

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

**AUTOMAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE
OXIDAÇÃO DO NADPH PARA A MENSURAÇÃO DA
ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE:
DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE REFERÊNCIA E
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LIPEMIA,
HEMOGLOBINA E BILIRRUBINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carine Lima Hermes

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**AUTOMAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE OXIDAÇÃO
DO NADPH PARA A MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA
GLUTATIONA REDUTASE: DETERMINAÇÃO DOS
LIMITES DE REFERÊNCIA E AVALIAÇÃO DA
INFLUÊNCIA DA LIPEMIA, HEMOGLOBINA E
BILIRRUBINA**

por

Carine Lima Hermes

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

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**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

**AUTOMAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE OXIDAÇÃO DO
NADPH PARA A MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA
REDUTASE: DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE REFERÊNCIA E
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LIPEMIA, HEMOGLOBINA E
BILIRRUBINA**

elaborada por
Carine Lima Hermes

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Edson Luiz da Silva, Dr. (UFSC)

Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 21 de junho de 2013.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lima Hermes, Carine

AUTOMAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE OXIDAÇÃO DO NADPH PARA A MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE: DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE REFERÊNCIA E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LIPEMIA, HEMOGLOBINA E BILIRRUBINA / Carine Lima Hermes.-2013.

63 p.; 30cm

Orientador: Rafael Noal Moresco

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2013

1. Método automatizado 2. Validação de técnica 3. Glutaciona redutase 4. Limites de referência 5. Interferência pré-analítica I. Noal Moresco, Rafael II. Título.

Dedico este trabalho:

*À minha família, colegas e amigos que me incentivaram e me deram força para
que essa etapa fosse concretizada.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades a mim concedidas e por estar sempre guiando os meus passos.

Aos meus pais, Lisane e Osmar por serem a minha fonte de força e amor maior, pelo incentivo, compreensão e conforto dados durante esses anos e principalmente nas horas em que mais precisei.

À minha irmã Aline, por ser meu exemplo, minha inspiração e também pelo apoio, companheirismo e auxílio de sempre e ao meu cunhado Edson, pela força, incentivo e apoio dedicado a mim, principalmente nesses 2 anos.

Ao meu namorado Ian Gabriel, pelo apoio, carinho, companheirismo, compreensão e conforto, sempre estando ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador, professor Rafael, pela amizade, pela oportunidade concedida de trabalhar junto ao seu grupo de pesquisa, pelo conhecimento que a mim foi transmitido, pelas conquistas que juntamente ao grupo pude vivenciar, pelo tempo e atenção despendidos, por me ensinar a pesquisar e questionar, pelo exemplo de profissional e mestre que és. Muito obrigada por tudo, levarei seus ensinamentos pelo resto da vida.

À Patrícia Gomes pela oportunidade inicial, pelo auxílio, contribuições e tempo disponível em auxiliar neste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica - LABICLIN - pela convivência, pela ajuda e companheirismo desde o início da minha caminhada junto a vocês. Pelos momentos de risos, diversão, mas também trabalho e seriedade. Vocês são mais do que colegas ou “corégas”, são grandes amigos, que ficarão guardados no meu coração e na minha memória. Saibam que podem contar comigo para o que der e vier.

Em especial à Bruna, Manuela e Taís pela ajuda, apoio e colaboração, pela disponibilidade de ficarem algumas horas a mais no laboratório para o início, continuação e término da validação realizada. O auxílio de vocês foi fundamental para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos componentes da banca, pela disponibilidade em avaliar e contribuir para este trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de estudar gratuitamente, tendo um ensino de qualidade, disponibilizando da sua infraestrutura e dos professores, aos quais também sou grata pelo conhecimento adquirido. Também ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por tornar possível a conquista deste título.

Enfim, MUITO OBRIGADA a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu concluísse mais essa etapa de minha vida. Orgulho-me de ter chegado até aqui e sou grata a TODOS.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê”*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

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

AUTOMAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE OXIDAÇÃO DO NADPH PARA A MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE: DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE REFERÊNCIA E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LIPEMIA, HEMOGLOBINA E BILIRRUBINA

AUTORA: CARINE LIMA HERMES
ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 21 de junho de 2013.

A glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) é o principal tiol não proteico do organismo e está envolvida na defesa celular antioxidante. A glutathione livre está presente principalmente na sua forma reduzida (GSH) e pode ser convertida para a forma oxidada (GSSG) na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs). A razão GSH/GSSG elevada é muito importante para o estado redox celular e uma redução desta razão é frequentemente utilizada como um indicador do estresse oxidativo. A enzima glutathione reductase (GR) catalisa a redução de GSSG a GSH utilizando NADPH. Devido a grande importância antioxidante da glutathione e considerando que a mesma está presente em quase todos os organismos, numerosas pesquisas envolvendo as mais diversas tentativas de detecção de GSH, GSSG e GR em sistemas biológicos tem sido realizadas. Assim, o objetivo deste estudo foi validar um método analítico automatizado, baseado em um método espectrofotométrico proposto por Mannervick e Carlberg em 1985 para a mensuração da atividade da GR que consiste na oxidação do NADPH, o qual é monitorado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm utilizando o analisador automatizado Cobas Mira[®], determinar seus limites de referência para uma população saudável e ainda avaliar a interferência pré-analítica que influenciam na fase analítica da hemoglobina, lipemia e bilirrubina. O método automatizado para a mensuração da atividade da enzima GR foi validado seguindo recomendações da ANVISA e EMEA. Sendo que o mesmo foi linear ($r^2=0,990$), preciso, apresentando um coeficiente de variação (CV) na precisão intraensaio de 5,7% (50 U/L) e 3,4% (100 U/L) e na precisão interensaio um CV de 9,5% (50U/L) e 9,9% (100 U/L). Além disso, foi observada uma recuperação de 114,1%, sendo este método considerado exato. Os limites de referência foram avaliados seguindo recomendações da *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC), sendo que foram de 21,7 U/L a 60,3 U/L, para uma população saudável. Na simulação da hemólise, lipemia e icterícia em amostras de plasma, avaliou-se a interferência pré-analítica na atividade da GR. Todas as concentrações utilizadas de Intralipid[®] (0,67; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/dL), de padrão de hemoglobina (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 g/dL) e de bilirrubina (0,9; 1,9; 3,8; 7,5; 15 e 30

mg/dL) resultaram em uma diferença do valor original de GR, sendo verificada uma porcentagem maior que 5%, sendo essa porcentagem considerada, para enzimas, interferência analítica. Dessa forma, foi possível concluir que o método automatizado desenvolvido foi linear, preciso, exato, simples e de baixo custo, podendo ser adaptado ao analisador Cobas Mira[®]. Os limites de referência para uma população saudável também foram estabelecidos. Além disso, foi demonstrado que a hemoglobina, a lipemia e a bilirrubina interferem na mensuração da atividade da GR.

Palavras-chave: Método automatizado. Validação. Glutathione redutase. Limites de referência. Interferência pré-analítica. Lipemia. Hemoglobina. Bilirrubina.

ABSTRACT

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

AUTOMATION AND VALIDATION OF THE METHOD OF OXIDATION OF NADPH FOR MEASUREMENT THE ACTIVITY OF GLUTATHIONE REDUCTASE: DETERMINATION OF THE LIMITS OF REFERENCE AND EVALUATION OF THE INFLUENCE OF LIPEMIA, HEMOGLOBIN AND BILIRUBIN

AUTHOR: CARINE LIMA HERMES
ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

Place and Date: Santa Maria, june 21th, 2013.

Glutathione (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) is the major non-protein thiol body and is involved in cellular antioxidant defense. The free glutathione is present mainly in its reduced form (GSH) and can be converted to the oxidized form (GSSG) in the presence of reactive oxygen species (ROS). The GSH/GSSG ratio high is very important for the cellular redox state and a reduction of this ratio is often used as an indicator of oxidative stress. The enzyme glutathione reductase (GR) catalyzes the reduction of GSSG to GSH using NADPH. Because of the great importance of the antioxidant glutathione and considering that it is present in almost all organisms, numerous studies involving several attempts to detect GSH, GSSG and GR in biological systems has been performed. The objective of this study was to validate an automated analytical method, based on a spectrophotometric method proposed by Mannervick and Carlberg in 1985 to measurement the GR activity which is the oxidation of NADPH, which is monitored spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm using the automated analyzer Cobas Mira[®], determine its limits of reference for a healthy population and further evaluate the pre-analytical interference that influence the analytical phase of hemoglobin, bilirubin and lipemia. The automated method for measuring of the GR activity was validated as recommended by the EMEA and ANVISA. Since it was linear ($r^2 = 0.990$), precise, with a coefficient of variation (CV) in precision intraassay of 5.7% (50 U/L) and 3.4% (100 U/L) and precision interassay CV of 9.5% (50 U/L) and 9.9% (100 U/L). In addition, we observed a recovery of 114.1% with this method considered accurate. The reference limits were evaluated as recommended by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), and were 21.7 U / L to 60.3 U / L, for a healthy population. In the simulation of hemolysis, lipemia and jaundice in plasma samples, we evaluated the pre-analytical interference in the activity of the GR. All concentrations of Intralipid[®] (0.67, 1.25, 2.5, 5 and 10 mg / dL), hemoglobin standard (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 g / dL), and bilirubin (0.9, 1.9, 3.8, 7.5, 15 and 30 mg / dL) resulted in a difference from the original value of GR, and verified a percentage greater than 5%, and this percentage considered for enzymes, analytical interference. Thus, it was concluded that the automated method developed was linear, precise, accurate, simple and inexpensive, and can be adapted to the Cobas Mira[®] analyzer. The

reference limits for a healthy population were established. Furthermore, it was demonstrated that hemoglobin, lipemia and bilirubin interfere in the measurement of the GR activity.

Keywords: Automated method. Validation. Glutathione reductase. Reference limits. Pre-analytical interference. Lipemia. Hemoglobin. Bilirubin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Intervalos de confiança não paramétricos dos limites de referência.....	33
Tabela 2- Determinação não paramétrica do intervalo de referência.....	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Fórmula estrutural da glutathiona reduzida (GSH) e da glutathiona oxidada (GSSG).....	18
Figura 2-	Representação esquemática da redução glutathiona oxidada para a glutathiona reduzida através da enzima glutathiona redutase pelo mecanismo NADPH dependente.....	19
Figura 3-	Representação esquemática das reações intervenientes na biossíntese da glutathiona a partir dos seus aminoácidos constituintes.....	20
Figura 4-	Espécies reativas do oxigênio (EROs) e a patogênese de desordens neurodegenerativas.....	22
Figura 5-	Reação da redução da glutathiona oxidada para glutathiona reduzida através do mecanismo NADPH dependente.....	25

ARTIGO

Figure 1-	Linear regression for measurement of glutathione reductase (GR) by the method using Cobas Mira [®] clinical chemistry analyzer ($r^2=0.990$).....	42
-----------	--	----

MANUSCRITO

Figure 1-	Interferogram of the effect of interferents on analyte results.....	48
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARE: *antioxidant responsive element*
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CV: coeficiente de variação
DP: desvio-padrão
DPR: desvio padrão relativo
DTNB: ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzóico
EC-CZE: zona eletroforética capilar como método de detecção electroquímica
EMEA: *European Medicines Agency*
EROs: espécies reativas de oxigênio
FAD: flavina adenina dinucleotideo
GPx: glutationa peroxidase
GR: glutationa redutase
GSH: glutationa reduzida
GSSG: glutationa oxidada
GST: glutationa s-transferase
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
ICH: *International Conference on Harmonization*
IFCC: *International Federation of Clinical Chemistry*
ISO: *International Organization for Standardization*
IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*
LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
NADP: nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NADPH: forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NAM: *N-(9-acridinyl)maleimide*
O²⁻: íon superóxido
O₂⁻²: íon peroxil
OH⁻: íon hidroxila
SOD: superóxido dismutase
SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida
S-S: ligação dissulfeto
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Glutaciona: introdução à molécula	18
1.2 Síntese da glutaciona	20
1.3 Funções da Glutaciona	21
1.4 Glutaciona e estresse oxidativo	23
1.4.1 GSH e sua associação com doenças	24
1.4.1.1 GSH versus doenças cardiovasculares	24
1.4.1.3 GSH versus diabetes <i>mellitus</i>	25
1.4.1.4 GSH versus infecções virais	25
1.5 Glutaciona redutase	26
1.6 Ensaio para a quantificação de GR	27
1.7 Validação de um método bioanalítico	28
1.7.1 Linearidade	29
1.7.2 Precisão.....	29
1.7.3 Exatidão	30
1.7.4 Contaminação	30
1.8 Valores de referência	31
1.8.1 Determinação dos limites de valores de referência	31
1.8.2 Método não paramétrico	33
1.8.2.1 Apresentação de um valor observado com relação aos valores de referência.....	35
1.9 Interferentes analíticos	36
1.9.1 Classificação dos interferentes	36
1.9.1.1 Hemólise.....	37
1.9.1.2 Icterícia	38
1.9.1.3 Lipemia.....	38
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	41
4 DISCUSSÃO	53
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois artigos, os quais se encontram no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS**. As seções Materiais e Métodos e Resultados encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração dos artigos estão mencionadas nos próprios artigos.

1 INTRODUÇÃO

A glutathiona (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) é o principal tiol não proteico presente no organismo e está envolvida na defesa celular antioxidante. A glutathiona livre está presente principalmente na sua forma reduzida (GSH) e pode ser convertida para a forma oxidada (GSSG) na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs). A razão GSH/GSSG elevada é muito importante para o estado redox celular e uma redução desta razão é frequentemente utilizada como um indicador do estresse oxidativo. A enzima glutathiona redutase (GR) catalisa a redução de GSSG a GSH utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Alguns estudos relatam que a atividade da GR está aumentada em várias doenças, como em tumores do trato gastrointestinal (SCIBIOR et al., 2008), na doença renal crônica (SCHETTLER, 1998) e na angina instável (SAPIRA et al., 2011). Devido a grande importância antioxidante da glutathiona e considerando que a mesma está presente em quase todos os organismos, numerosas pesquisas envolvendo as mais diversas tentativas de detecção de GSH, GSSG e GR em sistemas biológicos tem sido realizadas (REED, 1990; PASTORE et al., 2003; DE VEGA et al., 2003; SAPIRA et al., 2011;).

A atividade da GR tem sido mensurada por alguns métodos analíticos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e fluorescência, porém, estes métodos geralmente não estão disponíveis em laboratórios clínicos e são relativamente desvantajosos por exigirem muito tempo de análise, além de serem relativamente caros e considerados trabalhosos. Em particular, a CLAE apresenta custo elevado, gera uma quantidade excessiva de resíduos, tornando este método inviável também pela questão ambiental (PIGOTT; KARUSO, 2007).

Nos últimos anos a comunidade laboratorial vem aceitando a evidência de que as fases pré e pós-analítica estão mais propensas a erros do que a fase analítica (PLEBANI, 2009). De acordo com estudos, erros pré-analíticos representam mais da metade do total de erros que ocorrem no laboratório clínico (PLEBANI et al., 2006; LIPPI, 2009) e dentro deste tipo de erros, é notável a importância da qualidade das amostras a analisar. Porém, a fase do laboratório conhecida como pré-analítica, vem sendo apontada por diferentes estudos, como a grande responsável pelos erros laboratoriais. A principal razão para a alta frequência de erros nesta fase do processo está na dificuldade de controlar as variáveis pré-analíticas e em realizar melhoria nos processos, pois diversas variáveis encontram-se no preparo do paciente e no

momento da coleta e identificação de amostras biológicas (ROMERO, 2005; PLEBANI, 2007). Estima-se que aproximadamente 70% de todos os diagnósticos são feitos com base nos testes laboratoriais (PLEBANI, 2007), e que os resultados desses testes são responsáveis por afetar entre 60 a 70% das decisões sobre a admissão, alta hospitalar e regime terapêutico dos pacientes (FORSMAN, 1996). Assim, os tipos mais frequentes de interferência pré-analítica em testes de rotina em química clínica são causados por interferentes endógenos como a hemólise, lipemia e icterícia (FLEMING; SWAMINATHAN, 2001). Amostras ictericas de plasma tem uma alta prevalência em pacientes na 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, fármacos como inibidores de protease, estrogênio, anticoncepcionais orais, entre outros (CALMARZA; CORDERO, 2011). 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).

Devido a importante função desempenhada pela enzima GR, bem como o seu envolvimento em diferentes patologias, é relevante a mensuração de sua atividade em amostras de plasma, a fim de elucidar o seu envolvimento em processos inflamatórios, de estresse oxidativo e disfunção endotelial. Desta forma, é de suma importância a validação de métodos automatizados, simples e com boa relação custo-benefício para a mensuração da GR e que seja aplicável aos laboratórios clínicos e de rotina e também determinar seus limites de referência em uma população saudável para que esses valores possam ser comparáveis a outros obtidos e ainda avaliar a interferência analítica da lipemia, hemoglobina e bilirrubina na atividade da GR.

1.1 Glutationa: introdução à molécula

A glutatona é um tripeptídeo contendo tiol, que desempenha um papel importante no organismo. Está envolvida na defesa celular contra xenobióticos e compostos que ocorrem

naturalmente, tais como os radicais livres e hidroperóxidos (PASTORE et al., 2003). Este tripeptídeo linear de aminoácidos foi cristalizado por diversos pesquisadores, onde se verificou a presença relevante de enxofre, sendo assim designada de glutathiona (TEW, 2007). Esta molécula é sintetizada no interior das células. A sua síntese varia de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos (glicina, cisteína e ácido glutâmico), principalmente a cisteína, uma vez que é o aminoácido mais escasso nos alimentos. Este aminoácido apresenta em sua estrutura um componente que o caracteriza bioquimicamente, o enxofre, designado de grupo tiol. Este grupo confere à glutathiona a capacidade de desempenhar as funções que lhe são características e de importância vital ao organismo (HÖER et al., 2001).

Nas células, a glutathiona total pode estar livre ou ligada às proteínas. Na sua maioria, ela está presente principalmente na forma reduzida, que pode ser convertida à forma oxidada durante o processo de estresse oxidativo. O estado redox depende da quantidade relativa das formas reduzida e oxidada da glutathiona (GSH/GSSG), sendo um importante determinante para a célula. Na figura 1 encontra-se a fórmula estrutural da GSH e da GSSG.

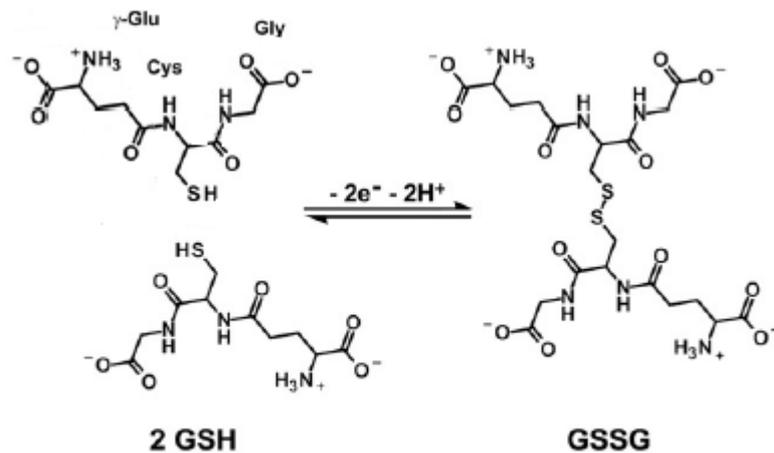


Figura 1 - Fórmula estrutural da glutathiona reduzida (GSH) e da glutathiona oxidada (GSSG). Adaptado de: DEPONTE, 2013.

Em condições normais, a GSH está presente em células de mamíferos em concentrações compreendidas entre 1 e 10 mM, sendo a GSH predominante sobre a GSSG (CHAI et al., 1994). A síntese de GSH associada com a redução de GSSG promove a manutenção do estado redox intracelular, funcionando como cofator para enzimas

citoplasmáticas e indutor de certas modificações translacionais em diversas proteínas (TAPIERO; TEW, 2003). A síntese e a degradação da GSH são realizadas através de reações do ciclo γ -glutamil. Uma vez que este ciclo leva à síntese da GSH, a sua função está intimamente ligada ao metabolismo e a várias funções fisiológicas que são executadas por este tripeptídeo. Os eritrócitos, apesar de não conterem a enzima responsável pela síntese de GSH, apresentam concentrações significativas de GSH no seu meio intracelular (99,5%). No plasma humano, os níveis de glutatona variam entre 10 a 30 $\mu\text{M/L}$ (TEW, 2007).

1.2 Síntese da glutatona

A glutatona está presente majoritariamente nas células na forma reduzida, que é a forma biologicamente ativa. A síntese de GSH ocorre no citosol em duas reações enzimáticas principais. Em células de mamíferos existem três mecanismos que sustentam a manutenção da homeostase da GSH, nomeadamente, “síntese de novo”, “a captação de fontes exógenas através da membrana plasmática”. A outra manutenção é a “redução de GSSG catalisada pela GR” (CHEN, 2007), como demonstra a figura 2.

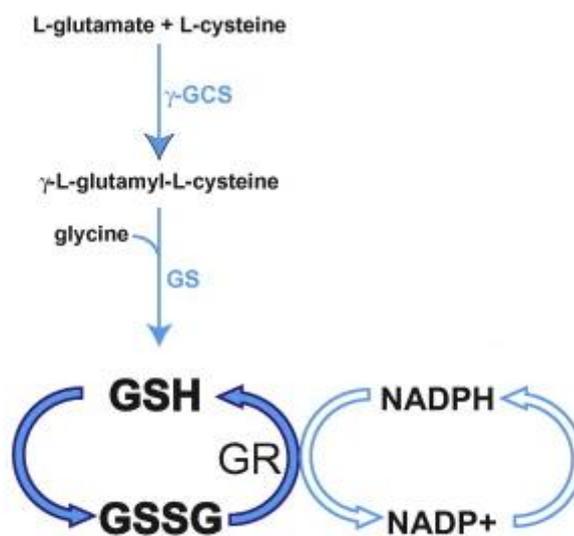


Figura 2 - Representação esquemática da redução da glutatona oxidada para a glutatona reduzida através da enzima glutatona redutase pelo mecanismo NADPH dependente. Adaptada de: LEHANE et al., 2012.

A primeira reação que sustenta a biossíntese da GSH é a formação de uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e a cisteína. Entre estes dois primeiros resíduos de aminoácidos estabelece-se uma ligação do tipo gama. Esta ligação se estabelece entre o grupo carboxílico do glutamato e o grupo amina da cisteína. A ocorrência desta ligação é fundamental para que a glutathiona não sofra degradação através de peptidases intracelulares. A enzima interveniente é a γ -glutamylcisteína sintetase, gerando a γ -L-glutamyl-L-cisteína. Por sua vez este dipeptídeo liga-se à glicina pela ação da glutathiona sintetase. Essa reação é demonstrada na figura 3 (ANDERSON, 1998).

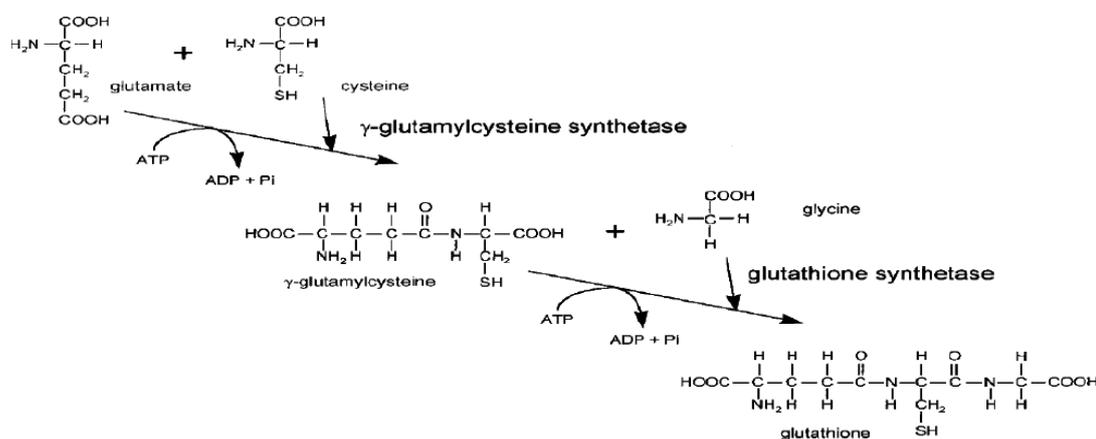


Figura 3 - Representação esquemática das reações intervenientes na biossíntese da glutathiona a partir dos seus aminoácidos constituintes. Adaptado de: NOCTOR et al, 1998.

1.3 Funções da Glutathiona

A GSH é uma molécula que intervêm em diversos processos, como antioxidante e detoxificante, transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da forma ativa de certas enzimas, proteção do organismo contra exposição a radiações solares. Além disso, estudos tem apontado que a GSH pode ter uma participação importante na regulação da morte celular programada (DRINGEN, 2000; FORMAN, 2009; PARK, 2010).

O seu conteúdo no organismo (TAPIERO; TEW, 2003) é um forte indicador do estado fisiológico, sendo que a sua depleção pode ocasionar danos celulares irreversíveis

(FORMAN, 2009). O nível intracelular de glutathiona pode ser preditivo para a longevidade celular (PARK, 2010). Frente ao papel da GSH na proteção contra o estresse oxidativo e detoxificação de xenobióticos, a disponibilidade desta na forma reduzida é um fator chave para a manutenção da saúde. Quanto menor o conteúdo de glutathiona em uma célula, menor a probabilidade de sobrevivência desta célula (FORMAN, 2009).

A GSH é o principal antioxidante produzido pela célula, sendo esta a sua principal função – poder antioxidante – protegendo-a de radicais livres. Esses radicais livres são compostos extremamente reativos que podem danificar ou destruir componentes celulares importantes (membranas, DNA, entre outros) em segundos (LOMAESTRO; MALONE, 1995). Também age como agente neutralizador, desativando os radicais livres, mantendo em simultâneo a funcionalidade de antioxidantes exógenos como, por exemplo, as vitaminas C e E. Esta propriedade só é possível de ser concretizada em um enquadramento enzimático, na qual regem ciclos funcionais enzimáticos que as células desenvolveram contra espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo crucial a presença de enzimas como a GR e a glutathiona peroxidase (GPx) (PENNINCKX, 1999).

Para uma maior proteção da célula, a mesma tem estratégias de combate à agressão por parte dos EROs, nomeadas organelas, como a mitocôndria e o núcleo, que possuem a sua própria reserva de GSH, protegendo individualmente estas estruturas contra a ação dos EROs. Esta proteção é crucial, pois a alteração do estado redox intracelular pode implicar em processos mutagênicos no DNA (LU, 2009).

O par redox GSH/GSSG é um importante indicador do estado redox celular (BALLATORI et al., 2009) e, alterações neste par redox demonstram estarem relacionadas com a proliferação celular, diferenciação e/ou apoptose (PARK, 2010). Como tal, a GSH desempenha um papel crucial na manutenção de um equilíbrio normal entre as espécies oxidantes e antioxidantes, regulando muitas das funções vitais da célula, tais como a síntese e reparação de DNA, síntese de proteínas e ativação e regulação de enzimas, como demonstrado na figura 4 (TAPIERO; TEW, 2003).

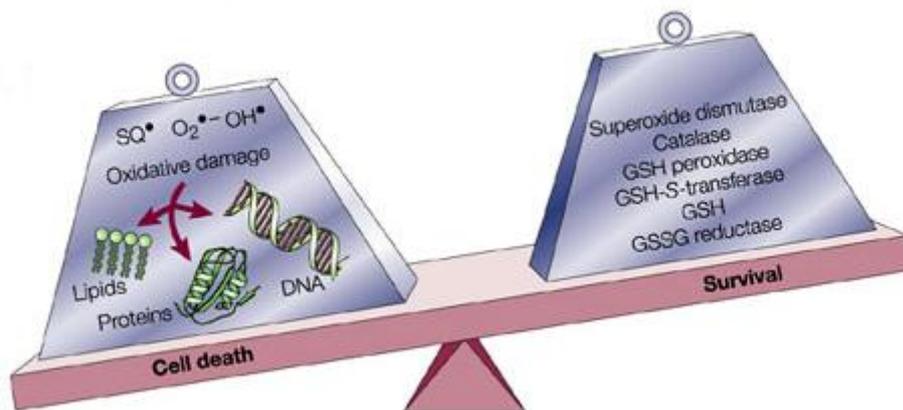


Figura 4 – Espécies reativas do oxigênio (EROs) e a patogênese das desordens neurodegenerativas. Adaptado de: LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002.

1.4 Glutathiona e estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos moleculares que contêm um ou mais elétrons não emparelhados nos orbitais atômicos ou ainda, moléculas que proporcionam um alto grau de reatividade química, o que representa um grande número de efeitos prejudiciais. Os íons de oxigênio mais relevantes são os íons superóxido (O_2^-), íon hidroxila (OH^\bullet) e o íon peróxil (O_2^{-2}). Estes radicais são moléculas que interferem em processos celulares (DE VEGA et al., 2003).

A GSH constitui a primeira linha de defesa contra as EROs que o organismo humano sintetiza a favor da sua homeostasia, neutralizando radicais livres e reduzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A GSH é solúvel em água e é o principal antioxidante do citoplasma. Além da forma direta de atuação da GSH, verifica-se uma segunda linha de defesa contra a oxidação, estando a cargo de enzimas glutathiona-dependentes que atingem principalmente subprodutos nocivos gerados por EROs e evitam em simultâneo a propagação de radicais livres (FRANKLIN, 2010). O papel da GSH também parece ser importante na redução de baixos níveis de H_2O_2 , os quais podem ser formados endógena ou exogenamente. Essa função é mediada através da redução de grupos sulfidríla da hemoglobina, proteínas da membrana e enzimas que possam se oxidar (PASTORE et al., 2003).

Na célula existem duas formas principais de defesa antioxidante: enzimática e não enzimática. A defesa enzimática compreende várias enzimas do ciclo redox da glutathione (GR, glutathione peroxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase), sendo a mais importante a GR (BEATTIE, 2010). Existem ainda outros sistemas enzimáticos intervenientes na defesa antioxidante na qual atuam a enzima superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CHEN, 2010). As enzimas glutathione-dependentes são coordenadamente induzidas à expressão em resposta ao estresse oxidativo, designada cientificamente de *antioxidant responsive element* (ARE). Essas espécies radicalares tem sido envolvidas em mecanismos reativos inflamatórios ou podem atuar como segundos mensageiros de variadas funções celulares. Desta forma, a taxa de formação e remoção de espécies reativas deve ser realizada de forma equilibrada e compensatória para que os processos metabólicos dependentes das mesmas possam decorrer numa proporção adequada para o bom estado fisiológico das células (FRANKLIN, 2010).

1.4.1 GSH e sua associação com doenças

1.4.1.1 GSH versus doenças cardiovasculares

As principais doenças cardiovasculares associadas ao desequilíbrio redox são a hipertensão e aterosclerose. O desenvolvimento da hipertensão está fortemente associado ao aumento das espécies reativas em células endoteliais, assim como ao aumento de angiotensina II, uma vez que é um forte estímulo para a produção de novas espécies reativas de oxigênio. Esta característica foi designada pelo aumento dos níveis de GR nas células do endotélio vascular, provocado pela diminuição da exportação de GSH. Uma hipótese terapêutica sugerida para atenuar estes efeitos é a administração de GSH em lipossomas (BRUGUERA et al., 2002; BALLATORI et al., 2009).

1.4.1.2 GSH versus doenças pulmonares

Diversas células do parênquima pulmonar são capazes de gerar EROs, como células endoteliais, células alveolares tipo II, células ciliadas da via aérea e macrófagos alveolares. Esses sistemas de EROs no pulmão são semelhantes aos dos outros tecidos (BALLATORI et al., 2009). Um desequilíbrio na homeostasia da GSH e no seu estado redox contribuem para a etiologia e progressão de doenças pulmonares como, por exemplo, doença pulmonar obstrutiva crônica, enfisema pulmonar, asma e insuficiência respiratória aguda. (BRUGUERA et al., 2002).

1.4.1.3 GSH versus diabetes *mellitus*

As concentrações de GSH em eritrócitos e plasma sanguíneo são mais baixas em diabéticos e pacientes com síndrome metabólica e, conseqüentemente, os níveis reduzidos de GSH potencializam os efeitos causados pela presença de EROs. Os níveis de GSH podem ser diminuídos de duas formas: efeito direto da glicose e insulina na síntese de GSH ou pelo consumo de um cofator essencial na regeneração de GSH através da GSSG (LU, 2009).

Estudos tem revelado que a GSH pode melhorar o desempenho do organismo no combate à diabetes. A infusão de GSH em pacientes diabéticos tipo 2 melhora a captação de glicose mediada pela insulina e os níveis de GSH nos eritrócitos. A N-acetilcisteína também tem sido estudada verificando-se que o seu uso melhora o estado redox das células (BALLATORI et al., 2009).

1.4.1.4 GSH versus infecções virais

Durante infecções virais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), verifica-se que os níveis de GSH se encontram diminuídos e podem estar associados com a diminuição da capacidade de sobrevivência em indivíduos infectados. Os níveis de GSH encontram-se diminuídos no plasma sanguíneo, no líquido epitelial de revestimento, nas

células mononucleares de sangue periférico e em monócitos de indivíduos infectados pelo HIV (COHEN, 1997).

1.5 Glutationa redutase

A GR é a enzima que reduz a GSSG para GSH pelo mecanismo NADPH dependente, um importante sistema antioxidante celular. Devido a sua significância, a enzima tem sido estudada para a identificação e explicação da sua estrutura, mecanismo cinético e propriedades moleculares desde o ano de 1935 (MELDRUM; TARR, 1935). Essa redução ocorre através da reação a seguir (figura 5):



Figura 5 – Reação da redução da glutatona oxidada para glutatona reduzida através do mecanismo NADPH dependente.

Essa reação é essencial para a manutenção dos altos níveis de GSH nas células (MANNERVIK & CARLBERG, 1985). A principal função da GR no interior do eritrócito é manter os grupos SH reativos da glutatona na forma reduzida. A GR não atua apenas nas pontes dissulfeto formadas pela glutatona, mas também sobre outras ligações dissulfeto formadas por proteínas eritrocitárias, tais como as da membrana celular. A hemoglobina é a principal constituinte do eritrócito e possui dois grupos SH reativos correspondentes a cisteína 93, constituintes das cadeias beta normais. Esses grupos são preservados pela GR. Para que a ação da GR seja adequada ela necessita de NADPH, GSH e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O NADPH é reduzido na via das pentoses pela ação da glicose-6-fosfato desidrogenase. O FAD é derivado do fosforilado da riboflavina e atua como grupo prostético da GR (BARRAVIERA; MACHADO, 1989).

A GR é membro de um grupo de enzimas conhecidas como flavo-dissulfídicas oxidoreduções que também contém thioredoxina redutase, íons de mercúrio e tripanotione redutase. Ela atua na prevenção do estresse oxidativo, pois age aumentando os níveis de GSH, uma molécula antioxidante que pode conter os radicais livres através de seus grupamentos

SH. Sua função também se estende por ser importante na síntese de precursores de DNA, bem como no transporte de prótons da membrana (SERAFINI; ROMEU, 1989).

1.6 Ensaios para a quantificação de GR

As técnicas utilizadas para quantificar a atividade da GR empregam metodologias como a CLAE, fluorimetria, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) e eletroforese capilar (PIGGOT & KARUSO, 2007).

A mensuração da atividade da GR por método fluorimétrico baseia-se na formação de um composto fluorescente quando a N-(9-acridinil) maleimida reage com a GSH e considera-se mais sensível que o método clássico que envolve a mensuração da taxa de oxidação do NADPH. No entanto, o composto fluorescente formado possui um máximo de emissão em 435 nm e, conseqüentemente, o ensaio é susceptível à interferência de autofluorescência e a de fluorescência inerente do NADPH (KAMATA et al., 1993). Além disso, existe um outro método que se baseia no aumento da absorvância a 412 nm quando 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), é utilizado, no entanto, este apresenta baixa sensibilidade, é susceptível a espécies que absorvem a luz violeta, e é limitado pela instabilidade do reagente DTNB (RAHMAN, 2006).

A CLAE tornou-se o método de escolha para mensurar a atividade da GSH, da GR e também para relacionar tióis em amostras biológicas. A determinação simultânea de GR e outros tióis em um único ensaio pode ser feita por meio da escolha apropriada da coluna, derivatização e protocolos de eluição e sistemas de detecção. O ensaio de CLAE é relativamente rápido, altamente específico, sensível e reprodutível, porém geralmente não está disponível na maioria dos laboratórios clínicos. Além disso, a CLAE apresenta alto custo, gera uma grande quantidade de resíduos, tornando este método inviável também pelo seu aspecto ambiental (PASTORE et al., 2003).

A eletroforese capilar tem sido introduzida como um ensaio altamente eficiente, utilizando pouco volume de amostras e de reagentes analíticos. Recentemente, Jin e colaboradores (2000) utilizaram a eletroforese capilar de zona como método de detecção electroquímica (EC-CZE) para determinações de GSH e GR em eritrócitos. Neste ensaio, a célula inteira é injetada numa separação capilar sendo que nenhuma derivatização ou manipulação do fluido intracelular é necessária, o que significa que a quantificação de GSH e

GR seria independente da amostra. A desvantagem deste método, comparado com outros métodos de eletroforese capilar é a impossibilidade de determinar a GSSG (PASTORE et al., 2003).

Um método espectrofotométrico proposto por Mannervick e Carlberg em 1985 para a mensuração da atividade da GR consiste na oxidação do NADPH, o qual é monitorado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm. Uma vez que ensaios espectrofotométricos podem ser adaptados a equipamentos automatizados melhorando a rotina da clínica e a pesquisa em laboratórios, eles também são considerados simples, apresentam maior rapidez em suas análises, bem como a facilidade no manuseio das amostras, são baratos e ainda requerem pouca quantidade de reagentes.

1.7 Validação de um método bioanalítico

A validação de um método é realizada através de um conjunto de testes, em que os métodos analíticos buscam estabelecer e documentar as características de desempenho do método, demonstrando se o mesmo é adequado para um determinado fim analítico. O principal objetivo da validação é demonstrar a confiabilidade de um método específico para a determinação de uma concentração de analito em uma matriz biológica específica, tais como sangue, plasma, urina, saliva ou tecido. No intuito de garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deverá ser submetido à validação, e esta é considerada um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e permanece ao longo do seu desenvolvimento (EMEA, 2012).

O analista deve identificar os parâmetros que são críticos para o desempenho do processo analítico e desenvolver protocolos próprios de validação, incluindo critérios de confiabilidade e o desenvolvimento de uma análise apropriada. Cada método validado indica que o mesmo foi avaliado estatisticamente e é adequado para seu propósito (ERMER, 2001).

Qualquer novo produto que deseja ser regularizado pelos órgãos responsáveis, tanto no Brasil quanto em outros países, exige-se a validação da metodologia analítica. Para isso, a maioria destes órgãos tem estabelecido documentos oficiais, que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (RIBANI et al., 2004). Essas diretrizes fazem parte de comitês e/ou agências nacionais e internacionais credenciadas para verificar a competência dos laboratórios de ensaios, como: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *European Medicines*

Agency (EMEA), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Conference on Harmonization (ICH) e International Organization for Standardization (ISO). Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra ele deve ser validado. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência entre laboratórios (BRASIL, 2003; BRASIL 2003a). Para isso, a maioria deles estabelece documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que o método e o sistema estão adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para a validação de um método, devem ser avaliados diferentes parâmetros, incluindo: linearidade, precisão, exatidão, contaminação.

1.7.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade de demonstrar que uma metodologia analítica obtenha resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco padrões com concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de regressão linear, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática (ANVISA, 2003; EMEA, 2012).

1.7.2 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A repetibilidade ou precisão intracorrida (intraensaio) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária ou precisão intercorridas (interensaio) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medidas diferentes (ANVISA, 2003; EMEA, 2012).

1.7.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Calcula-se a exatidão como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança diferentes (ANVISA, 2003; EMEA, 2012).

1.7.4 Contaminação

A contaminação (*carry-over*) deve ser abordada e minimizada durante o desenvolvimento do método. É realizada pelo método de análise de padrão em duas concentrações diferentes, para avaliar se não há o arraste entre as diferentes concentrações do analito, seguido de intervalos no mesmo dia (ANVISA, 2003; EMEA, 2012).

1.8 Valores de referência

Os valores de referência são os resultados de um certo tipo de quantidade obtida de um único indivíduo ou grupo de indivíduos correspondente a uma descrição declarada que precisa ser divulgada e viabilizada para o uso de outros. É conveniente uma breve descrição de qualidades associadas ao termo valores de referência, como valores de referência associados à saúde (próximo ao que se entende pelo termo obsoleto valores normais) (IFCC, 1987). Além disso, alguns dados complementares devem ser levados em consideração, como o conhecimento da fisiopatologia da doença, a epidemiologia e alguns fatores, como sensibilidade e especificidade, que contribuem para que o resultado possa ser avaliado e o grau com que ele deva ser avaliado. Tudo isso deve passar pelo tratamento estatístico, que leva em consideração a partição dos valores de referência em grupos designados, inspeção da distribuição de cada grupo e a identificação dos valores discrepantes para que sejam determinados os limites dos valores de referência (IFCC, 1987).

Existe mais uma distinção entre valores de referência com base no indivíduo e com base na população. Os valores de referência com base no indivíduo são valores prévios, de um mesmo indivíduo, obtidos quando este estava em um estado definido de saúde. Os valores de referência com base na população são aqueles obtidos de um grupo de indivíduos-referência sistematicamente definido e são usualmente os tipos de valores referidos quando o termo valores de referência é usado sem palavras qualificadoras (IFCC, 1987).

1.8.1 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 *International Federation of Clinical Chemistry* (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.

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) (IFCC, 1987).

O tamanho mínimo requerido de amostras, para a determinação de um valor de referência para um parâmetro laboratorial, na teoria, para a estimativa dos intervalos percentis 2,5 e 97,5 é de 40 valores, mas pelo menos 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 tiver 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 auto-suficiente, do que o método paramétrico (IFCC, 1987).

1.8.2 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 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 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 (IFCC, 1987).

A tabela 2 mostra um exemplo de determinação não paramétrica de percentis utilizando valores de triglicerídeos séricos.

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

POSIÇÃO DOS NÚMEROS			POSIÇÃO DOS NÚMEROS		
Amostragem	Inferior	Superior	Amostragem	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

Fonte: Adaptado de IFCC, 1987.

*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 IFCC, 1987).

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 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	2,9	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):	,58									
Limite de referência superior (percentil 2,5):	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									
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):	$500 + 1 - 19 = 482$									
	$500 + 1 - 7 = 484$									
Limites de confiança:	2,22 e 2,62									
Resumo:										
Limite de referência inferior:	0,58 [0,51-0,65]									
Limite de referência superior:	2,32 [2,22-2,62]									

Fonte: Adaptado de IFCC, 1987.

*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 IFCC, 1987).

1.8.2.1 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 (IFCC, 1987).

Um valor observado 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) (IFCC, 1987).

Outro método de classificação é a expressão do valor observado em uma medida de distância estatística. Por exemplo, a bem conhecida unidade desvio padrão (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 (IFCC, 1987).

1.9 Interferentes analíticos

Nos últimos anos a comunidade laboratorial vem aceitando a evidência de que as fases pré e pós-analítica estão mais propensas a erros do que a fase analítica (PLEBANI, 2009). De acordo com estudos, erros pré-analíticos representam mais da metade do total de erros que ocorrem no laboratório clínico (PLEBANI et al., 2006; LIPPI, 2009) e dentro deste tipo de erros, é notável a importância da qualidade das amostras a analisar (ROMERO, 2005; PLEBANI, 2007). Assim, os tipos mais frequentes de interferência pré-analítica 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 medido podendo levar a uma intervenção clínica inapropriada comprometendo a saúde do paciente (KAZMIERCZAK; CATROU, 2000).

1.9.1 Classificação dos interferentes

Interferência endógena é originada a partir de substâncias que ocorrem naturalmente na amostra do paciente. Elas podem ser substâncias naturais ou relacionadas com a saúde: fatores de hemólise (hemoglobina e outras substâncias), bilirrubina, lipídeos, proteínas, anticorpos. Interferentes exógenos podem ser resultados de substâncias não naturalmente encontrados em amostras do paciente, incluindo a droga (fármaco, metabólitos, e aditivos),

venenos, produtos à base de plantas, de fluidos intravenosos, substâncias utilizadas como terapêutica, entre outros (KROLL, 1994; KAZMIERCZAK; CATROU, 2000; DIMESKI, 2008).

1.9.1.1 Hemólise

A hemólise é uma preocupação crescente nos laboratórios clínicos, sendo uma ocorrência muito frequente, com uma prevalência alta de 3,3% de todas as amostras submetidas a um laboratório clínico (LIPPI et al., 2006). A hemólise é definida como a liberação dos componentes intracelulares de eritrócitos, trombócitos e leucócitos no fluido extracelular, ou seja, no plasma ou no 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; DEUTSCHLAND, 2002; RIOJA et al., 2009; PIYOPHIRAPONG et al., 2010). A hemólise, e consequente contaminação do soro com o conteúdo dos eritrócitos, é fenômeno comum e que pode resultar em potenciais problemas técnicos. A razão para a ocorrência de hemólise *in vitro*, após a coleta da amostra, pode ter várias origens. As mais comuns são físicas e decorrentes de fluxos mais rápidos, a que se submetem as amostras de sangue; isto em geral decorre de problemas na coleta e consequente aplicação de vácuo excessivo, quer na retirada, quer na transferência da amostra. Outra razão pode ser a existência de quantidades mesmo diminutas de água no tubo, o que também ocasiona graus variáveis de hemólise. (SAPIN et al., 1998).

A hemólise pode interferir em parâmetros bioquímicos, causando um aumento da alanina aminotransferase (AST), 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).

1.9.1.2 Icterícia

A icterícia é definida como uma coloração amarelada da pele e deposição de pigmento biliar (bilirrubina) em membranas de mucosas consequentes à deposição, a qual se encontra em níveis elevados no plasma (hiperbilirrubinemia). A icterícia é clinicamente detectada quando a concentração sérica de bilirrubina ultrapassa 2-3 mg/100 mL (valor normal: 0,3–1,0 mg/100 dL). O metabolismo da bilirrubina começa no sistema retículo endotelial, principalmente no fígado e baço, com a remoção dos eritrócitos velhos ou anormais de 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).

Após 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, tem sido relatado os efeitos da interferência da bilirrubina no método de *Jaffé*, 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).

1.9.1.3 Lipemia

Uma amostra lipêmica é o resultado de concentrações elevadas de quilomícrons e de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Lipemia pode interferir em qualquer ensaio que se baseia na detecção de transmissão de luz ou de dispersão (KROLL, 2004; STEEN et al., 2006). Assim, a lipemia é geralmente reconhecida quando as concentrações de triglicérides estão acima de 300 mg/dL (PIYOPHIRAPONG et al., 2010). 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, nutrição parenteral total, fármacos tais como inibidores de protease, o estrogênio e anticoncepcionais orais (CALMARZA; CORDERO, 2011).

A lipemia representa a turbidez no soro ou plasma, que é visível antes do processo de análise. Na maioria das vezes é causada pela ingestão de alimentos com elevado teor de gordura. Pode ocorrer como um resultado da perturbação do metabolismo da lipoproteína ou também da nutrição parenteral (PIYOPHIRAPONG et al., 2010). A interferência causada pela lipemia é devido principalmente a três mecanismos distintos: dispersão de luz, aumentado 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 estarem corretos (KROLL; ELIN, 1994; PIYOPHIRAPONG et al., 2010). 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).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método automatizado para a mensuração da enzima glutationa redutase, determinar seus limites de referência e avaliar a influência da lipemia, da hemoglobina e da bilirrubina sobre os resultados da glutationa redutase.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um protocolo automatizado para a mensuração da atividade enzimática da GR em amostras de plasma no sistema automatizado Cobas Mira[®].
- Avaliar algumas características analíticas, como linearidade, precisão, exatidão e contaminação para o método proposto.
- Determinar os limites de valores de referência para a GR em uma população saudável, de acordo com o método não paramétrico, seguindo recomendações da IFCC.
- Avaliar a interferência pela lipemia, hemoglobina e bilirrubina na mensuração da atividade da enzima GR.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

As seções “Métodos” e “Resultados” estão apresentados no artigo publicado no periódico *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* e no manuscrito, o qual também será submetido para o periódico *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.

ARTIGO

MANUSCRITO

Letter to the Editor

Evaluation of hemoglobin, lipemia and bilirubin in the measurement of the activity of enzyme glutathione reductase in plasma samples

Carine Lima Hermes^{1,2}, Taís Corrêa Almeida^{1,2}, Bruna dos Santos Hausen^{1,2}, Lara Peruzzolo Cargini¹, Etiane Tatsch^{1,2}, José Antonio Mainardi de Carvalho^{1,2}, Rafael Noal Moresco^{1,2*}.

¹Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 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

Keywords: Analytical interference; Glutathione reductase; Hemoglobin; Lipemia; Bilirubin.

Interference studies are they essential part of the evaluation of the analytical specifications of laboratory assays and they are usually performed to establish whether a certain substance present in the sample or the analytical system interferes on the test, causing a deviation in the measurement from the true value (1,2). Some studies have been shown that pre-analytical phase is the most vulnerable to errors, accounting for approximately 60 to 90% of laboratory errors due to the lack of standardization (2,3). The most common interferents in laboratory routine are hemolysis, lipemia and icterus (3,4).

Glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) is the main non-protein thiol and is involved in the antioxidant cellular defense (5). Free glutathione is present mainly in its reduced form (GSH), which can be converted to the oxidized form (GSSG) in the presence of reactive oxygen species (ROS). The enzyme glutathione reductase (GR) catalyzes the reduction of GSSG to GSH utilizing NADPH, according to the following reaction: $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{GSSG} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$ (5). Recently, our research group have developed an automated technique for assessing the GR activity in plasma samples using the Cobas Mira[®] automated analyzer (6).

Considering that the GR activity is increased in some tumors such as in tumor of the gastrointestinal tract (7) and also in other diseases, which the impact of pre-analytical interference can alters the correct value of the measured results (1) and which there are no data in the literature about the interference of hemoglobin, lipemia and bilirubin in measurement GR activity in plasma samples, the aim of this study was to investigate the effects of interference of hemoglobin, lipemia and bilirubin in different levels in plasma samples in the measurement of GR activity.

To carry out this study involving interference (hemoglobin, lipemia and bilirubin) were collected venous blood samples from 30 subjects healthy from Santa Maria city, Rio Grande do Sul, Brazil, after an overnight fast into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth,

UK) tubes with anticoagulant EDTA. These samples were routinely centrifuged at 3000 rpm (1800 xg) for 15 minutes to separate the plasma which will form a pool, which will be used in subsequent tests. This study protocol was approved by the local research Ethics Committee (number 0268.0.243.000-10).

To evaluate the impact of interferents on analytes, was measured in a sample supplemented with concentrations of the interfering, as already standardized by Glick (1986), and the relative deviation of the result from the unsupplemented baseline value was then calculated.

The hemolyzed samples were simulated by addition of the hemoglobin standard 10 g/dL (Labtest[®] Diagnostica, Lagoa Santa, BR) (8). Thus, the measurement of GR activity will be held on 5 final concentrations of hemolysate pool plasma, as follows: 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 g/dL. The lipemic samples were simulated by addition of Intralipid[®] 20% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at concentrations of 10 g/L (8). Thus, the measurement of GR activity will be held on 5 final concentrations of lipemic pool plasma, as follows: 0.67, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/dL. The icteric samples were simulated by addition of 6 mg of the bilirubin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (8). Thus, the measurement of GR activity will be held on 6 final concentrations of icteric pool plasma, as follows: 0.9, 1.9, 3.8, 7.5, 15, and 30 mg/dL. The measurement of GR activity was performed according technique previously described and validated by Hermes et al. (2013) in plasma pool before and after the simulation, later to be able to compare them and see the possible interferences present.

To identify the index of the hemoglobin, lipemia and bilirubin that corresponds to the point where the test differs by >5% (significant interference for enzymes) from the baseline, 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 (8). The end/original value of each analyte result was expressed as percentage and was plotted against the concentration of interferent (figure 1).

In the initial studies, the basal value of GR activity for the measured plasma pool was 82.5 U/L. At the concentrations of 0.0625 g/dL to 1.0 g/dL of the hemoglobin standard added, the decrease of activity GR was of 6.6% (76.8 U/L) to 28.4% (58.8 U/L), respectively, as shown in the Figure 1A. At the concentrations of 0.67 mg/dL to 10 mg/dL of Intralipid[®] 20% added, the decrease of activity GR was of 22.4% (63.7 U/L) to 36.5% (52.2 U/L), as shown in the Figure 1B and when was add concentrations of 0.9 mg/dL of the bilirubin, the decrease of GR activity was 34.8% (53.6 U/L) and for concentration of 30 mg/dL the decrease of GR activity was of 33% (55 U/L), as shown in the Figure 1C.

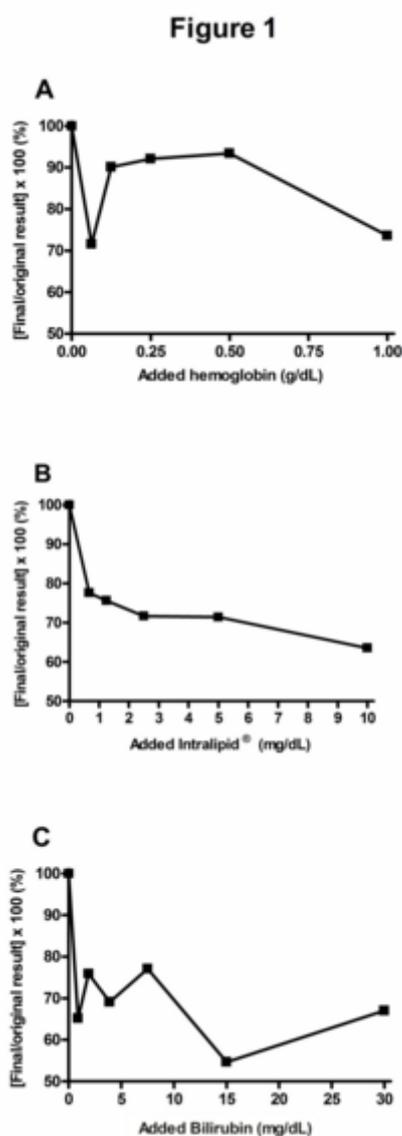


Figure 1. Interferogram of the effect of interferences on analyte results. 1A) Mean of two replicates of effect of hemoglobin standard in different concentrations on analyte results. 1B) Mean of two replicates of effect of Intralipid® 20% in different concentrations on analyte results. 1C) Mean of two replicates of effect of bilirubin in different concentrations on analyte results.

Interference in routine clinical and in chemistry analysis has been defined in different ways, mainly as the effect of a substance present in the sample that alters the correct value of the result usually expressed as concentration or activity for an analyte (1). Although some studies have assessed the interference in some biochemical parameters, to our knowledge, this

is the first report establishing one evaluation quantitative of the interference of hemoglobin, lipemia and bilirubin in GR activity in plasma samples.

In the evaluation of interference by hemoglobin, the results were shown to be decreased, where the percentage from interference was of 6 to 28.4%. The causes of interference due to hemolysis are not always apparent, but some studies have been done. The interference from hemolysis is mostly due to hemoglobin, which has broad and intense absorbance in the ultraviolet and visible regions of the spectrum (9).

In the evaluation of interference by lipemia, the results were linearly decreased for all concentrations added of Intralipid[®] 20%, the percentage of interference found was 22.4% to 36.5%, and this being considered a significant interference to measure the enzyme GR because it is above 5%. In lipemia, chylomicrons and a very low density lipoprotein (VLDL) are suspended particles which change the light scatter, producing cloudiness or turbidity and the lipemia may interfere in any assay that uses the transmission of light as part of the detection scheme (9). This turbidity may be interfering in this case, where one can verify a decrease of glutathione reductase activity when is simulated lipemia in the pool of plasma samples.

In evaluating the interference by bilirubin the results were linearly decreased for all concentrations added of bilirubin, where the percentage of interference found was 22.9% to 45.5%, and this being considered a significant interference to measurement the enzyme GR because it is above 5%. These results showed decrease, compared with the unsupplemented plasma, and this interference can still be considered significant, since it was above 5%. This may be due to bilirubin interfere in colorimetric methods is well documented and presents a potentially serious problem (10). Therefore, we conclude which the hemoglobin, lipemia and bilirubin really interfere in the measurement of the GR activity and were considered as analytical interferences.

Conflicts of interest statement

None of the authors have conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This study was supported by grants to Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

1. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999;36:704-21.
2. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 2007;53:1338-42.
3. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44:750-9.
4. Bonini PA, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli FF. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 2002;48:691-8.
5. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003;333:19-39.
6. Hermes CL, Hausen BS, Sangoi MB, Almeida TC, De Carvalho AM, Gomes P, et al. An automated technique for the measurement of the plasma glutathione reductase activity and determination of reference limits for a healthy population. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:31-3.
7. Scibior D, Skrzycki M, Podsiad M, Czczot H. Glutathione level and glutathione-dependent enzyme activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors. *Clin Biochem* 2008;41:852-8.
8. Glick MR, Ryder W, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem* 1986;32:470-85.
9. Kroll MH, Elin RJ. Interferences with clinical laboratory analyses. *Clin Chem* 1994;40:1996-2005.
10. Vermeer HJ, Thomasse E, de Jonge N. Automated processing of serum indices used for interference detection by the laboratory information system. *Clin Chem* 2007;51:244-7.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi descrito e validado um método analítico automatizado capaz de mensurar a atividade da enzima GR através da técnica de Mannervick e Carberg (1985) modificada. Este método foi adaptado ao sistema automatizado Cobas Mira[®], sendo linear, preciso, exato, simples e aplicável na rotina diária do laboratório clínico, podendo ser utilizado para avaliar o estresse oxidativo, bem como processos inflamatórios, entre outros que podem estar envolvidos em várias desordens patológicas. Embora alguns estudos tenham avaliado a atividade da GR, como o estudo de Schettler e colaboradores (1998) que avaliaram o estresse oxidativo em pacientes em diálise, Scibior e colaboradores (2005) que avaliaram a GR em pacientes com tumor no trato gastrointestinal e Sapira e colaboradores (2011) que avaliaram a GR em pacientes com angina instável, para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que além de validar esta técnica automatizada, determinou os valores de limites de referência para a GR e ainda avaliou seus interferentes pré-analíticos.

O protocolo de automação desenvolvido neste estudo pode ser facilmente adaptado ao analisador automatizado Cobas Mira[®], possibilitando a mensuração da atividade da enzima GR. Métodos como a CLAE, fluorimetria, LC-MS, quimioluminescência e eletroforese capilar são algumas técnicas empregadas para a mensuração da GR em amostras biológicas (PASTORE et al., 2003), no entanto, estes métodos não estão geralmente disponíveis na maioria dos laboratórios de rotina. A mensuração da atividade da GR por método fluorimétrico baseia-se na formação de um composto fluorescente quando a GSH reage com NAM e este é considerado um método mais sensível que o método clássico que envolve a mensuração da taxa de oxidação de NADPH, no entanto, o composto fluorescente formado tem um máximo de emissão em 435 nm e, conseqüentemente, este ensaio é susceptível à interferência de autofluorescência e a partir da fluorescência inerente de NADPH, que é uma parte integrante do ensaio (KAMATA et al., 1993). Além disso, existe outro método que se baseia no aumento da absorvância a 412 nm quando DTNB é utilizado, no entanto, este apresenta baixa sensibilidade, é susceptível a espécies que absorvem luz violeta, e é limitada pela instabilidade do reagente DTNB (RAHMAN, 2006).

Embora, o método espectrofotométrico seja menos sensível do que outros, apresenta algumas vantagens, como simplicidade, facilidade de manuseio, adequação às análises de rotina para o processamento de um grande número de amostras, pouco tempo de análise e

ainda, pouca produção de resíduos. Ultimamente a busca por técnicas simples, rápidas e de baixo custo tem se tornado uma ótima alternativa em laboratórios clínicos, que proporcionem maior rapidez na análise, um mínimo preparo da amostra, baixo consumo de reagentes e menor geração de resíduos. Nesse contexto, a espectrofotometria vem se tornando o método de escolha em muitos laboratórios.

O método automatizado desenvolvido foi baseado nas recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do European Medicines Agency (EMA) 2012. Segundo estes órgãos que regulamentam diversos processos, incluindo a validação, alguns dos parâmetros que devem ser avaliados são: linearidade, exatidão, precisão e contaminação. Foi observado que a mensuração da atividade da GR em amostras de plasma através do método automatizado proposto foi linear na faixa de 10 a 200 U/L, demonstrando que as amostras de plasma podem ser mensuradas dentro deste intervalo de valores. Segundo a ANVISA (2003) e o EMA (2012), o critério mínimo aceitável do coeficiente de regressão linear (r^2) deve ser igual a 0,99, corroborando com o valor de r^2 encontrado neste estudo, o qual foi de 0,99. A precisão de um método analítico pode ser expressa com o DPR ou CV, não se admitindo valores superiores a 15% (ANVISA, 2003; EMA, 2012). Foi realizada a precisão intraensaio com padrões de GR nas concentrações de 50 e 100 U/L, obtendo-se CVs de 5,7 e 3,4%, respectivamente. Para a precisão interensaio os CVs foram 9,5 e 9,9% para os mesmos padrões. Sendo assim, este método demonstrou ser preciso e reprodutível. A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação, sendo que porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno na faixa de 80 a 120% são desejáveis (ANVISA, 2003; EMA, 2012). No método proposto, foi observada uma recuperação de 114,1%, demonstrando este ser exato. Uma possível contaminação entre as amostras durante a análise também foi avaliada através do teste de contaminação (*carry-over*). O CV intraensaio foi de 8,4% para o controle de 50 U/L e 2,6% para o controle de 100 U/L, em comparação com 5,7% e 3,4% dos resultados intraensaio através da análise de precisão. A semelhança destes resultados indicou que o carregamento entre as amostras foi o menor possível, não ocorrendo contaminação entre as amostras analisadas.

Para se obter resultados confiáveis e que ao mesmo tempo condizem com valores que possam ser comparáveis aos valores de referência, é necessário a confiabilidade dos mesmos. O emprego do termo “limites de referência” sempre esteve relacionado à interpretação de resultados de exames de análises clínicas. Em geral, os médicos utilizam os termos “valor normal” ou “limite de normalidade” para definir parâmetros biológicos como glicemia e colesterolemia. Portanto, dependendo do contexto, o termo “valores normais” pode significar

o valor associado à ausência de doença (não patológico, sadio) ou ao valor encontrado na população em geral (MUTTI, 1999; OLIVEIRA; SIQUEIRA, 2003). Neste estudo, foram avaliados 143 indivíduos saudáveis, sendo estes 61 homens e 82 mulheres com idade média de $49,1 \pm 15,4$ anos. Os limites de referência para a GR foram determinados a partir das recomendações da IFCC.

Os valores observados para os limites de referência de GR variaram de 20,2-22,8 U/L para o limite inferior e 54,2-71,7 para o limite superior. Com isso, considerando um nível de confiança de 90%, os limites de referência para a GR em amostras de plasma de indivíduos saudáveis são de 21,7 a 60,3 U/L. Uma vez que o aumento da atividade desta enzima pode estar envolvido em muitas desordens clínicas em que o estresse oxidativo está envolvido, Ścibior e colaboradores (2008), relataram a mensuração da atividade da GR em pacientes com tumores do trato gastrointestinal, antes e após a cirurgia, em comparação com um grupo de pacientes controle o qual consistiu de pacientes saudáveis. Os valores médios da atividade de GR em plasma de pacientes doentes foi considerado estatisticamente aumentado em comparação com a atividade de GR em pacientes saudáveis, que foi de 30 U/L (SCIBIOR et al., 2008). Estes valores de atividade de GR encontrados no grupo controle está de acordo com os limites de referência encontrados em nosso estudo. Posteriormente, Sapira e colaboradores (2011), relataram um aumento da atividade da GR em pacientes com angina instável, no momento da admissão no hospital. A atividade média de GR no plasma em pacientes com angina instável foi de 116,45 U/L e em pacientes controle saudáveis foi 60,66 U/L, sendo o resultado dos pacientes controle semelhante com os limites de valores de referência propostos, os quais também são semelhantes aos encontrados neste estudo para uma população saudável.

A interferência analítica causada por fatores pré-analíticos é uma fonte significativa de erros nas análises de laboratório clínico, que ocorre quando uma substância ou processo possa vir a alterar falsamente um resultado (CARRARO, 2007; LIPPI, 2009). Os interferentes mais comuns na rotina laboratorial são a lipemia, hemoglobina e bilirrubina, as quais estão presentes em algumas situações clínicas, tal como na anemia hemolítica, cirrose hepática e dislipidemia, respectivamente (DIMESKI, 2008).

Na lipemia, quilomícrons e VLDL são partículas suspensas que mudam a difusão da luz, produzindo turvação. A lipemia pode interferir em qualquer ensaio que utiliza a transmissão de luz, como parte do sistema de detecção. As amostras turvas causam atenuação da intensidade de luz que passa através de uma amostra devido à refletância de dispersão ou absorção (KROLL, 2004). Na avaliação da interferência pela lipemia, os resultados

encontraram-se diminuídos linearmente, para todas as concentrações adicionadas de Intralipid[®] 20%, sendo que a percentagem de interferência encontrada foi de 22,39% a 36,45%, e esta interferência foi considerada significativa para a mensuração da enzima GR, pois foi maior que 5%.

Na avaliação da interferência pela hemoglobina, os resultados encontraram-se diminuídos, onde a percentagem de interferência foi de 6 a 28%. Esta interferência foi considerada significativa, pois para enzimas, um percentual acima de 5% (VERMEER et al., 2005) já é considerado como interferência. As causas de interferência devido à hemólise nem sempre são evidentes, mas alguns estudos têm sido feitos. A interferência da hemólise é principalmente devido à hemoglobina, que tem ampla e intensa absorção nas regiões ultravioleta e visível do espectro (KROLL; ELIN, 1994).

Ao avaliar a interferência pela icterícia, os resultados da atividade da enzima GR foram significativamente reduzidos, obtendo-se uma percentagem de interferência a partir de 34,80%, na concentração de 0,9 mg/dL e de 45,35% para 30 mg/dL de bilirrubina. Estes resultados encontraram-se diminuídos, em comparação com o plasma não enriquecido, e esta interferência é considerada significativa, uma vez que foi superior a 5%. Isto pode ser devido ao fato da bilirrubina interferir em métodos colorimétricos (VERMEER et al., 2005). A bilirrubina é oxidada em uma reação cinética com, H₂O₂, e a sua diminuição de absorbância é sobreposta sobre a reação dos principais triglicerídeos (RYDER, 1991; OWEN; KEEVIL, 2007).

Desta forma, o desenvolvimento e a validação do método proposto possibilitou o desenvolvimento de um ensaio automatizado para a mensuração da atividade da GR em amostras de plasma, sendo este linear, preciso e exato, além do mesmo ser simples, de baixo custo (R\$ 1,00 por teste), gera poucos resíduos e ainda é facilmente adaptável ao analisador Cobas Mira[®]. Foi possível também a determinação dos limites de referência da GR para uma população saudável seguindo recomendações da IFCC (1987), os quais foram de 21,7 a 60,3 U/L. Ainda, de acordo com os dados apresentados, quando foi adicionado Intralipid[®] 20% simulando amostras lipêmicas, todas as concentrações interferiram na mensuração da atividade da GR, bem como também todas as concentrações de padrão de hemoglobina simulando amostras hemolisadas interferiram na mensuração da GR, sendo uma percentagem de 28,8% para a menor concentração e todas as concentrações de bilirrubina simulando amostras ictericas interferiram na mensuração da GR sendo que a menor concentração interferiu com uma percentagem de 34,8%.

5 CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido e validado um método analítico automatizado para a mensuração da atividade da glutatona redutase, sendo este adaptado ao analisador Cobas Mira[®].
- O método automatizado desenvolvido foi linear, preciso e exato.
- Este estudo propiciou um protocolo automatizado para a mensuração da atividade da enzima glutatona redutase.
- Foram determinados os limites de valores de referência em amostras de plasma para uma população saudável, de acordo com o método não paramétrico, seguindo recomendações da IFCC, sendo que os limites foram de 21,7 a 60,3 U/L.
- Pode-se concluir também que a lipemia, hemoglobina e a bilirrubina interferem na mensuração da atividade da glutatona redutase, quando mensurada pelo método apresentado neste estudo.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 111, p. 1-14, 1998.

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

BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 390, p. 191-214, 2009.

BARRAVIERA, V.; MACHADO, P. E. A. Glutathione reductase e grupos SH reativos intracitoplasmáticos: revisão. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v.61, p. 399-403, 1989.

BEATTIE, M. C. Effect of glutathione: redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, p. 147-154, 2010.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. INMETRO: DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos**. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

BRUGUERA, J. et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v. 168, p. 99-106, 2002.

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

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 5475–5480, 1975.

CARRARO, P. et al. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 1338-1342, 2007.

CHAI, Y. C. et al. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 310, p. 273-281, 1994.

CHEN, A.; YUMEI, F.; ZHENG, S. De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 444-450, 2007.

CHEN, H.; ZHOU, L.; LIN, C. Y., et al. Effect of glutathione: redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, p. 147-154, 2010.

COHEN, G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: A continuum or distinct modes of cell death? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 75, p. 153-177, 1997.

DA FONSECA, W. Haemoglobin interference in the bichromatic spectrophotometry of NAD(P)H at 340/380 nm. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 31, p. 595-601, 1993.

DE VEGA, L. et al. Study of the activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, and glutathione reductase in renal transplants. **Transplantation Proceedings**, v. 35, p. 1346-1350, 2003.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3217-3266, 2013.

DIMESKI, G. Interference testing. **The Clinical Biochemistry Reviews**, v. 29, p.43-48, 2008.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 649-660, 2000.

EMEA. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation, 2012.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

FLEMING J. J.; WANINATHAN, S. Interference in autoanalyzer analysis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 16, p. 22-30, 2001.

FORMAN, H. J.; RINNA, A.; ZHANG, H. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FORSMAN, R. W. Why is the laboratory an afterthought for managed care organizations? **Clinical Chemistry**, v. 42, p. 813-816, 1996.

FRANKLIN, C. C. Enhanced glutathione: biosynthetic capacity promotes resistance to AS^{3+} - induced apoptosis. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 390, p. 191-214, 2010.

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**, v. 24, n. 8, 2009.

HÖER, N. F.; JÚNIOR, L. R., KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 112-119, 2001.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY, Expert Panel on Theory of Reference Values. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 5. Statistical Treatment of Collect Reference Values. Determination of Reference Limits. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 25, p. 645-656, 1987.

JIN, W.; LI, W.; XU, Q. Quantitative determination of glutathione in single human erythrocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Electrophoresis**, p. 774-779, 2000.

KAMATA, T. et al. Highly sensitive enzymatic assay of sulfhydryl compounds and the enzyme activities by *N*-(9-acridynil) maleimide fluorometry. **Analytical Science**, v. 9, p. 867-870, 1993.

KAZMIERCZAK, S. C.; CATROU, P. G. Analytical interference. More than just a laboratory problem. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 113, p. 9-11, 2000.

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

KROLL, M. H.; ELIN R. J. Interferences with clinical laboratory analyses. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 1996-2005, 1994.

KROLL, M. H. Evaluating interference caused by lipemia. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 1968-1969, 2004.

LEHANE, M. A. et al. Degrees of chloroquine resistance in *Plasmodium* – Is the redox system involved? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 47-57, 2012.

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

LIPPI, G. Governance of pre-analytical variability: traveling the right path to the bright side of the moon? **Clinica Chimica Acta**, v. 404, p. 32-36, 2009.

LOMAESTRO, B.; MALONE, M. Glutathione in health and disease: Pharmacotherapeutic Issues. **The Annals of pharmacotherapy**, v. 29, p. 1263-1273, 1995.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 932-942, 2002.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 42-59, 2009.

MANNERVIK, B.; CARLBERG, I. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985.

MELDRUM, N.U.; TARR, H.L. The reduction of glutathione by the Warburg-Christian system. **The Biochemical Journal**, v. 29, p. 108-115, 1935.

MUTTI, A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. **Toxicology Letters**, v. 108, p.77-89, 1999.

NOCTOR, G. et al. Glutathione biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 623-647, 1998.

OLIVEIRA, D. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Valores de referência de bioindicadores: uma visão geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 16, p. 49-53, 2003.

OWEN, L. J.; KEEVIL, B. G. Does bilirubin cause interference in Roche creatinine methods? **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 370-371, 2007.

PARK, W. H.; YOU, B. R. Gallic acid induced lung cancer cell death is related to glutathione: depletion as well as reactive oxygen species increase. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1356-1362, 2010.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.

PENNINCKX, M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 737-739, 1999.

PIGGOTT, A. M.; KARUSO, P. Fluorometric assay for the determination of glutathione reductase activity. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 22, 2007.

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

PLEBANI, M. et al. Laboratory network of excellence: Enhancing patient safety and service effectiveness. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, p. 150-160, 2006.

PLEBANI, M. Towards quality specifications in extraanalytical phases of laboratory activity. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, p. 576-577, 2007.

PLEBANI, M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. **Clinica Chimica Acta**, v. 404, p. 16-20, 2009.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 3159-3165, 2006.

REED, D.J.; Glutathione: toxicological implications. **Annual review of Pharmacology and toxicology**, v. 30, p. 603-631, 1990.

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

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIOJA, R. G. et al. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. *Revista Del Laboratorio Clínico*, v. 2, p. 185-195, 2009.

RYDER, K. W. Effects of hemolysis, icterus, and lipemia on automated immunoassays. **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 1134-1135, 1991.

ROMERO, A. et al. Identification of preanalytical mistakes in the stat section of the clinical laboratory. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 43, p. 974-975, 2005.

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

SAPIRA, V et al. Glutathione reductase levels in patients with unstable angina. **Romanian Journal of Internal Medicine**, v. 49, p. 197-201, 2011.

SAPIN, R. et al. Insulin measurements in haemolysed serum: influence of insulinase inhibitors. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, p. 111-117, 1998.

SCIBIOR D. et al. Glutathione level and glutathione-dependent enzyme activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors. *Clinical Biochemistry*, v. 41, p. 852-858, 2008.

SCHETTLER V. et al. Oxidative stress during dialysis: effect on free radical scavenging enzyme (FSRE) activities and glutathione (GSH) concentration in granulocytes. **Nephrology, dialysis, transplantation**, v. 13, p. 2588-2593, 1998.

SERAFINI, M. T.; ROMEU, A. Steady-state kinetic studies of glutathione reductase. **Revista Española de Fisiología**, v. 45, p. 199- 202, 1989.

STEEN, G. et al. Multicenter evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Synchron LX-20 assays. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, p. 413-419, 2006.

TAPIERO, H.; TEW, K. D. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 145-155, 2003.

TEW, K. D. Redox in redux: Emergent roles for glutathione S-transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 73, p. 1257-1269, 2007.

VERMEER, H. J.; THOMASSE, E.; DE JONGE, N. Automated processing of serum indices used for interference detection by the laboratory information system. **Clinical Chemistry**, v. 51, p. 244-247, 2005.