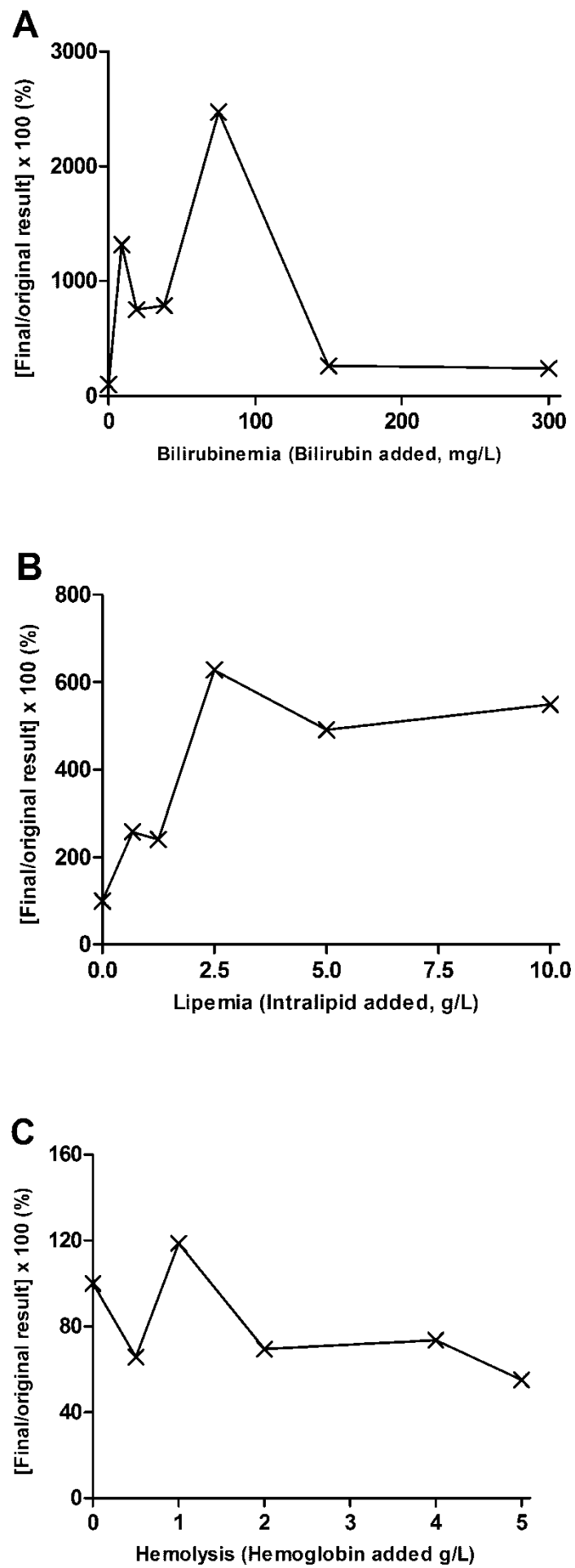


Figure 2



4 CONCLUSÕES

- A icterícia, lipemia e hemólise promoveram interferências significativas nos níveis séricos de NOx mensurados pelo método de Griess automatizado.
- A interferência provocada pela presença de bilirrubina, lipídeos e hemoglobina foi significativa em todas as concentrações testadas e a desproteinização prévia das amostras de soro não foi eficaz na eliminação desta interferência.
- A desproteinização não elimina totalmente a interferência de bilirrubina, lipídeos e hemoglobina, mas parece amenizar a interferência.
- Os limites de referência para NOx foram estabelecidos para uma população saudável, cujos valores foram de 56,8 a 340,3 $\mu\text{mol/L}$ (soro) e de 46,1 a 1533,0 $\mu\text{mol/L}$ (urina).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA, American diabetes association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Nova Iorque, v. 33, s. 1, p. S62-69, jan. 2010.

AKAMINE, N. et al. Choque séptico. In: Knobel E, ed - **Condutas no Paciente Grave**. São Paulo: Atheneu, p. 175, 1994.

ALBERT, A. Valores de referencia: univariantes versus multivariantes. **Química Clínica**, v. 9, n. 5, p. 428-431, 1990.

ALONSO-GALICIA, M. et al. Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. **Hypertension**, Dalas, v. 29, n. 1 (pt 2), p. 320-325, jan. 1997.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research**, Londres, v. 43, n. 3, p. 5221-531, ago. 1999.

ARANDA, E. et al. Nitric oxide and cancer: the emerging role of S-nitrosylation. **Current Molecular Medicine**, Netherlands, v. 12, n. 1, p. 50-67, jan. 2012.

ARNOLD, W. P. et al., Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, ago. 1977.

ASCENZI, P.; BOCEDIL, A.; GRADONI, L. The Anti-Parasitic Effects of Nitric Oxide, **Life**, Basel, v. 55, n. 10-11, p. 573-578, out. 2003.

AVOGARO, A. et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Amsterdam, v. 16, p. S39-S45, mar. 2006.

BACHMANN, S.; BOSSE, H. M.; MUNDEL, P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. **American Journal of Physics**, Baltimore, v. 268, n. 5 (pt. 2), p. F885-F898, mai. 1995.

BALAKUMAR, P. et al. Singh, M. vascular endothelial dysfunction: a tug of war in diabetic nephropathy ? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 63, n. 3, p. 171-179, mar. 2009.

BATISTA, R et al. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 207-216, abr. 2011.

BATEMAN, R. et al. Efecct of hemolysed plasma on the batch measurement of nitrate by nitric oxide chemiluminescence. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 47, n. 10, p. 1847-1851, out. 2001.

BECKMAN, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n.4, p. 1620-1624, fev. 1990.

BECKMAN, J. S; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 271, n. 5 (pt 1), p. C1424-1437, nov. 1996.

BOCCHI, E. A. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1 (supl. 1), p. 1-71, 2009.

BORHORST, J. A.; ROBERTS, R. F.; ROBERTS, W. L. Assay-specific differences in lipemic interference in native and intralipid-supplemented samples. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 50, n. 11, p. 2197-2201, nov. 2004.

BRED, D. S. et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, Londres, v. 351, n. 6329, p. 714-718, jun. 1991.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, Londres, v. 25, n. 347, p. 768-770, out. 1990.

BRITO, M. A.; SILVA, R. F. M.; BRITES, R. F. M. Bilirubin toxicity to human erythrocytes: A review. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 374, n. 1-2, dez. 2006.

BRYAN, N. S. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova Iorque, v. 41, p. 691-701, set. 2006.

BRYAN, N.S.; GRISHAM, M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova Iorque, v. 43, p. 645-657, set. 2007.

BUERK, D. G. Can we model nitric oxide biotransport? A survey of mathematical models for a simple diatomic molecule with surprisingly complex biological activities. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 3, p. 109-143, 2001.

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

CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, Londres, v. 8, p. 766-775, out. 2007.

CALMARZA, P.; CORDERO, J. Lipemia interferences in routine clinical biochemical tests. **Biochemia Medica**, Zagreb, v. 21, n. 2, p. 160-166, mai. 2011.

CARRARO, P.; SERVIDIO, G.; PLEBANI, M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 46, n. 2, p. 306-307, 2000.

CHOI, A. M.; ALAM, J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 15, n. 1, p. 9-19, jul. 1996.

CLEETER, M. W. et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide: implications for neurodegenerative diseases. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 345, n. 1, p. 50-54, mai. 1994.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Hemolysis, Icterus, and Lipemia/Turbidity Indices as Indicators of Interference in Clinical Laboratory Analysis; Approved Guideline. **CLSI document C56-A**, Wayne, 2012.

CONESKI, P. N.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting. **Chemical Society Reviews**, Londres, v. 41, n. 10, p. 3753-3758, mai. 2012.

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

CROW, J. P.; BECKMAN, J. S. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlim, v. 196, p. 57-73, 1995.

DIMESKI, G. Interference testing. **The Clinical biochemist. Reviews**, Chippendale, v. 29, suppl. 1, p. S43-S48, ago. 2008.

DIMESKI, G.; JONES, B. W. Lipaemic samples: effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. **Biochemia Medica**, v. 21, n. 1, p. 86-92, 2011.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 343-350, 2003.

DUSSE, L. M. S. A. et al. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 362, p. 195-197, dez. 2005.

ENGIN, A. Dual function of nitric oxide in carcinogenesis reappraisal. **Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders**, Hilversum, v. 12, n. 9, p. 891-899, nov. 2011.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 284, n. 1, p. R1-R12, jan. 2003.

FLEMING, J.; SWAMINATHAN, S. Interference in autoanalyzer analysis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, Nova Délhi, v. 16, n. 1, p. 22-30, jan. 2001.

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

FORTE, P. et al. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. **Lancet**, Londres, v. 349, n. 9055, p. 837-842, mar. 1997.

FRIEDBERG, R. et al. The origin of reference intervals. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 131, n. 3, p. 348-357, mar. 2007.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 6, n. 7, p. 521-534, jul. 2006.

FURCHGOTT, R. F. et al. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Nova Iorque, v. 53, p. 557-573, 1984.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, Londres, v. 288, n. 5789, p. 373-376, nov. 1980.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 57, n. 683-706, 1995.

GILMORE, I.; GARVEY, C. J. Investigation of jaundice. **Medicine**, v. 35, n. 1, p. 13-16, jan. 2007.

GLADWIN, M. T.; CRAWFOR, J. H.; PATEL, R. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation, **Free Radical Biology and Medicine**, Nova Iorque, v. 36, n. 6, p. 707-717, mar. 2004.

GLICK, M. R.; RYDER, K. W.; JACKSON, S. A. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrument, **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 470-475, mar. 1986.

GOOD, F. et al. Protein nitration in Parkinson's disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, Nova Iorque, v. 57, n. 4, abr. 1998.

GRAHAM, S. H.; HICKEY, R. W. Cyclooxygenases in central nervous system diseases: a special role for cyclooxygenase 2 in neuronal cell death. **Archives of Neurology**, Chicago, v. 60, n. 4, p. 628-630, abr. 2003.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt 'Ueber einige Azoverbindungen'. **Chemische Berichte**, Weinheim, v. 12, p. 426-428, 1879.

GRISHAM, M. B.; JOURD'HEUIL, D.; WINK, D. A. Nitric oxide: I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. **Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 276, n. 2 (pt. 1), p. G315-G321, fev. 1999.

GUDER, W. et al. The haemolytic, icteric and lipemic sample recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. **Laboratoriums Medizin/Journal of Laboratory Medicine**, Berlim, v. 24, n. 8, out. 2009.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 126-152, jun. 2005.

HIBBS JR, J.; TAINTOR, R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, Washington, v. 235, n. 4787, p. 473-476, jan. 1987.

HIGASHINO, H. Serum nitric oxide metabolite (NOx) levels in hypertensive patients at rest: a comparison of age, gender, blood pressure and complications using normotensive controls. **Clinical and Experimental Pharmacology & physiology**, Oxford, v. 34, n.8, p. 725-731, ago. 2007.

HIRST, D.; ROBSON, T. Nitric oxide in cancer therapeutics: interaction with cytotoxic chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, Netherlands, v. 16, n. 4, p. 411-420.

HORN, P. S.; PESCE, A. J. Reference intervals: an update. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 334, n. 1, p. 5-23, ago. 2003.

HOSHIJIMA, M. et al. The MLP family of cytoskeletal Z disc proteins and dilated cardiomyopathy: a stress pathway model for heart failure progression. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, Cold Spring Harbor, v. 67, p. 399-408, 2002.

IADECOLA, C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: Is nitric oxide the missing link? **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v. 16. n .6, p. 206-214, jun. 1993.

INADOMI, C. et al. Overexpression of glutaredoxin protects cardiomyocytes against nitric oxide-induced apoptosis with suppressing the S-nitrosylation of proteins and nuclear translocation of GAPDH. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 435, n. 3, p. 356-361, ago. 2012.

JANSSON, P. A. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 262. n. 2, p. 173-183, ago, 2007.

JI, J. Z.; MEN, Q. H. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays, **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 412, n. 17-18; p. 1500-1556, ago. 2011.

KADER, A. et al. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, Dallas, v. 24, v. 11, p. 1709-1716, nov. 1993.

KAZMIERCZACK, S.; CATROU, P. Analytical interference: more than just a laboratory problem. **American Journal of Clinical Pathology**, Filadélfia, v. 113, p. 9-11, 2000.

KAZMIERCZAK, S.; CATROU, P. G.; BOUDREAU, D. Simplified interpretative format for assessing test interference: studies with hemoglobin-based oxygen carrier solutions. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 44, n. 11, p. 2347-2352, nov. 1998.

KHATSENKO, O. G. et al. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 23, p. 11147-11151, dez. 1993.

KIM, P. K. M. et al., The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **International Immunopharmacology**, Netherlands, v. 1, n. 8, p. 1421-1441, ago. 2001.

KIM, Y. M. et al. Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitroxide synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 11, p. 5710-5713, mar. 1995.

KIRSCHBAUMWEG, T.; DEUTSCHLAND, F. Haemolysis as influence & interference factor. **The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Milão, v. 13, n. 4, p. 1-4, 2002.

KLAHR, S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 1, n. 16, p. 60-62, 2001.

KORDE, S. et al. Nitric oxide and oral cancer: a review. **Oral Oncology**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 475-483, jun. 2012.

KORIYAMA, Y. et al. Protective action of nipradilol mediated through S-nitrosylation of Keap1 and HO-1 induction in retinal ganglion cells. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 61, n. 7, p. 1242-1253, dez. 2012.

KROEBKE, J. et al. Venipuncture procedures. In: Slockbower JM, Blumenfeld TA, editors. **Collection and handling of laboratory specimens**. Philadelphia:JB Lippincott, 32-4, 1983.

KROLL, M.; ELIN, R. Interference with clinical laboratory analysis. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 40, n. 11, p. 1996-2005, jul. 1994.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 11, p. 4651-4655, jun. 1991.

LANCARTER JR, J. R. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 17, p. 8137-8141, ago. 1994.

LEONE, A. M. et al. A rapid and simple method for the measurement of nitrite and nitrate in plasma by high performance capillary electrophoresis. **Biochemical and biophysical research communications**, Nova Iorque, v. 200, n. 2, p. 951-957, abr. 1994.

LESNIEWSKI, L. A. et al. Decreased NO signaling leads to enhanced vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle arterioles of the ZDF rat prior to overt diabetes and hypertension. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 294, n. 4, p. H1840-H1850, abr. 2008.

LIPPI, G. et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 49, n. 7, p. 1113-1126, jul. 2011.

LIPPI, G. et al. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 44, p. 358-365, 2006a.

LIPPI, G. et al. Phlebotomy issues and quality improvement in results of laboratory testing. **Clinical Laboratory**, Heidelberg, v. 52, n. 5-6, p. 217-230, 2006b.

LIPPI, G.; SIEST, G.; PLEBANI, M. Pharmacy-based laboratory services: past or future and risk or opportunity? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 46, n. 4, p. 435-436, 2008.

LIPPI, G.; SIMUNDIC, A. M. Total quality in laboratory diagnostics. It's time to think outside the box. **Biochemia Medica**, Zagreb, v. 20, p. 5-8, 2010.

LU, Y. et al. Shape- and Nitric Oxide Flux-Dependent Bactericidal Activity of Nitric Oxide-Releasing Silica Nanorods. **Small**, Weinheim, v. 9, n. 2, p. 2189-2198, jun. 2013.

LUCAS, K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 53, n. 3, p. 375-414, set. 2000.

LUO, J.; CHEN, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 26, n. 3, p. 259-264, mar. 2005.

MANCUSO, C. et al. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 12, p. 1107-1123, jan. 2007.

MARSH, N.; MARSH, A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 313-319, abr. 2000.

MARTI, G. Epidemiology studies in critical care, **Critical Care**, v. 10, n. 8, p. 1-2, 2006.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Nitric oxide signaling: Classical, less classical, and nonclassical mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova Iorque, v. 51, n. 1, p. 17-29, jul. 2011.

MASSION, P. B. et al. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. **Circulation Research**, Baltimore, v. 93, n. 5, p. 388-398, set. 2003.

MATHER, K.; ANDERSON, T. J.; VERNMA, S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. **Journal of Vascular Research**, Nova Iorque, v. 38, n.5, p. 415-422, set. 2001.

MEANY, D.; SCHOWINSKY, J.; CLARKE, W. Effects of hemolysis and lipemia on the COBAS[®] salicylate and acetaminophen assays compared to GDS assays, **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 41, n. 18, p. 1486-1488, dez. 2008.

MEHTA, D. R.; ASHKAR, A. A.; MOSSMAN, K. L. The Nitric Oxide Pathway Provides Innate Antiviral Protection in Conjunction with the Type I Interferon Pathway in Fibroblasts. **PloS one**, São Francisco, v. 7. n. 2, p. e31688, 2012.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 5, n.1, p. 62-71, fev. 2001.

MOLLACE, V. et al. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 57, n. 2, p. 217-252, jun. 2005.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 42, n. 2, p. 109-142, jun. 1991.

MORIEL, P. et al. Nitric oxide, cholesterol oxides and endothelium-dependent vasodilation in plasma of patients with essential hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 35, n. 11, p. 1301-1309, nov. 2002.

MORRIS JR, S. M. BILLIAR, T. R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 266, n. 6 (pt. 1), p. E829-E839, jun. 1994.

MOSHAGE, H. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 41, n. 6, p. 892-896, jun. 1995.

MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. **Advances in Pharmacology**, Nova Iorque, v. 26, p. 19-33, 1994.

NATHAN, C. Natural resistance and nitric oxide. **Cell**, Cambridge, v. 82, n.6, p. 873-876, set. 1995.

NIWA, M. et al. Time course of expression of three nitric oxide synthase isoforms after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Neurologia Medico-Chirurgica**, Tóquio, v. 63, n. 72, p. 72-73, fev. 2001.

NOGAWA, S. et al. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 after cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 18, p. 10966-10971, jul. 1998.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, Washington, v. 87, n. 1, p. 315-424, jan. 2007.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, Londres, v. 327, n. 6122, p. 524-526, jun. 1987.

PETROS, A.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. **Lancet**, Londres, v. 28, n. 338, p. 1557-1558, dez. 1991.

PIYOPHIRAPONG, S.; WONGTIRAPORN, W.; SRIBHEN, K. Factitious results in clinical chemistry tests caused by commone endogenous interferents. **Siriraj Medical Journal**, Tailândia, v. 62, n. 4, p. 185-188, 2010.

PLEBANI, M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 404, n. 1, p. 16-23, jun. 2009.

PLEBANI, M.; CARRARO, P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 43, n. 8, p. 1348-1351, ago. 1997.

REISER, D. Neonatal jaundice: physiologic variation or pathologic process. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, Filadélfia, v. 16, n. 2, p. 257-269, jun. 2004

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**, Orlando, v. 6, n. 2, p. 178-185, mar. 2002.

RIOJA, R. G. et al. Hemólise em las muestras para diagnóstico. **Revista del Laboratorio Clínico**, v. 2, n. 4, p. 185-195, 2009.

ROMITELLI, F. 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. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 851, p. 257-267, mai. 2007.

RYDER, K. W.; GLICK, M. R. Erroneous laboratory results from hemolyzed, icteric, and lipemic specimens. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 175-176, jan. 1993.

SAIBABA, K. S. S. Interferences in clinical chemistry analysis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, Nova Délhi, v. 13, n. 2, p. 55-62, jul. 1998.

SANTOS, R.C.V. et al. Fructose-1,6-bisphosphate reduces the mortality in *Candida albicans* bloodstream infection and prevents the septic-induced platelet decrease. **Inflammation**, Nova Iorque, v.35, n. 4, p. 1256-1261, ago. 2012.

SASTRY, K. V. Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper cadmium alloy. **Analytical Biochemistry**, Nova Iorque, v. 306, n. 1, p. 79-82, jul. 2002.

SCHWEIZER, M.; RICHTER, C. Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 204, n.1, p. 8137-8141, out. 1994.

SHEN, W. et al. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v. 27, n. 8, p. 1125-1134, ago. 1995.

SIMUNDIC, A. et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolysed specimens: can we rely on a human eye? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlim, v. 47, n. 11, p. 1361-1365, 2009.

SINGH, D. K.; WINOCOUR, P.; FARRINGTON, K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. **Nature Reviews Endocrinology**, Londres, v. 7, n. 3, p. 176-184, mar. 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 95, v. 1, p. 1-51, 2010.

SODI, R.; DARN, S. M.; SCOTT, A. Pneumatic tube system induced haemolysis: assessing sample type susceptibility to haemolysis. **Annals of Clinical Biochemistry**, Londres, v. 41, n. pt. 3, p. 237-240, mai. 2004.

SOLBERG, H. E. Estabelecimento e uso de valores de referência. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. In: **Tietz Fundamentos de química clínica**. 6 ed. São Paulo: Elsevier, 2008. cap. 14, p. 233-242.

SOLBERG, H. E. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Scientific Committee, Clinical Section, Expert Panel on Theory of Reference Values, and International Committee for Standardization in Haematology (ICSH), Standing Committee on Reference Values. Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values: Part 1. The concept of reference values. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, Berlim, v. 25, n. 5, p. 337-342, mai. 1987.

SOUZA, H.; LAURINDO, F. R. M. Estresse oxidativo e ruptura da placa aterosclerótica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 4. P. 584-594, jul 2002.

SPOSITO, A. et al. IV diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. São Paulo, v. 88, supl. 1, abr. 2007.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, Cambridge, v. 78, n. 6, p. 931-936, set. 1994.

STAMLER, J. S.; SINGE, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redoxactivated forms. **Science**, Washington, v. 258, n. 5090, p. 1898-1902, dez. 1992.

STEIBERG, H. O. et al. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 94, n. 3, p. 1172-1179, set. 1994.

STOCKER, R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. **Free Radical Research**, Londres, v. 9, n. 1, p. 101-112, 1990.

SULTANA, R. et al. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. **Neurobiology of Disease**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 76-87, abr. 2006.

TATSCH, E. et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 44, n. 4, p. 348-350, mar. 2011a.

TATSCH, E. et al. Influência dos anticoagulantes e da temperatura de armazenamento sobre os níveis sanguíneos de nitrito. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p. 147-150, abr. 2011b

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

UWABO, J.; et al. Association of a variable number of tandem repeats in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with essential hypertension in Japanese. **American Journal of Hypertension**, Nova Iorque, v. 11, n. 1 (pt. 1), p. 125-128, jan. 1998.

VANE, J. R. et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 6, p. 2046-2050, mar. 1994.

VERSARI, D. et al. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Londres, v. 157, n. 4, p. p. 527-536, jun. 2009.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 755-784, 1992.

WATKINS, H.; FARRAL, M. Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. **Nature reviews. Genetics**, Londres, v. 7, n. 3, p. 163-173, mar. 2006.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, Nova Iorque, v. 25, n. 4-5, p. 435-456, set. 1998.

WINK, B. et al. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Nova Iorque, v; 300, n. 1, p. 115-123, jan. 1993a.

WINK, D. A. et al. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: Determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 6. n. 1, p. 23-27, jan. 1993b.

WINLAW, D. S. et al. Increased nitric oxide production in heart failure. **Lancet**, Londres, v. 344, n. 6, p. 373-374, ago. 1994.

XIE, Q. W. et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, Washington, v. 256, n. 5054, p. 225-228, abr. 1992.

YOON, S. 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. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 324, p. 113-120, out. 2002.

6 ANEXO

Anexo A – Comprovante de submissão do artigo científico

