

Vanda Patrícia Pinto Peixoto

Avaliação do Stress Oxidativo na Disfunção Erétil

Dissertação de Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica de Professor Doutor Rúben Fernandes, Professor Adjunto das Ciências Químicas e das Biomoléculas da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto; co-orientação de Professor Doutor José Maria La Fuente de Carvalho, Professor Catedrático Convidado de Urologia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e co-orientação de Mestre Mónica Vieira, Assistente das Ciências Químicas e das Biomoléculas da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto.

Mestrado em
Tecnologia Bioquímica em Saúde
Dezembro de 2012

"Quando temos sede parece-nos que poderíamos beber todo um oceano: é a fé; e quando bebemos, bebemos um copo ou dois: é a ciência."

Anton Tchekhov

Agradecimentos

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, em especial a Área Científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas por me terem acolhido e apoiado na execução deste projeto.

Ao Professor Doutor Rúben Fernandes por toda a disponibilidade, simpatia, alegria, motivação, orientação científica, apoio e palavras encorajadoras, um enorme e sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor José LaFuente de Carvalho e ao Centro Hospitalar do Porto (Hospital de Santo António) pela possibilidade de participar neste entusiasmante projeto, o meu sincero agradecimento.

À Mestre Mónica Vieira, pelo apoio e incentivo permanentes, pela transmissão de conhecimentos, pela orientação, pela simpatia, pela paciência e pelo tempo despendido, a minha gratidão.

A todos os meus colegas do Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde, um muito obrigado pelo vosso companheirismo, união e por todos os bons momentos.

Agradeço a todos os meus amigos que conseguiram compreender minimamente a razão das minhas mudanças de humor.

O agradecimento mais especial vai para a minha família. Muito obrigada pai e mãe, vocês são a minha motivação. Obrigado irmão pela ajuda e pela calma que me transmite. Obrigado Cláudio, pela tua paciência e pelo apoio incondicional até ao último minuto...

Resumo

As sequelas fisiopatológicas do stress oxidativo são difíceis de quantificar. Apesar dos obstáculos, a relevância médica do stress oxidativo tem vindo a ser cada vez mais reconhecida, sendo hoje em dia encarado como um componente chave de virtualmente todas as doenças. A disfunção erétil (DE) surge neste contexto como uma espécie de barómetro da função endotelial e do dano oxidativo. A quantificação de biomarcadores de stress oxidativo poderá apresentar um enorme impacto na avaliação de pacientes com DE. O rácio glutatona reduzida/oxidada (GSH/GSSG) e a nitrotirosina (3-NT) têm vindo a demonstrar relevância clínica. A consideração de polimorfismos genéticos constitui ainda uma abordagem promissora na avaliação destas relações no futuro. Um método altamente sensível de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi desenvolvido para a determinação de 3-NT em plasma humano. As concentrações de 3-NT medidos em indivíduos com DE foram $6,6 \pm 2,1 \mu\text{M}$ (média \pm S.D., $n = 46$). A medição da concentração plasmática de 3-NT poderá revelar-se útil como marcador de dano oxidativo dependente do óxido nítrico (NO). O nível de stress oxidativo pode também ser quantificado através da medição do decréscimo do rácio GSH/GSSG, que tem mostrado alterações numa miríade de patologias, como a DE e a *diabetes mellitus*. O método proposto para a quantificação do rácio GSH/GSSG em HPLC apresenta a vantagem de avaliação concomitante dos dois parâmetros em apenas uma corrida. O valor do rácio GSH/GSSG obtido a partir de sangue de indivíduos com DE foi $11,9 \pm 9,8$ (média \pm S.D., $n = 49$). Os resultados estatísticos revelaram diferenças significativas ($p < 0,001$) entre ambos a concentração plasmática de 3-NT e o rácio GSH/GSSG de sangue de indivíduos com DE e as respetivas medições em indivíduos saudáveis. Observaram-se ainda diferenças estatisticamente significativas ($p \approx 0,027$) entre o rácio GSH/GSSG do sangue de pacientes apenas com diagnóstico de DE e a medição respetiva em indivíduos com DE e comorbilidades cardiovasculares. Estes resultados enfatizam o papel do dano oxidativo na biopatologia da DE, elucidado com o auxílio destas duas metodologias, que poderão ter um amplo campo de aplicação no futuro, dado que se mostraram simples, não dispendiosas e rápidas, podendo eventualmente adequar-se a estudos de rastreio em larga escala.

Keywords: Disfunção erétil; *diabetes mellitus*; Stress Oxidativo; 3-NT; rácio GSH/GSSG, Polimorfismos GSTM1/GSTT1; Polimorfismos I/D.

Abstract

The pathophysiological sequelae of oxidative stress are difficult to quantify. Despite these impediments, the medical significance of oxidative stress has become increasingly recognized to the point that it is now considered a key component of virtually every disease. Erectile dysfunction (ED) has particularly emerged as a barometer of endothelial function and oxidative burden. Indeed, the measurement of oxidative stress biomarkers may have a great impact on the evaluation of ED patients as well as in the management of accompanying disorders. Among these biomarkers, glutathione reduced/oxidized (GSH/GSSG) ratio and nitrotyrosine (3-NT) seem to be clinically relevant. Genetic polymorphisms are also a challenging approach to evaluate these relationships in the future. A highly sensitive high-performance liquid chromatographic method (HPLC) was developed for determination of 3-NT in human plasma. The 3-NT level was $6,6 \pm 2,1$ (mean \pm S.D., n = 46) in plasma from ED individuals. Since 3-NT is a stable product of peroxynitrite, the measurement of its plasma concentration may be useful as a marker of nitric oxide-dependent oxidative damage. The level of oxidative stress can also be quantified in blood through the measurement of the decrease in the GSH/GSSG ratio, which has been shown to be altered in a variety of human diseases such as ED and *diabetes mellitus*. The proposed method for GSH/GSSG detection by HPLC separation has the advantage of allowing evaluation of both parameters within a single run concomitantly. The GSH/GSSG ratio level was $11,9 \pm 9,8$ (mean \pm S.D., n = 49) in blood from erectile dysfunction individuals. Statistical results have shown significant differences ($p < 0,001$) between both the 3-NT concentrations in human plasma and the GSH/GSSG ratio of blood from erectile dysfunction patients and those of healthy individuals. There were also found significant differences ($p \approx 0,027$) between GSH/GSSG ratio of blood from patients with ED only and of those with ED and cardiovascular comorbidities. These results emphasize the role of oxidative damage in ED pathobiology while using these two methods, which could have a wide application in the future since they have proven to be simple, cost-effective and not time-consuming, especially suitable for large-scale screening studies.

Keywords: Erectile dysfunction; *diabetes mellitus*; oxidative stress; 3-NT; ratio GSH/GSSG, GSTM1/GSTT1 polymorphisms; I/D polymorphisms.

Índice

Capítulo I: Introdução	1
1.1. Disfunção erétil	3
1.1.1. Anatomia do pênis e mecanismo fisiológico da ereção	4
1.1.2. <i>Diabetes mellitus</i> e disfunção erétil	7
1.2. Stress oxidativo	10
1.2.1. Nitrotirosina	11
1.2.2. Rácio GSH/GSSG	13
1.2.3. Cromatografia	17
1.3. Polimorfismos genéticos	19
1.3.1. Polimorfismos da GST: GSTM1 e GSTT1	19
1.3.2. Polimorfismos da Enzima conversora da angiotensina: I/D	20
Capítulo II: Material e Métodos,.....	21
2.1. Reagentes e químicos	23
2.1.1. Preparação das soluções de trabalho	24
2.1.1.1. Nitrotirosina	24
2.1.1.2 Glutationa	24
i) Método A	24
ii) Método B	25
2.1.2. Preparação dos padrões	25

2.1.2.1. Nitrotirosina	25
2.1.2.2. Glutathiona	25
i) Método A	25
ii) Método B	26
2.2. Amostras	26
2.2.1. Preparação das amostras para análise cromatográfica	26
2.3. Métodos.....	27
2.3.1. Análise por HPLC	27
2.3.1.1. Sistema cromatográfico	27
2.3.1.2. Condições cromatográficas para pesquisa de 3-NT	28
2.3.1.3. Condições cromatográficas para pesquisa das glutathionas	29
i) Método A	29
ii) Método B	29
2.3.1.4. Processamento e análise de dados	30
2.3.2. Análise por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	31
2.3.2.1 Extração de ADN e amplificação genética por <i>Polymerase Chain Reaction</i>	31
2.3.2.2. PCR para estudo do Polimorfismo I/D da ECA	31
2.3.2.3. PCR para estudo dos Polimorfismos GSTM1 e GSTT1 da GST	32
2.3.3. Análise estatística	33

Capítulo III: Resultados	35
3.1. Nitrotirosina	37
3.2. Glutathiona	43
Capítulo IV: Discussão	51
4.1. Nitrotirosina	53
4.2. Glutathiona	57
4.3. Limitações	60
4.4. Perspetivas Futuras	61
Capítulo V: Conclusão	63
Referências bibliográficas	67

Índice de abreviaturas

- ADN – ácido desoxirribonucleico
- ARN – ácido ribonucleico
- cGMP – guanosina monofostato cíclica
- DAD – detetor de díodos
- DC – cloreto de dansilo
- DCV – doença cardiovascular
- DNase - desoxirribonuclease
- DPOC – doença pulmonar obstrutiva crónica
- DE - disfunção erétil
- EAA – European Association on Andrology
- ECD – detetor eletroquímico
- eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
- FL – detetor de fluorescência
- GC – cromatografia gasosa
- GMP – guanosina monofosfato
- GP – glutaciona peroxidase
- GR – glutaciona reductase
- GSH – glutaciona reduzida
- GSSG – glutaciona dissulfureto/glutaciona oxidada
- GST – glutaciona-S-transferase
- EAM - Enfarte agudo de miocárdio
- H₂O₂ – peróxido de hidrogénio
- H₃PO₄ – ácido ortofosfórico

HbA1c – hemoglobina glicada

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

HTA – hipertensão arterial

iNOS – óxido nítrico sintase induzida L2 – vértebra lombar 2

LC – cromatografia líquida

LD – limite de deteção

LQ – limite de quantificação

MeOH - metanol

MS – espetrometria de massa

NO – óxido nítrico

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fostato

NADH – nicotinamida adenina nucleótido

3-NT – 3-nitrotirosina

O_2^- - radical superóxido

$ONOO^-$ - peroxinitrito

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDE 5 – fosfodiesterase 5

RNase - ribonuclease

ROS – Espécies reativas de hidrogénio

S2 - vértebra sacral 2

S4 - vértebra sacral 4

T11 – vértebra torácica 11

TFA – ácido trifluoroacético

Índice de tabelas

Tabela 1 – Fórmulas das substâncias utilizadas	23
Tabela 2 – Método cromatográfico para detecção e quantificação da 3-NT	28
Tabela 3 – Método cromatográfico para detecção e quantificação da GSH e GSSG (Método A)	29
Tabela 4 - Método cromatográfico para detecção e quantificação da GSH e GSSG (MétodoB)	30
Tabela 5 – Reagentes, Condições e tamanho dos fragmentos para reação I	31
Tabela 6 – Reagentes, Condições e tamanho dos fragmentos para reação II	32
Tabela 7 – Reagentes, Condições e tamanho dos fragmentos para reação PCR Multiplex.	32
Tabela 8 – Tempo de retenção da 3-NT e parâmetros quantitativos do método desenvolvido	38
Tabela 9 – Áreas de 3-NT	40
Tabela 10 – Concentrações da 3-NT	40
Tabela 11 – Avaliação da concentração de 3-Nt relativamente ao valor de referência no plasma.....	41
Tabela 12 – Estudo da comparação de 3-NT no plasma e em sangue total	41
Tabela 13 - Frequência da diabetes, HTA, EAM e dislipidémia na população em estudo (para avaliação de 3-NT)	41
Tabela 14 – Mediana das concentrações de 3-NT no sangue total	42
Tabela 15 – Média das concentrações de 3-NT no plasma	42
Tabela 16 – Mediana das concentrações de 3-NT no plasma	42

Tabela 17 – Estudo da concentração de 3-NT em indivíduos somente com DE em relação a indivíduos com outras patologias (no plasma)	43
Tabela 18 - Tempo de retenção de GSH e GSSG e parâmetros quantitativos do método desenvolvido	46
Tabela 19 - Áreas e rácio GSH/GSSG	49
Tabela 20 - Rácio GSH/GSSG das amostras relativamente ao valor de referência em sangue total	49
Tabela 21 – Estudo Estatístico dos rácios GSH/GSSG nas amostras de sangue total.....	50
Tabela 22 – Rácio GSH/GSSG em indivíduos só com DE vs indivíduos com DE e outras patologias	50

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura do pénis	5
Figura 2 – Corte transversal do pénis	5
Figura 3 – Influência da diabetes na DE	9
Figura 4 – Formação de nitrotirosina a partir de peroxinitrito e tirosina.....	11
Figura 5 – Glutationa na sua forma oxidada e reduzida	13
Figura 6 – Conjugação da glutaciona com um xenobiótico	14
Figura 7 – Mecanismos antioxidantes envolvendo a glutaciona reduzida	15
Figura 8 – Componentes genéricos de HPLC	17
Figura 9 - Hitachi® High-Performance Liquid Chromatograph LaChrom Elite	27
Figura 10 – Evolução do gradiente de eluentes num ensaio para deteção e quantificação de 3-NT	28
Figura 11 – Evolução do gradiente de eluentes num ensaio para deteção e quantificação de GSH e GSSG (Método A)	29
Figura 12 – Evolução do gradiente de eluentes num ensaio para deteção e quantificação de GSH e GSSG (Método B)	30
Figura 13 – Cromatografia de padrão GSH	30
Figura 14 – Espetro de absorção da 3-NT	37
Figura 15 – Curva de calibração de 3-NT	37
Figura 16 – Cromatograma dos padrões de 3-NT	38
Figura 17 – Cromatogramas de uma amostra (deteção de NT)	39
Figura 18 – Cromatogramas dos padrões pelo método baseado na deteção por FL (deteção de GSH e GSSG)	43

Figura 19 - Espectro de absorção GSH+GSSG	44
Figura 20 - Curva de calibração de GSH	44
Figura 21 – Curva de calibração de GSSG	45
Figura 22 – Curva de calibração de GSH+GSSG ($\lambda=200\text{nm}$, $\lambda= 215\text{nm}$, $\lambda= 225\text{nm}$).....	45
Figura 23 – Curva de calibração de GSH+GSSG ($\lambda=200\text{nm}$).....	46
Figura 24 – Cromatogramas dos padrões de GSH+GSSG	47
Figura 25 – Cromatogramas de uma amostra (deteção de GSH+GSSG)	48
Figura 26 – Espectro UV da tirosina e da nitrotirosina	54

Capítulo I:

Introdução

1. Introdução

1.1. Disfunção erétil

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade, constante ou recorrente, de obter ou manter uma ereção que permita a atividade sexual (Agarwal *et al.*, 2006). O termo mais utilizado, inicialmente, para referir esta patologia era “impotência”. No entanto trata-se de uma designação com conotação depreciativa e não específica, tendo sido posteriormente substituída por disfunção erétil (Moreira *et al.*, 2002).

A DE é uma patologia bastante comum que pode atingir os homens de qualquer idade, tornando-se mais frequente com o avançar dos anos. De acordo com as *Guidelines* da *European Association on Andrology* (EAA), a DE e a ejaculação precoce são as duas principais queixas sexuais masculinas, afetando a saúde física e psicossocial dos indivíduos (Hatzimouratidis *et al.*, 2010). A DE afeta mais de 150 milhões de homens em todo o mundo (Lippi *et al.*, 2012). Embora não coloque os pacientes em risco de vida, a DE não pode ser vista como um distúrbio benigno, pois pode ter importantes consequências negativas nos relacionamentos interpessoais, no bem-estar e na qualidade de vida dos pacientes (Moreira *et al.*, 2002).

A ereção resulta de um processo neurovascular complexo, com controlo hormonal. Encarada anteriormente como uma patologia de causas primariamente psicológicas, a DE tem com maior frequência uma etiologia física, geralmente uma doença crónica sistémica, o efeito secundário de um tratamento instituído ou ainda a combinação destes fatores, originando um grande impacto na qualidade de vida do paciente, do parceiro e da família em geral (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

De acordo com um estudo de Teles *et al.*, em Portugal, a DE apresenta uma prevalência de 29% em homens entre os 40-49 anos, sendo que este valor aumenta para 50% para idades entre 50-59 anos. Dos 60 aos 69 anos esta percentagem passa para os 74% (Teles *et al.*, 2008). Outros estudos apontam para que a DE afete mais de metade dos homens com idades superiores a 40 anos (Trussell & Legro, 2007). De acordo com a *Episex-pt* (Vendeira *et al.*, 2011), um estudo levado a cabo pela Sociedade Portuguesa de Andrologia com o apoio dos Laboratórios Pfizer[®], a DE apresenta uma prevalência global de cerca de 13% em Portugal e continua a ser, para muitos, um assunto tabu. O tema é muitas vezes

abordado com dificuldade, até mesmo com o médico de família. Alguns homens revelam-se reticentes em reportar o seu problema devido ao contexto social e cultural em que estão inseridos, o que torna difícil a determinação precisa da prevalência desta patologia (Agarwal *et al.*, 2006).

A DE partilha fatores de risco comuns com as doenças cardiovasculares (DCV), sendo que vários estudos clínicos têm mostrado que a DE prediz a presença e a extensão de aterosclerose. A implementação de bons hábitos, que passam pela modificação dos estilos de vida – evitar o álcool e o tabaco, promover a atividade física regular – e pelo controlo adequado da pressão arterial, da *diabetes mellitus* e de dislipidémias diminui, à partida, a propensão para desenvolver DE (Perdigão *et al.*, 2008). A DE é, na realidade, um sintoma e não uma doença, pelo que muitos homens que não são devidamente avaliados ou que não recebem tratamento de outra condição patológica que possuam, podem desenvolver DE (Hatzimouratidis *et al.*, 2010). Dada a alta frequência desta patologia, o estabelecimento de correlações genéticas e bioquímicas e/ou marcadores é de elevado interesse, não só para o tratamento preciso destes pacientes e prevenção de consequências psicológicas, como também pelo potencial que representam na identificação de DCV e de outras situações patológicas que frequentemente acompanham esta patologia.

Existe uma variedade de fatores de risco cardiovasculares que têm sido associados ao aparecimento e aumento da incidência de DE, onde se incluem biomarcadores de função endotelial, trombose e dislipidémia. Estes fatores são responsáveis por uma parte considerável do aumento global do risco cardiometabólico em pacientes com DE, pelo que a sua monitorização deve ser implementada (Perdigão *et al.*, 2008).

Relativamente ao papel de polimorfismos genéticos na fisiopatologia da DE, as evidências têm sido controversas. Embora alguns marcadores genéticos tenham sido consistentemente associados à DE, outros estudos falharam em demonstrar associações significativas, o que pode ser devido a falhas na padronização das metodologias e no registo de pacientes. (Lippi *et al.*, 2012).

1.1.1. Anatomia do pénis e mecanismo fisiológico da ereção

O pénis é constituído por três cilindros de tecido vascular erétil: o corpo esponjoso, onde se encontra a uretra e dois corpos cavernosos (figura 1).

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

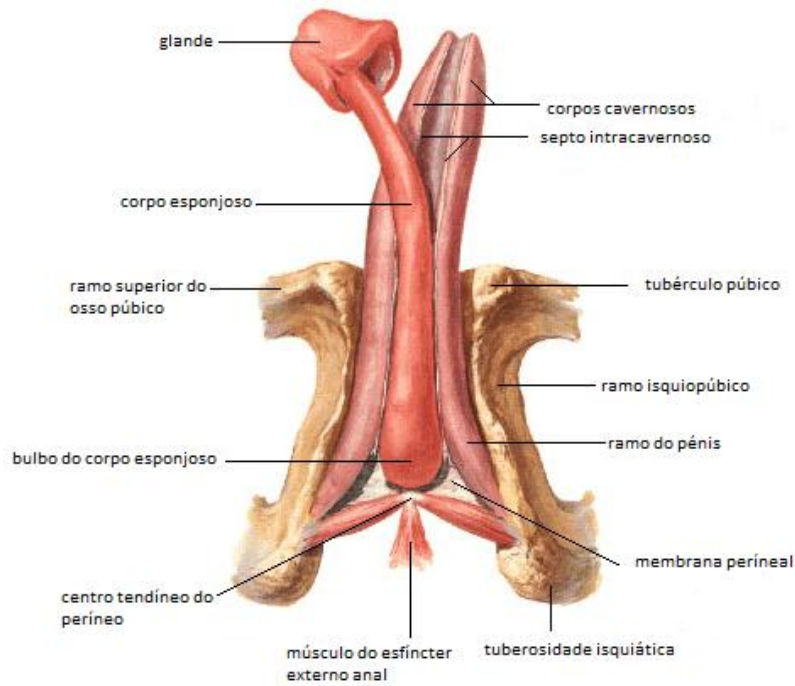


Figura 1 – Estrutura do pênis (adaptado de Netter, 2006)

O corpo esponjoso não contribui para a rigidez e forma o bulbo do pênis, terminando na glande. Os corpos cavernosos consistem em dois compartimentos cilíndricos envolvidos numa túnica sólida (túnica albugínea) contêm tecido vascular que expande durante o estímulo sexual. Estas são as estruturas penianas responsáveis pelo mecanismo erétil. O pênis possui um empacotamento neurovascular que contém os nervos sensoriais e as artérias dorsais, que contribuem com o afluxo de sangue para a glande (figura 2).

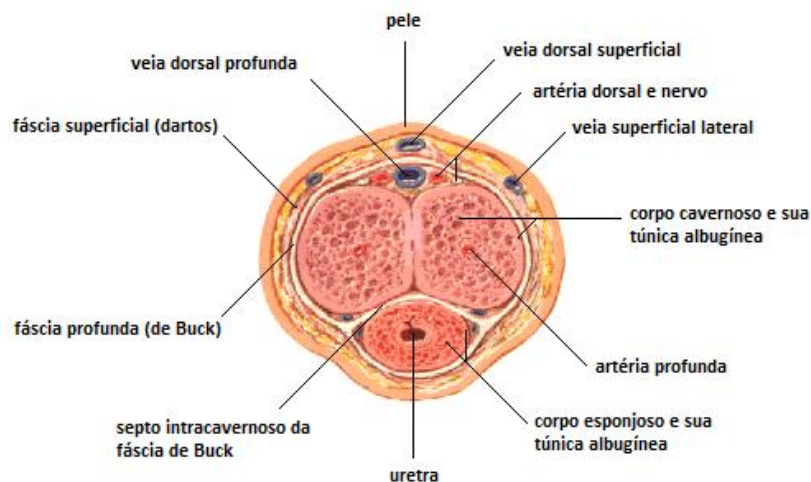


Figura 2 – Corte transversal do pênis (adaptado de Netter, 2006)

As artérias ilíacas fornecem o suprimento sanguíneo necessário e a vascularização converge formando as artérias penianas comuns que emergem no períneo (Levine, 2000).

Com a excitação sexual, o aumento do fluxo sanguíneo ao pênis, assim como a diminuição da drenagem venosa, expandem os corpos cavernosos. Este fenômeno envolve dilatação arterial, relaxamento do músculo liso trabecular e ativação do mecanismo veno-oclusivo corporeal (Hatzimouratidis *et al.*, 2010). Desta forma, o pênis adquire uma estrutura firme que permite a penetração.

A função sexual masculina depende de vários fatores como níveis normais de testosterona, fluxo sanguíneo arterial adequado e inervação neural intacta das vias α -adrenérgicas e colinérgicas. A ereção, por ingurgitamento venoso dos corpos cavernosos, resulta em dois tipos de estímulos. Os estímulos visuais, auditivos ou fantasias eróticas levam a um fluxo simpático do Sistema Nervoso Central (SNC) para centros medulares toracolombares - entre o segmento torácico 11 (T11) e o segmento lombar (L2) e os estímulos do tato iniciam impulsos sensoriais a partir da genitália que originam o arco reflexo com sinapse medular ao nível sacral (entre S2 e S4), seguindo vias parassimpáticas através do nervo pudendo. Estes dois tipos de estímulos originam dois tipos de ereção - a psicogénica e a reflexogénica, respetivamente (Bickley *et al.*, 2007).

O NO é produzido enzimaticamente a partir da L-arginina, através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Herce-Pagliai *et al.*, 1998). Alguns neurotransmissores, como a acetilcolina, são libertados pelos terminais nervosos cavernosos e estimulam a enzima NO sintase neuronal (nNOS), que leva ao aumento de libertação de óxido nítrico (NO) do endotélio. A função erétil é mediada tanto por nNOS como por NO sintase endotelial (eNOS) (Burnett *et al.*, 1995). Outros estudos indicam a NO sintase induzida (iNOS) como tendo também um papel interveniente na ereção (Ferrini *et al.*, 2010). O neurotransmissor é libertado pelos terminais dos nervos autónomos e difunde para o músculo liso vascular. No músculo liso, o NO ativa a guanilciclase e aumenta a concentração de guanosina monofosfato cíclica (cGMP). O cGMP ativa proteínas cinase intracelulares que fosforilam recetores proteicos. As proteínas cinases ativadas levam à abertura dos canais de potássio, aumentando o seu efluxo (Seftel *et al.*, 1996) e bloqueiam o influxo de cálcio, inibindo os seus canais. Este processo leva à hiperpolarização e relaxamento do músculo liso, havendo um aumento do influxo sanguíneo. A diminuição da resistência arteriolar leva a que os espaços sinusoidais fiquem repletos de sangue, o que leva a um aumento da pressão dentro

dos corpos cavernosos. Concomitantemente, o retorno venoso peniano é bloqueado, produzindo uma ereção rígida. A enzima responsável para a degradação de cGMP e, conseqüentemente, diminuição do relaxamento muscular e reversão da ereção, é a fosfodiesterase-5 (PDE-5), que converte a cGMP em 5-GMP (Lee, 2011).

A DE ocorre quando as artérias não dilatam o suficiente e os corpos cavernosos não enchem de sangue, pelo que a introdução dos inibidores da PDE-5 -sildenafil, vardenafil e tadalafil - na terapêutica foi um passo importante no tratamento desta patologia. Estes fármacos parecem aumentar o efeito local de NO diminuindo a destruição do cGMP (Lee, 2011). Existe também a possibilidade de tratamento através de um fármaco designado alprostadil (prostaglandina E1) que é injetado por via intracavernosa. O princípio deste tratamento é mimetizar o mecanismo endógeno fisiológico da vasodilatação, através da injeção desta droga vasoativa. O efeito farmacológico do alprostadil no tratamento da DE é mediado pela inibição da atividade α 1-adrenérgica no tecido peniano e pelo seu efeito de relaxamento da musculatura lisa cavernosa, resultando num aumento do fluxo sanguíneo, aumentando-se, desta forma, a pressão intracorporal no pênis (Levine, 2000).

Por razões óbvias, o tratamento de primeira linha é o oral. A ausência de resposta positiva à terapêutica pode ser causada pela diminuição de concentração de NO devido à disfunção endotelial. O mecanismo preciso ainda não é claro, sendo que a produção diminuída de NO ou a sua ausência parecem ser os fatores mais relevantes (Safarinejad, 2004; Lee, 2011).

1.1.2. *Diabetes mellitus* e disfunção erétil

A *diabetes mellitus* é associada comumente com obesidade, hipertensão arterial (HTA) e dislipidémias. Todas estas patologias contribuem para o desenvolvimento de DCV e estão associadas com disfunção endotelial. O termo *síndrome metabólico* é usado para definir a associação generalizada destas patologias num determinado grupo de indivíduos. O *síndrome metabólico* é frequentemente associado com a resistência à insulina e a DCV (Fonseca & Jawa, 2005).

A função endotelial é mediada, em grande parte, pelo NO e este sistema vasodilatador é igualmente responsável pelos mecanismos de dilatação venosa e arterial, necessários para conseguir e manter a ereção. A DE e a doença vascular partilham fatores de risco, etiologia e evolução clínica, sendo a disfunção endotelial o denominador comum. A disfunção endotelial pode ser um evento iniciador na patogénese da aterosclerose e foi observada em

indivíduos com diabetes e com diminuição da tolerância à glucose (Perdigão *et al.*, 2008). Vários especialistas em biologia molecular, fisiologia, farmacologia, e evidências derivadas de ensaios clínicos, epidemiologia e cirurgia urológica sublinham este mesmo conhecimento (Chitale *et al.*, 2009; Thorve *et al.*, 2011).

A DE, sendo dotada de uma fisiopatologia multifatorial - envolvendo disfunção endotelial, complicações específicas de diabetes e fatores cavernosos, psicológicos, hormonais, neurológicos e vasculares - pode ser agravada/atenuada com a alteração de um ou mais destes fatores. A identificação dos papéis dos vários mediadores intervenientes, bem como as suas interações na função erétil normal, constitui o maior desenvolvimento neste tipo de estudos. Investigações recentes mostram que a DE consegue prever eventos cardiovasculares futuros, não só em pacientes com diabetes, mas também em indivíduos não diabéticos (Agarwal *et al.*, 2006; Phé *et al.*, 2012; Wang, 2011).

Encontram-se várias lacunas quando se pretende a integração dos dados moleculares e celulares com intuito de encontrar uma terapêutica adequada (Chitale *et al.*, 2009). Felizmente, a maioria dos homens com DE, pode ser tratada com inibidores da PDE-5, o que leva a um aumento dos efeitos vasodilatadores do NO (Trussell & Legro, 2007). No entanto, homens com *diabetes mellitus* tendem a responder menos positivamente a estes agentes, pelo menos nas doses terapêuticas normalmente utilizadas. Esta diminuição de resposta pode estar relacionada com a severidade da disfunção endotelial em pacientes com diabetes (Safarinejad, 2004). Há que se implementar novas estratégias terapêuticas para resolver este problema. É sabido que melhorar o controlo glicémico diminui o número de casos e a gravidade da DE ou torna o tratamento com os agentes atuais mais eficaz (Fonseca & Jawa, 2005).

Outros mecanismos específicos que relacionam a DE com a diabetes incluem, por exemplo: a idade e a hiperglicemia, levando à glicosilação das fibras elásticas e a falhas no relaxamento do corpo cavernoso (Jiaan *et al.*, 1995); o tratamento com múltiplas drogas associadas à DE (Levine, 2000); a neuropatia periférica (Valles-Antuña *et al.*, 2011) e a redução da produção da NOS (Vernet *et al.*, 1995), reduzindo os níveis da libertação de NO para o músculo liso cavernoso. Estes mecanismos permitem colocar a hipótese de que a duração e a severidade de DE estão intimamente relacionadas com o controlo glicémico (Fonseca & Jawa, 2005).

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Em experiências com animais, verificou-se que a hemoglobina glicosilada (HbA1c) interfere significativamente no relaxamento do corpo cavernoso *in vitro*, mediado pelo NO endotelial. Isto é devido parcialmente à geração dos aniões superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e à inativação extracelular do NO (Cartledge *et al.*, 2000). De facto, um estudo recente revelou uma incidência superior de DE em homens com níveis aumentados de HbA1c (Wessells *et al.*, 2011).

A importância da disfunção endotelial também tem sido reconhecida, incluindo o papel da insulina e da resistência à insulina na modulação das ações do endotélio (Calles-Escandon & Cipolla, 2001). A resistência à insulina afeta um elevado número de doentes diabéticos e a DE está associada a estes estados de resistência, podendo causar distúrbios nas vias de sinalização subcelulares requeridas para a produção de NO. Os estadios de resistência à insulina são caracterizados por uma produção vascular de NO deficiente e uma diminuição da vasodilatação (Trussell & Legro, 2007).

A DE e a disfunção endotelial podem ter vias fisiopatológicas comuns (figura 3), devido a um defeito na atividade de NO, que pode ser inibida com a idade, doença e problemas comportamentais. A ligação entre disfunção erétil/endotelial e diabetes tipo 2 é, portanto, indissociável (De Angelis *et al.*, 2001).

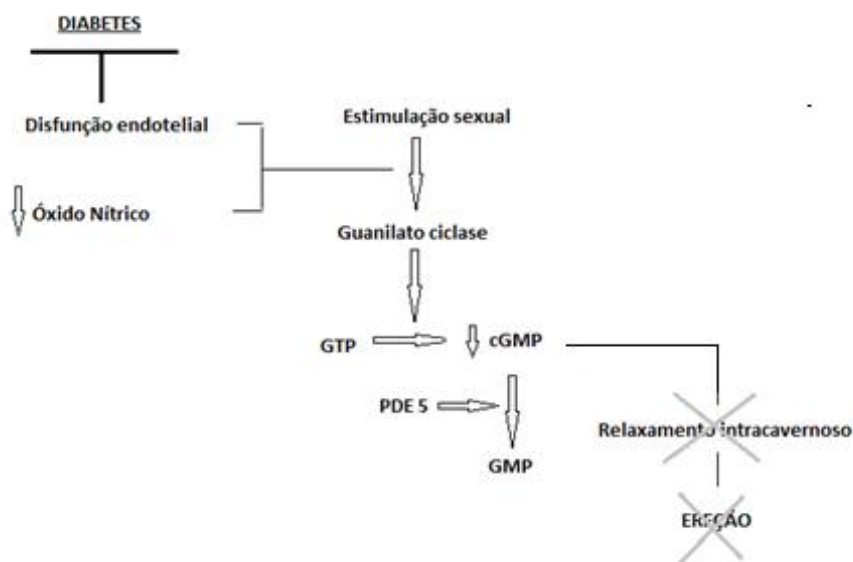


Figura 3 – Influência da diabetes na disfunção erétil (Adaptado de Perdigão *et al.*, 2008): GTP- guanósina trifosfato; cGMP – guanósina monofosfato cíclica; PDE 5 – fosfodiesterase 5; GMP – guanósina monofosfato.

1.2. Stress Oxidativo

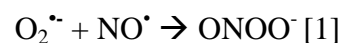
O stress oxidativo ocorre quando as células estão expostas a níveis excessivos de espécies reativas de oxigénio (ROS) como resultado de um desequilíbrio entre pró-oxidantes e mecanismos protetores, conferidos por antioxidantes. As ROS são formadas durante o metabolismo regular, devido à redução univalente da molécula de oxigénio (Agarwal *et al.*, 2006).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é a ROS mais importante. O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), e o peroxinitrito ($ONOO^-$) são outros radicais livres implicados no mecanismo fisiopatológico da doença vascular. O endotélio vascular, as plaquetas e os leucócitos são a maior fonte destes radicais livres (Pacher *et al.*, 2007).

Os radicais superóxido são gerados quando ocorre redução incompleta do oxigénio no sistema de transporte de eletrões. Enzimas de membrana, tais como NADH-NADPH oxidase, são a maior fonte de radicais superóxido em células fagocíticas ativadas. Este aumento é, muitas vezes, associado com um maior risco de doença vascular (Agarwal *et al.*, 2006).

A interação entre o NO e ROS é um dos importantes mecanismos implicados no processo fisiopatológico de DE (Pacher *et al.*, 2007). O NO está ainda implicado na carcinogénese (Bentz *et al.*, 2000), inflamação crónica, infeção (Jaiswal *et al.*, 2000) e neurodegeneração (Olivenza *et al.*, 2000). A observação desta interação entre radicais livres levou à proposição de uma relação etiológica entre stress oxidativo e DE.

O NO, sendo um radical livre muito reativo, intervém em reações não enzimáticas com a região heme da oxihemoglobina ou reage com outros radicais livres, tais como o anião superóxido, para formar peroxinitrito [1] (Beckman & Koppenol, 1996):



O peroxinitrito é um oxidante potente que pode modificar resíduos de tirosina de certas proteínas para formar 3-nitrotirosina (3-NT) (MacMillan-Crow *et al.*, 1996). A medição de 3-NT, como um potencial biomarcador de danos mediados por NO tem sido foco de atenção particular (Zhang *et al.*, 2007). Da mesma forma, tem havido uma atenção crescente para a medição do rácio glutatona reduzida (GSH) /oxidada (GSSG) pelo seu

potencial como biomarcador de stress oxidativo (Komatsu & Obata, 2003; Zhang *et al.*, 2005).

1.2.1. Nitrotirosina

As modificações pós-translacionais de proteínas desempenham papéis chave na regulação de processos biológicos e levam a várias respostas fisiológicas. Nos últimos anos muitas tecnologias analíticas foram desenvolvidas para ajudar a entender a relevância e diversidade destas modificações na doença. As principais áreas de foco destes estudos incluem a fosforilação e reações envolvendo stress oxidativo, nomeadamente as que envolvem a química redox das cisteínas. A nitração de biomoléculas, por sua vez, é uma área de investigação menos estudada, mas apresenta grandes potencialidades (Jones, 2012).

Vários estados de doença podem gerar ROS que, por sua vez, podem produzir biomoléculas nitradas. O maior conhecimento sobre estas espécies permite avaliar as potenciais implicações nos processos biológicos e/ou de doença (Jones, 2012).

A nitração das tirosinas proteicas é uma modificação covalente que resulta da adição de um grupo nitro (-NO₂) a um dos *o*-carbonos equivalentes (adjacente do grupo hidroxilo) do anel aromático dos resíduos de tirosina. A tirosina reage com o peroxinitrito para produzir a 3-NT (figura 4) (Gow *et al.*, 2004; Pacher *et al.*, 2007). Este processo afeta a função e a estrutura proteicas, resultando na geração de epítomos antigénicos e alterações na atividade catalítica das enzimas. A organização do citoesqueleto celular também é alterada e ocorrem disfunções na transdução de sinal (Schopfer *et al.*, 2003).

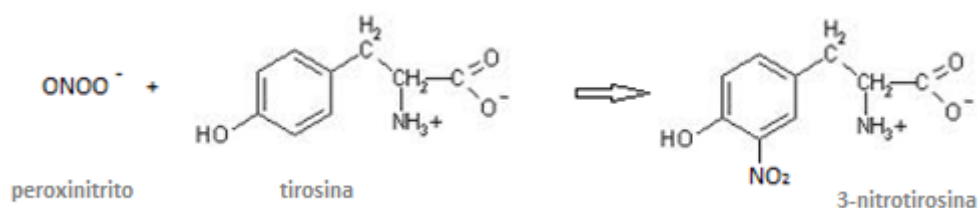


Figura 4 – Formação de 3-nitrotirosina a partir de peroxinitrito e tirosina

A nitração de biomoléculas desempenha, portanto, um papel importante tanto nos sistemas biológicos, como nas doenças. Esta nitração pode ocorrer tanto a nível proteico, como já

foi referido, como a nível do DNA (Murata & Kawanishi, 2004), lípidos (Evans *et al.*, 1996) e outras biomoléculas. As proteínas associadas a 3-NT são já um marcador característico de stress oxidativo e, comumente, da inflamação (Murata & Kawanishi, 2004).

O dano induzido pela formação de 3-NT tem sido relacionado com várias patologias, sendo uma das principais a diabetes (Horváth *et al.*, 2009). Tem-se abordado a relação entre a 3-NT e a doença vascular (Evans *et al.*, 1996), doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) (Jin *et al.*, 2011), artrite reumatóide (Khan *et al.*, 2012) e doenças neurodegenerativas (Shi *et al.*, 2012). A concentração de 3-NT e o rácio 3-NT/tirosina estão aumentados significativamente em várias patologias ao nível do fluido cérebroespinal e tal facto pode estar relacionado com a diminuição das funções cognitivas (Tohgi *et al.*, 1999; Isobe *et al.*, 2009; Liu & He, 2010). Recentemente a 3-NT tem sido apontada como um biomarcador da DE (Kimura *et al.*, 2012).

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a determinação desta molécula. Os métodos imunohistoquímicos, através de anticorpos, têm sido uma abordagem constante (Viera *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2011), bem como os métodos baseados em cromatografia gasosa (GC) ou líquida (LC), acoplados a espectrometria de massa (MS), como por exemplo GC-MS, GC-MS-MS, LC-MS e LC-MS-MS (Duncan, 2003).

Os métodos cromatográficos de HPLC (cromatografia líquida de alta performance) têm-se, também, revelado eficientes para determinação de 3-NT com deteção DAD (*diode array detector*) (Evans *et al.*, 1996) ou ECD (*electrochemical detector*) (Murata & Kawanishi, 2004). Os processos de derivatização têm sido utilizados quando se trata de análise por GC-MS, HPLC-ECD e LC-MS-MS, o que leva a uma análise complexa, repleta de passos que tentem minimizar os níveis de artefatos que possam surgir.

De acordo com Kamisaki *et al.*, os níveis de 3-NT no plasma humano não ultrapassam os 31 nmol/L em situações de ausência de patologias (Kamisaki *et al.*, 1996).

Nesta investigação, um método de HPLC bastante prático foi desenvolvido e otimizado, onde moléculas de 3-NT presentes em plasma e sangue humano foram diretamente analisadas sem requerer derivatização, o que proporciona a determinação, em pouco tempo, da molécula estudada. A sensibilidade e o intervalo de aplicação do método mostraram-se adequados à análise destas amostras.

1.2.2. Rácio GSH/GSSG

A glutathiona ou γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina é um tripéptido que possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o stress oxidativo (figura 5). Esta molécula é encontrada intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos. Nota-se a ligação γ -peptídica pouco comum, a presença da porção γ -glutamil e do grupo α -carboxilato livre, prevenindo a hidrólise da GSH pelas peptidases celulares, que degradam outros peptídeos pequenos. Dentro da célula, a GSH é o tiol mais abundante de baixa massa molecular. A sua concentração intracelular varia entre 1 e 10mM, sendo que a forma reduzida predomina em relação à forma oxidada. De acordo com a revisão efetuada por Monostori *et al.*, a nível fisiológico o rácio GSH/GSSG pode atingir valores de 100 a 1000 (Monostori *et al.*, 2009), enquanto em vários modelos de stress oxidativo o rácio celular varia entre 1 e 10 (Pastore *et al.*, 2003). No sangue, a sua concentração varia, normalmente, entre 0,1-2mM, sendo que muitas vezes é apresentada em $\mu\text{mol/g}$ Hemoglobina (Monostori *et al.*, 2009; Giustarini *et al.*, 2011). O rácio GSH/GSSG plasmático está situado entre 1 e 10 (Simplicio *et al.*, 2003).

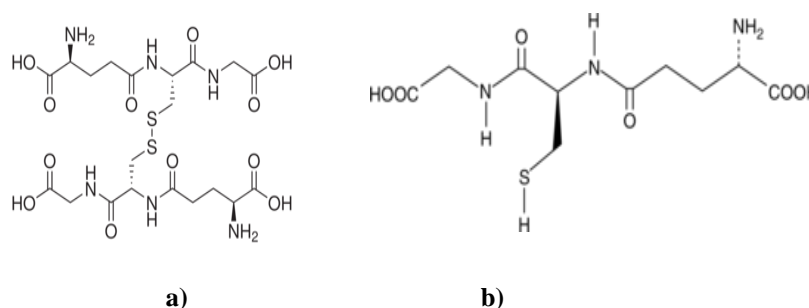


Figura 5 – Glutathiona na sua forma a) oxidada e b) reduzida

Muitas das reações da GSH envolvem o grupo tiol (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutathiona um bom redutor. A combinação da sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo tiol suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

ROS e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo, quanto no ambiente em que este vive (Monostori *et al.*, 2009).

A GSH aparece como uma molécula chave no estudo do metabolismo de xenobióticos, uma vez que pode reagir diretamente com espécies radicalares ($\cdot\text{OH}$, $\text{RO}\cdot$ etc.), impedindo reações de propagação. É imprescindível em processos de biotransformação/metabolismo de poluentes, conjugando uma variedade de metabolitos eletrofílicos através da conjugação com a glutathiona-S-transferase (GST) (figura 6). A GST pertence a um grupo de enzimas detoxificantes que defende a célula contra agressões tóxicas de origem química, metabolitos e produtos decorrentes do stress oxidativo. Além disso, participa na detoxificação de peróxidos juntamente com a glutathiona peroxidase (GP) (Gutowicz *et al.*, 2011; Hellou *et al.*, 2012).

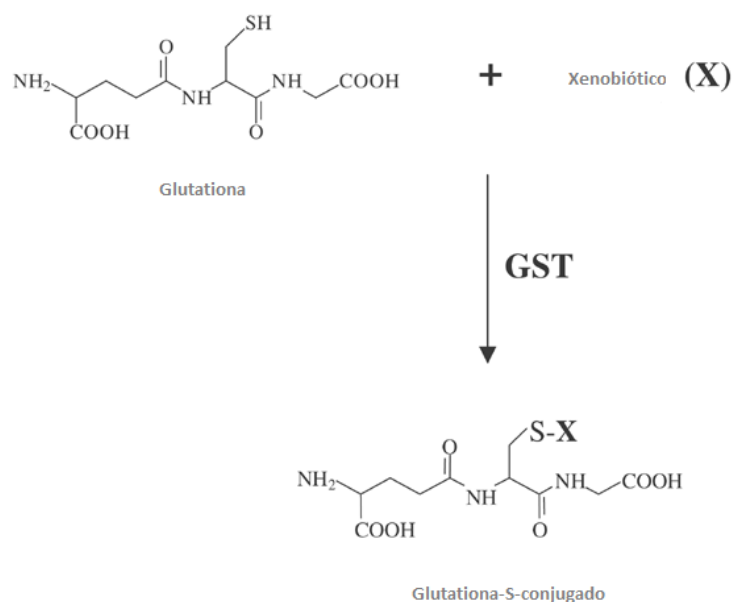


Figura 6 – Conjugação da glutathiona com um xenobiótico (X) (Adaptado de Townsend and Tew, 2003):

GST – glutathiona-s-transferase

Níveis alterados de GSH no plasma têm sido implicados num elevado número de condições patológicas, incluindo Alzheimer (Winyard *et al.*, 2005; Mandal *et al.*, 2012), Parkinson (Mosley *et al.*, 2006), diabetes (De Young *et al.*, 2004), HIV (Pocernich *et al.*, 2005), insuficiência renal crónica (Rogers *et al.*, 2006) e distúrbios malignos (Backos *et al.*, 2012).

Durante o stress oxidativo, ocorre depleção da glutatona na sua forma reduzida, GSH, ao mesmo tempo que ocorre o aumento do seu produto de oxidação, a glutatona dissulfureto (GSSG) (Ercal *et al.*, 2001). Apesar de sua concentração aumentar, a GSSG é rapidamente reconvertida a GSH pela ação da enzima glutatona redutase (GR). A GR é uma flavoenzima de estrutura conhecida que catalisa a redução dependente de NADPH de glutatona oxidada envolvendo os 2 locais ativos de resíduos de cisteína (figura 7) (Hellou *et al.*, 2012).

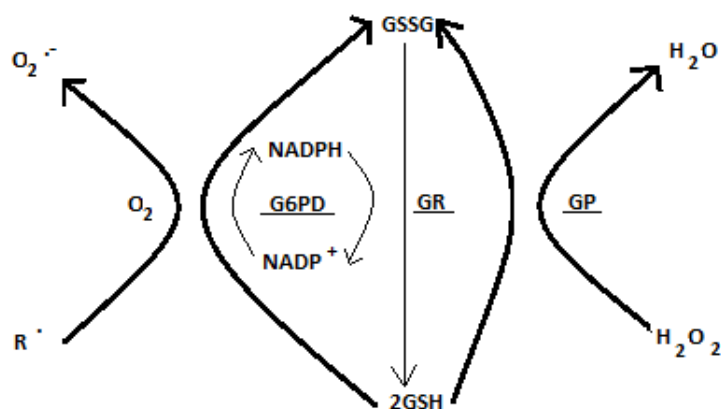


Figura 7 – Mecanismos antioxidantes envolvendo a glutatona reduzida (GSH): Redução do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) a água (H_2O) e captura de radicais livres tais como o radical hidroxilo (HO^\bullet). Um aumento na H_2O_2 , a presença de outras espécies reativas ou a interferência com o ciclo redox de GSH podem resultar num aumento da glutatona oxidada (GSSG). G6PD – glutatona-6-fosfato desidrogenase; NADPH/NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; GR – glutatona redutase; GP – glutatona peroxidase.

É usual a determinação de ambos os níveis e reportar o rácio de GSH/GSSG nas pesquisas relacionadas a radicais livres. Alterações no rácio GSH/GSSG são considerados índices de dano oxidativo, sendo que este rácio é considerado um marcador bioquímico imprescindível em células sob exposição de agentes tóxicos (Monostori *et al.*, 2009; Angeli *et al.*, 2010).

Sabendo-se que o stress oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento de DE e diabetes (Jialal *et al.*, 2012), foram desenvolvidos métodos de determinação de biomarcadores que pudessem permitir a sua relação com as referidas doenças.

Passou a haver necessidade de desenvolver métodos analíticos que pudessem determinar as formas da glutatona presentes em amostras biológicas. Alguns métodos analíticos usam LC combinada com diferentes técnicas de detecção para a análise de GSH e GSSG. Estes métodos são, geralmente, baseados na derivatização através de sondas contendo o grupo reduzido –SH (tiol) da GSH e da GSSG depois de redução química (Monostori *et al.*, 2009). A glutatona pode ser detetada por vários métodos tais como LC-MS-MS (Huang *et al.*, 2011), LC com detecção eletroquímica (Zhang *et al.*, 2005), HPLC com detecção ultravioleta (UV) (Bald *et al.*, 2004; Kusmierek *et al.*, 2009), cromatografia de fase reversa acoplada a espectrometria (Bramanti *et al.*, 2005) e HPLC com detecção eletroquímica (Yap *et al.*, 2010). As técnicas eletroanalíticas têm demonstrado ser uma abordagem altamente sensível e seletiva para a detecção de numerosos compostos, e desta forma, uma variedade de métodos eletroanalíticos foram desenvolvidos para a detecção das glutatonas (Monostori *et al.*, 2009).

As concentrações de GSH e GSSG são, também, determinadas por métodos enzimáticos em que se emprega o reagente de Ellman – DTNB (ácido ditionitrobenzóico) - que é amplamente usado para a determinação de tióis em amostras biológicas (Rahman *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008). A desvantagem deste método reside no facto de não permitir a determinação direta de GSH, pois esta obtém-se através da subtração de GSSG à quantidade total de glutatona, o que acarreta erros de cálculo.

Por ser possível determinar simultaneamente GSH e GSSG por HPLC, esta será a escolha mais razoável para a quantificação destas biomoléculas. No entanto, para aumentar a sensibilidade destes métodos, é necessária a adição de um agente derivatizante. Muitos procedimentos para HPLC têm sido desenvolvidos para análise de derivatizantes fluorescentes de aminoácidos. Destes, a derivatização com cloreto de 1-dimetilaminoaftaleno-5-sulfonilo (cloreto de dansilo), através aminoácidos contendo enxofre, tais como as cisteínas, tem sido a mais recorrente (Jones *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002). Existem, também, métodos de derivatização que intervêm no grupo amino, como por exemplo a derivatização com 2,4-dinitrofluorobenzeno (FDNB). A derivatização por este método apresenta a vantagem de avaliar simultaneamente GSH e GSSG numa única corrida (Giustarini *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). A desvantagem destes métodos com derivatização reside no maior dispêndio de tempo para a análise e num gasto considerável de químicos e reagentes na preparação adequada da amostra.

Nesta investigação, um método por HPLC sem derivatização e bastante prático foi desenvolvido e otimizado, onde moléculas de glutatona presentes em sangue humano, tanto reduzidas (GSH) como oxidadas (GSSG) foram diretamente separadas sem requerer qualquer derivatização. O que proporciona a determinação da relação entre as duas formas da glutatona em pouco tempo. A sensibilidade e o intervalo de aplicação do método mostraram-se adequados à análise destas amostras.

1.2.3. Cromatografia

Devido à facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos atuais, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise.

A HPLC baseia-se na cromatografia líquida, que promove a eluição de uma fase móvel líquida sobre uma fase estacionária sólida. Tem uma aplicação muito abrangente e utiliza aparelhos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. Neste tipo de cromatografia são utilizadas pequenas colunas, nas quais a fase móvel líquida elui sobre a fase estacionária que está no seu interior. A fase estacionária é formada por materiais especialmente preparados; emprega-se alta pressão na separação dos componentes da amostra, sendo que a análise da amostra pode ser realizada em apenas alguns minutos (figura 8) (Duncan, 2003).

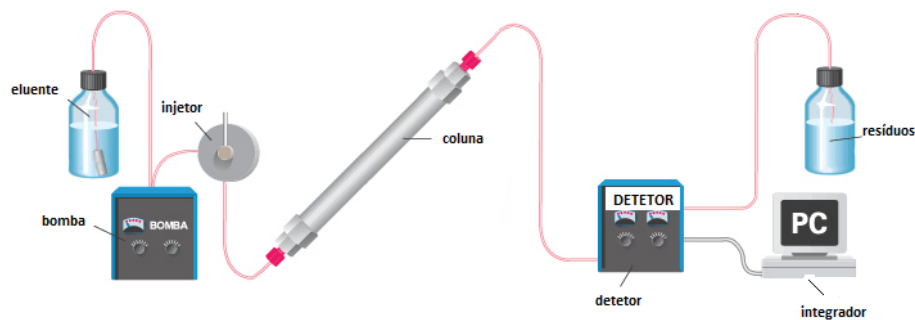


Figura 8 - Componentes genéricos de HPLC: O eluente “empurra” o analito pela coluna com auxílio de uma bomba peristáltica. O resultado da análise é detetado e integrado no sistema.

Existe uma variada gama de fases estacionárias para HPLC e as colunas cromatográficas são classificadas, normalmente, de acordo com a polaridade do seu enchimento. As colunas de fase normal consistem numa fase estacionária polar, geralmente, com empacotamento de sílica. Este tipo de coluna tem maior utilização na análise de

compostos. As colunas de fase reversa são pouco polares e constituídas por hidrocarbonetos, por uma película em monocamada de moléculas orgânicas ou por grupos funcionais, quimicamente ligados à sílica (por exemplo: n-octil, n-octadecil, amino-, ciano-, etc.). Este tipo de coluna é, normalmente, usado para análise de compostos orgânicos. Assim sendo, utilizando uma coluna de fase normal os componentes menos polares serão os primeiros a eluir. Numa cromatografia de fase reversa os componentes mais polares eluirão mais facilmente que os apolares (Neto & Nunes, 2003).

As fases móveis podem ser puras ou misturas de dois ou mais eluentes em percentagens constantes (eluição isocrática). Se a mistura de eluentes for com percentagens variáveis ao longo do tempo, o tipo de eluição é em gradiente. Os eluentes utilizados podem ser apolares ou polares e as misturas podem ter graus variáveis de polaridade, conforme o(s) analito(s) a separar.

Os detetores são transdutores, isto é, transformam as moléculas que chegam à câmara de deteção em sinal elétrico. Os detetores em HPLC podem ser de diversos tipos (eletroquímicos, espectrofotométricos, fluorescência, entre outros) dependendo essencialmente das propriedades físico-químicas da amostra a analisar. Recentemente, a deteção por espectrometria de massa (MS) tem sido bastante aplicada (Gouvea *et al.*, 2012). No entanto, maior parte das deteções é feita recorrendo a detetores UV-Vis, de díodos (DAD) ou de fluorescência (FL) (Duncan, 2003). Na escolha de um detetor para um sistema cromatográfico de alta eficiência não se deve menosprezar o reduzido volume de fase móvel que elui da coluna, logo a sensibilidade do detetor determina, em grande parte, o sucesso da deteção e, conseqüentemente, da separação e quantificação cromatográficas (Neto & Nunes, 2003).

O emprego da técnica de HPLC é transversal tanto a ramos do conhecimento científico, como em variadas aplicações industriais. Alguns exemplos mais comuns são a análise de medicamentos (Nebot *et al.*, 2007), havendo grande interesse por antibióticos (Ji *et al.*, 2007) e compostos orgânicos (Argyri *et al.*, 2011). Tem aplicações ao nível de biomarcadores de stress oxidativo, como por exemplo a nível lipídico (Kitano *et al.*, 2006) e proteico (Yang *et al.*, 2010).

A técnica de HPLC - DAD tem uma ampla aplicação na separação, identificação e na quantificação de misturas de compostos com elevada complexidade (Yang *et al.*, 2010).

Existem alguns parâmetros críticos para a discussão dos resultados da análise por HPLC. O limite de detecção (LD) consiste na concentração mais baixa de analito que é possível detetar dentro das condições experimentais praticadas. Valores abaixo do LD não podem ser reportados. O limite de quantificação (LQ) é a quantidade ou concentração mais baixa de analito que pode ser quantificada com a precisão e a exatidão requeridas pelo ensaio (Duncan, 2003).

1.3. Polimorfismos genéticos

Os polimorfismos genéticos correspondem a variações naturais de um gene, sequência de DNA, proteína ou cromossoma que não traduzem defeitos adversos para o indivíduo e que ocorre geralmente numa frequência superior a 1% na população geral.

Vários estudos tentam identificar preditores genéticos da DE, sendo que na maioria das investigações procuraram-se polimorfismos genéticos de genes relacionados com vias conhecidas e associadas com a ereção. Atualmente, existem poucos genes humanos com estudos de associação com a DE e, como os estudos focalizam-se no gene candidato, a avaliação destes polimorfismos é fundamental para compreender em que nível pode afetar a ausência/presença de determinada patologia (Lopushnyan & Chitaley, 2012).

1.3.1. Polimorfismos da GST: GSTM1 e GSTT1

A glutationa-S-transferase (GST) possui diferentes isoenzimas. De entre os genes que codificam diferentes isoenzimas da GST – incluem a GSTM1, GSTT1 e GSTP. Estes genes são considerados os portadores da maioria dos polimorfismos funcionais existentes na população geral. Estudos recentes sugeriram que variações no GSTM1 e GSTT1 alteram a suscetibilidade à *diabetes mellitus*. Faltam, contudo, estudos para demonstrar a sua relação com a disfunção erétil (Hossaini *et al.*, 2008; Amer *et al.*, 2011).

Os genes GSTM1 (no cromossoma 1p13.p) e GSTT1 (no cromossoma 22q1.2) codificam as enzimas citosólicas GST-mu e GST-theta respetivamente. As variantes polimórficas de deleção nestes genes produzem, tanto uma proteína funcional (quando heterozigóticos para a deleção: GSTM1-1 e GSTT1-1), como uma proteína não funcional (quando são homozigóticos para a deleção: GSTM1-0 e GSTT1-0). Muitos estudos centram-se nestas últimas variantes alélicas, visto estarem relacionadas com o aumento do dano causado pelo stress oxidativo (Strange *et al.*, 2001).

1.3.2. Polimorfismos da Enzima conversora da angiotensina: I/D

A enzima conversora da angiotensina (ECA), componente-chave do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), é responsável pela conversão da angiotensina I (ang I) na sua forma ativa angiotensina II (ang II); atua tanto localmente como sistemicamente de modo autócrino e parácrino para manter a homeostase cardiovascular (Kennon & Connel, 2000). Altos níveis de angiotensina II estão relacionados com o nível aumentado de stress oxidativo (Bernardi *et al.*, 2000).

A ECA é uma proteína codificada pelo gene DCP1. Este gene encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 17 (17q23) sendo constituído por 26 exões e 25 intrões. O gene DCP1 é altamente polimórfico, no entanto, a grande maioria está localizada em regiões não-codificantes. De entre estes, o polimorfismo que está melhor descrito é o de Inserção/Deleção (I/D). Este é caracterizado pela presença (I) ou ausência (D) de uma sequência Alu com 287bp no intrão 16 do gene DCP1 (Kennon & Connel, 2000). Este polimorfismo está associado aos níveis de ECA no sangue; indivíduos homocigóticos para o alelo D são caracterizados por elevados níveis de ECA no sangue, quando comparados com indivíduos homocigóticos para o alelo I, sendo que aumentam os níveis de pressão arterial (Rigat *et al.*, 1990).

Estudos relacionam a presença destes polimorfismos em indivíduos com grau de DE mais acentuado em doentes com *síndrome metabólico* (Gamidov *et al.*, 2011).

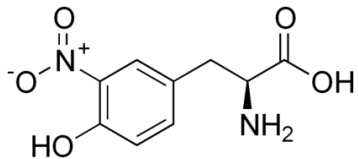
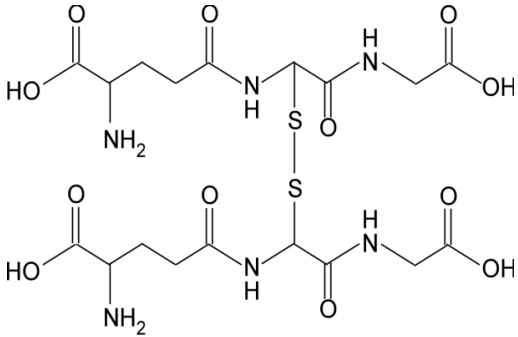
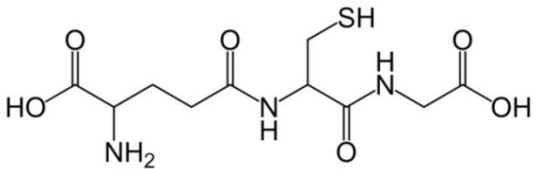
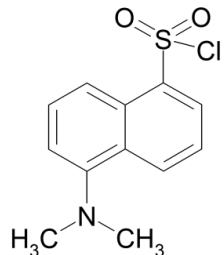
Capítulo II:
Material e Métodos

2. Material e métodos

2.1. Reagentes e químicos

Para este estudo os reagentes usados foram nitrotirosina, glutaciona (oxidada e reduzida) e cloreto de dansilo fornecidos pela Santa Cruz Biotechnology Inc[®].

Tabela 1 - Fórmulas das substâncias utilizadas

Nome dos reagentes	CAS ^(a)	Fórmula estrutural
3-nitro-L-tirosina (3-NT)	621-44-3	
glutaciona oxidada (GSSG)	27025-41-8	
glutaciona reduzida (GSH)	70-18-8	
cloreto de dansilo (DC)	605-65-2	

^(a)CAS - Chemical Abstracts Service

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Todas as substâncias padrão foram guardadas segundo indicação do fabricante até ao momento da sua utilização, tendo-se armazenado GSH, GSSG e 3-NT a 4°C.

O cloreto de dansilo (DC) foi também armazenado a 4°C. Usou-se metanol (MeOH) HPLC Grade, ácido trifluoroacético (TFA), ácido ortofosfórico (H_3PO_4), amoníaco (NH_3), clorofórmio (CCl_4), ácido acético (CH_3COOH), acetato de sódio ($NaCH_3COO$), hidróxido de potássio (KOH), tetrahidroborato ($K_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$), ácido acético glacial (CH_3COOH), acetato de sódio trihidratado ($NaCH_3COOH \cdot 3H_2O$) e acetona fornecidos por MERCK®.

A água ultrapura usada neste estudo provém de um sistema de purificação de água TKA® GenPure.

2.1.1. Preparação das soluções de trabalho

2.1.1.1. Nitrotirosina

Foi preparada uma solução de trabalho de 3-NT através da pesagem rigorosa $2,3 \pm 0,1$ mg de 3-NT e dissolvida em 2mL de H_2O ultrapura acidificada com TFA (pH=3,5).

2.1.1.2. Glutaciona

i) Método A

A preparação da solução de trabalho das glutacionas foi feita através da pesagem rigorosa ($2,0 \pm 0,1$ mg) de GSH, ($2,0 \pm 0,1$ mg) de GSSG que foram transferidas para diferentes eppendorfs e dissolvidas em 3,0mL de uma solução de MeOH 80% (v/v).

A solução de cloreto de dansilo foi preparada através da pesagem de $2,0 \pm 0,1$ mg de DC e sua dissolução em 4mL de acetona.

A solução de KOH/tetrahidroborato foi preparada adicionando 5,6g de KOH para um recipiente plástico, contendo 50g de $K_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$ e 100 ml de H_2O . O tampão de acetato foi preparado adicionando 640mL de MeOH, 200mL de solução “stock” de acetato, 125mL de ácido acético glacial e 50mL de H_2O . A solução “stock” de acetato foi preparada adicionando 272g de acetato de sódio trihidratado, 122 mL de H_2O e 378 mL de ácido acético glacial.

ii) Método B

A preparação da solução de trabalho das glutationas foi feita através da pesagem rigorosa ($1,6 \pm 0,1$ mg) de GSH e ($8,5 \pm 0,1$ mg) de GSSG, que foram transferidas para diferentes eppendorfs e dissolvidas em 2mL de H₂O ultrapura com 0,085% de H₃PO₄.

As soluções de trabalho preparadas foram guardadas a 4°C até ao momento da sua utilização, exceto a solução de KOH/tetrahidroborato e a solução tampão de acetato, que foram guardadas no escuro, a temperatura ambiente.

Todos os eluentes foram filtrados e desgaseificados antes da sua utilização no sistema cromatográfico.

2.1.2. Preparação dos padrões

2.1.2.1. Nitrotirosina

Os padrões foram preparados a partir das soluções de trabalho. Para os padrões de 3-NT prepararam-se padrões efetuando as seguintes diluições: 1/10; 1/20; 1/150; 1/100; 1/150 e 1/200.

2.1.2.2. Glutaciona

i) Método A

Após preparação das soluções de trabalho de GSH, GSSG e procedeu-se à sua derivatização com DC (Jones *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002). Para isso recorreu-se à alcalinização dos padrões com a solução de KOH/tetrahidroborato de modo a que o pH da solução fosse 9. O processo de derivatização foi efetuado de seguida, sendo que a solução derivatizante (solução de DC) foi adicionada aos padrões com um tempo de reação de aproximadamente 20 horas, em ambiente escuro e a temperatura ambiente. A extração do excesso de derivatizante foi feita com três vezes clorofórmio (3 x 500 µL) e com 300 µL de NH₃.

Após derivatização efetuaram-se as seguintes diluições: 1/10, 1/20; 1/30 e 1/40 para GSH, 1/50, 1/80, 1/100 e 1/120 GSSG. Para preparação da mistura de GSH+GSSG adicionou-se 350µL do padrão GSH (1/10) a 350µL do padrão GSSG (1/100), num eppendorf.

ii) Método B

Para a preparação dos padrões de glutathiona foram efetuadas as seguintes diluições: 1/10; 1/30; 1/50 e 1/80 para GSH e GSSG, separadamente. Para a preparação dos padrões da mistura GSH+GSSG, adicionou-se 600µL de cada uma das soluções de trabalho, tanto de GSH como de GSSG, num eppendorf. Depois de agitar a mistura preparam-se os padrões de GSH+GSSG procedendo às seguintes diluições: 1/10; 1/30; 1/50 e 1/80.

2.2. Amostras

As amostras de sangue humano (total de 60) foram obtidas de indivíduos com disfunção erétil, sendo que 31 deles eram também diabéticos. O sangue venoso foi colhido por punção antecubital para tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Metade de cada amostra foi congelada a -20°C e a outra metade centrifugada a 5900rcf, durante 10 minutos, para obtenção do plasma sobrenadante que foi separado e congelado a -20°C. Foi recolhida uma porção de amostra sempre que necessária a sua análise.

2.2.1. Preparação das amostras para a análise cromatográfica

Para a análise cromatográfica de amostras foi necessária a precipitação de proteínas, tendo sido usado, para esse efeito, o TFA. Em ambientes ácidos as proteínas são desnaturadas e precipitam. Depois do processamento de alíquotas de amostras com diferentes concentrações (5%, 15% e 30%) de TFA, observou-se que a concentração ótima para a precipitação total de proteínas seria de 15%, sendo que a preparação da solução ácida teria que ocorrer no momento do ensaio, pois uma preparação prévia demonstrou a alteração de resultados.

Após adição de 300µL de TFA a 300µL de amostra, agitou-se a mistura no vórtex durante 20 segundos, e centrifugou-se a 8000rcf durante 10 minutos. Extraíu-se o sobrenadante e procedeu-se a nova centrifugação, nas mesmas condições. Depois da extração do sobrenadante procedeu-se à preparação para injeção no sistema cromatográfico. Separou-se

o sobrenadante, filtrou-se antes de transferir para os vials de 2mL e colocou-se no autosampler do HPLC. Todas as amostras foram filtradas antes da análise.

Os filtros utilizados foram filtros de membrana provenientes da Pall Life Sciences® (GHP Acrodisc 13mm Syringe filter 0,45µm GHP membrane; GHPolypro 47 mm 0,45µm hydrophilic Polypropylene Membrane filters). As fases móveis foram filtradas com um sistema de filtração por vácuo Millipore e desgaseificadas por ultrasonicação.

Efetuuou-se o mesmo procedimento tanto para sangue total como para o plasma. As glutationas foram analisadas em 60 amostras de sangue total, enquanto a nitrotirosina foi determinada em 60 amostras (14 de sangue total e 46 de plasma).

2.3. Métodos

2.3.1. Análise por HPLC

2.3.1.1. Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico utilizado neste estudo foi um equipamento de Hitachi® High-Performance Liquid Chromatograph LaChrom Elite (figura 9), equipado com uma bomba quaternária HTA L-2130, série Lachrom Elite; desgaseificador de solventes por vácuo, em linha, incorporado; autosampler L-2200, série LaChrom Elite e o forno de colunas L-2300, série LaChrom Elite. Foram usados dois detetores: Detetor DAD L-2455, série LaChrom Elite e Detetor de Fluorescência L-2485, série LaChrom Elite.

A recolha e tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados utilizando o Software EZChrom Elite, série Lachrom Elite.

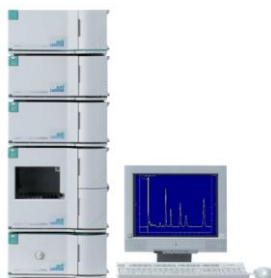


Figura 9 - Hitachi® High-Performance Liquid Chromatograph LaChrom Elite

2.3.1.2. Condições cromatográficas para a pesquisa de 3-NT

Para a 3-NT foi utilizada uma coluna cromatográfica Thermo Scientific® Hypersyl GOLD C18, de dimensões 100x4.6mm, 5µm. A temperatura da coluna foi mantida constante a 35°C. A fase móvel foi constituída por 2 eluentes: metanol e H₂O com TFA (pH=3,5). Procedeu-se a uma eluição em gradiente com fluxo constante a 0,7mL/min. A corrida cromatográfica iniciou-se com 80% de H₂O + TFA (pH=3,5), sendo que foi aumentando a quantidade de metanol até aos 80% em 15 minutos. A fase móvel voltou, gradualmente, às condições iniciais nos 15 minutos seguintes. A coluna foi equilibrada durante 2 minutos entre cada corrida. O volume de injeção para cada ensaio foi de 30µL. O detetor DAD foi programado a 280nm e 357nm. Cada corrida efetuou-se num tempo total de 30 minutos e o tempo de espera entre cada corrida foi de 1 minuto (tabela 2).

Tabela 2 – Método cromatográfico para deteção e quantificação da 3-NT

Tempo (min)	Metanol (%)	H ₂ O + TFA (%)	Fluxo (mL min ⁻¹)
0	20	80	
5	40	60	
10	60	40	
15	80	20	0,7
20	60	40	
25	40	60	
30	20	80	

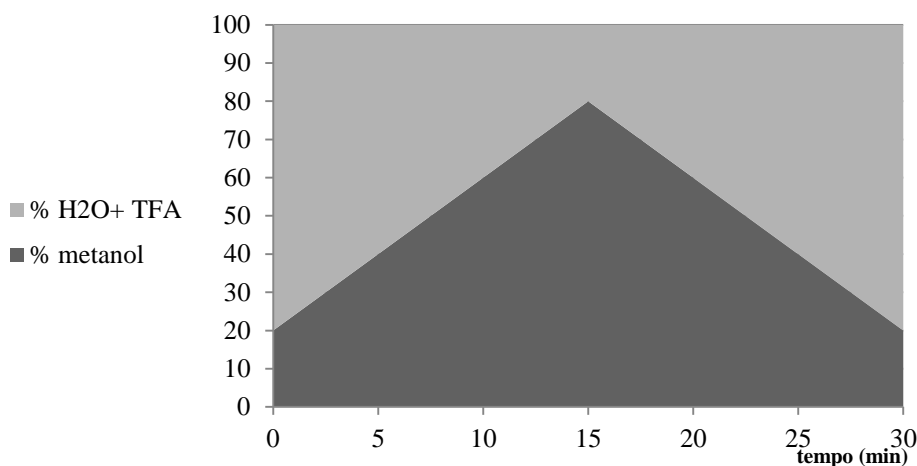


Figura 10 – Evolução do gradiente de eluentes num ensaio para deteção e quantificação de 3-NT

2.3.1.3. Condições cromatográficas para pesquisa das glutatonas

i) Método A

A detecção e análise dos padrões das glutatonas foi realizada numa coluna cromatográfica Purospher® STAR NH₂, de dimensões 250x4,6mm, 5µm. A temperatura da coluna foi mantida constante a 40°C. O volume de injeção correspondeu a 20µL. Os eluentes utilizados foram metanol 80%(v/v) e tampão de acetato com pH=4, com um fluxo em gradiente de 1 mL/min (tabela 3). A detecção foi obtida através de detetor de fluorescência com filtros de absorção a 335nm e de emissão a 515nm.

Tabela 3 – Método cromatográfico para detecção e quantificação de GSH e GSSG

Tempo (min)	% MeOH (80% v/v)	% Tampão Acetato	Fluxo (mL min ⁻¹)
0	80	20	
12	80	20	1
15	20	80	
17	80	20	

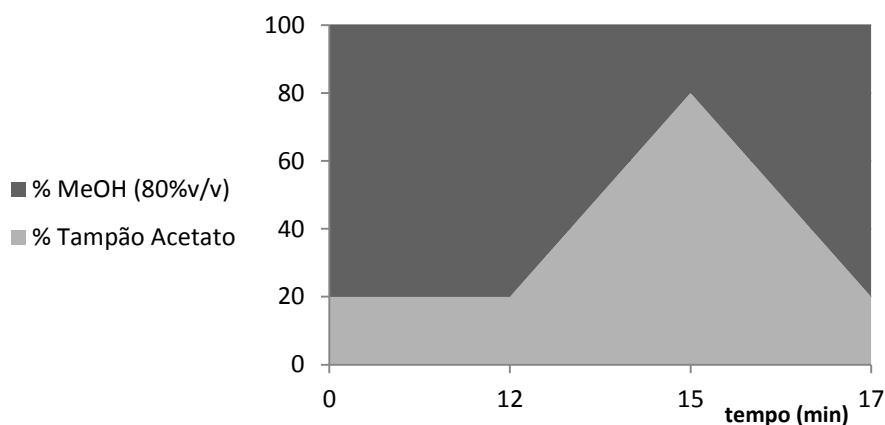


Figura 11 – Evolução do gradiente de eluentes num ensaio para detecção e quantificação de GSH e GSSG (método A)

ii) Método B

A separação das glutatonas foi realizada numa coluna cromatográfica Purospher® STAR NH₂, de dimensões 250x4,6mm, 5µm. A temperatura da coluna foi mantida constante a 40°C. A eluição foi isocrática, sendo a fase móvel constituída por uma solução de H₂O 0,085% H₃PO₄ (pH=4,5), com um fluxo de 1,0 mL/min. Para os padrões e para as amostras o volume de injeção correspondeu a 20µL. O detetor DAD foi programado a 200nm,

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

215nm e 225nm. Cada corrida efetuou-se num tempo total de 15 minutos e o tempo de espera entre cada corrida foi de 1 minuto (tabela 4). Os padrões da GSH e GSSG foram analisados separadamente, numa primeira fase, de forma a determinar o tempo de retenção de cada um, e, posteriormente foram analisados em mistura.

Tabela 4 – Método cromatográfico para deteção e quantificação de GSH e GSSG

Tempo (min)	Fase móvel	Fluxo (mL min ⁻¹)
15	H ₂ O 0,085% H ₃ PO ₄	1

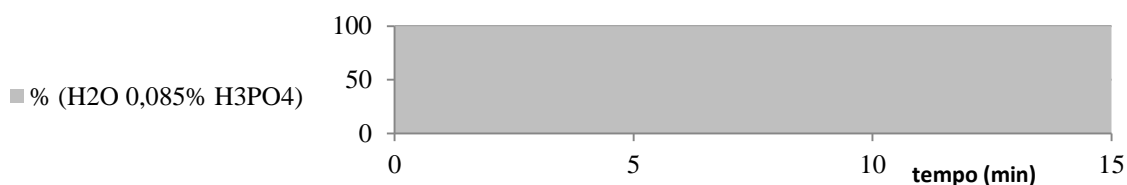


Figura 12 – Evolução do gradiente de eluentes num ensaio para deteção e quantificação de GSH e GSSG (método B)

2.3.1.4. Processamento e análise de dados

Os cromatogramas obtidos foram analisados pelo *software* incorporado no sistema cromatográfico para obtenção dos tempos de retenção e das áreas correspondentes aos picos observados para cada padrão/amostra (figura 13).

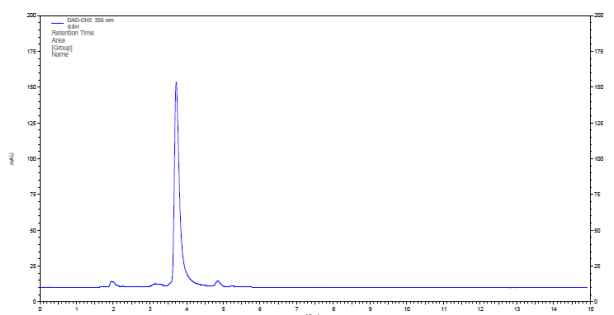


Figura 13 – Cromatograma de padrão de GSH

Através da análise dos picos correspondentes aos padrões corridos, desenhou-se uma reta de calibração, da forma $y=mx+b$, e, deste modo, foi possível determinar a concentração de cada uma das substâncias nas amostras analisadas posteriormente.

2.3.2. Análise por *Polymerase Chain reaction* (PCR)

2.3.2.1. Extração de ADN e amplificação genética por *Polymerase Chain Reaction*

A extração de ADN (ácido desoxirribonucleico) a partir de sangue periférico consiste numa série de etapas, que se baseiam na eliminação do material não passível de ser analisado, até à obtenção do ácido nucleico em questão. Portanto, parte-se do princípio de que devem ser lisados os eritrócitos, os leucócitos, ARN (ácido ribonucleico) e proteínas (adicionando em passos sequenciais, tampão de eritrócitos, tampão de lise celular, solução de proteinase K e RNase livre de DNase), para obtenção do ADN (segundo protocolo descrito por Silva, 2011).

A reação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é uma técnica de amplificação de fragmentos de interesse de ADN, de forma fácil, rápida e muito seletiva. A identificação dos fragmentos amplificados será conseguida por uma análise posterior, por eletroforese, em gel de agarose 1% e revelados por brometo de etídio (EtBr) sob luz ultra-violeta (Arand *et al.*, 1996).

2.3.2.2. PCR para estudo do polimorfismo I/D da ECA

O estudo do polimorfismo I/D será realizado através da amplificação por PCR convencional (de acordo com o método descrito por Silva, 2011).

Neste estudo serão efetuadas duas reações distintas de PCR convencional: na primeira reação serão usados *primers* responsáveis pela amplificação dos alelos I e D. (tabela 5) A segunda reacção usará *primers* específicos para o alelo I para controlo de possível *mistyping* (tabela 6).

Tabela 5 – Reagentes, Condições e tamanho dos fragmentos para reacção I

Reagentes (para $v_{\text{final}} = 25\mu\text{L}$)	Condições PCR	Tamanho dos fragmentos esperados
2 μL ADN		Inserção ~ 490bp Delecção ~ 190bp
1,5mM MgCl ₂		
0,06mM dNTP (FINNZYMES®)		
0,07mM P _F 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT -3'		
0,07mM P _R 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T -3'		
0,5U Taq pol (INVITROGEN®)		

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Após a reação de PCR inicial as amostras serão classificadas em três grupos distintos: I/I, I/D e D/D; como em heterozigotia ocorre amplificação preferencial do alelo D, será realizada uma segunda reação de PCR apenas com as amostras que corresponderem ao genótipo D/D; os *primers* serão específicos para o alelo I, logo caso a amostra corresponda a I/D originará um fragmento após visualização no gel, caso contrário, não aparecerá qualquer banda.

Tabela 6 – Reagentes, Condições e tamanho dos fragmentos para reacção II

Reagentes (para $v_{final}= 25\mu\text{L}$)	Condições PCR	Tamanho dos fragmentos esperados
2 μL ADN		Inserção ~ 335bp
1,5mM MgCl ₂		
0,06mM dNTP (FINNZYMES \oplus)		
0,07mM P _F 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC -3'		
0,07mM P _R 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA -3'		
1U Taq pol (INVITROGEN \oplus)		

2.3.2.3. PCR para estudo dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 da GST

O estudo dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 será realizado através da amplificação por PCR convencional (de acordo com o método descrito por Arand *et al.*, 1996). Neste estudo será efetuada uma reacção por PCR multiplex, amplificando-se simultaneamente os fragmentos GSTM1, GSTT1 e um fragmento resultante da amplificação do gene da albumina que servirá como controlo interno positivo da reacção de PCR. (tabela 7)

Tabela 7 – Reagentes, Condições e tamanho dos fragmentos para reacção PCR multiplex

Reagentes (para $v_{final}= 50\mu\text{L}$)	Condições PCR	Tamanho dos fragmentos esperados
2 μL ADN		GSTM1 ~ 215bp GSTT1 ~ 480bp albumina ~ 350bp
2,5mM MgCl ₂		
50mM KCl		
3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSTM1 P _F 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C -3'		
3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSTM1 P _R 5'-GTT GGG CTC AAATAT ACG GTG G -3'		
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSTT1 P _F 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC -3'		
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GSTT1 P _R 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA -3'		
600ng/mL alb P _F 5'-GCC CTC TGC CTAACAAGT CCT AC -3'		
600ng/mL alb P _R 5'-GCC CTA AAAAG AAAATCG CCA ATC -3'		
50 U/mL AmpliTaq (Cetus \oplus)		

2.3.3. Análise estatística

A análise dos dados obtidos foi efetuada através do *software* estatístico SPSS (versão 18.0 para Windows®).

A amostra foi descrita através das médias e medianas como medidas de localização e desvio padrão e desvio interquartis como medidas de dispersão.

Avaliou-se o nível de 3-NT e o rácio GSH/GSSG em indivíduos com disfunção erétil, diabéticos e não diabéticos, com/sem hipertensão arterial (HTA), com/sem enfarte agudo de miocárdio (EAM) e com/sem dislipidémia.

Foi aplicado o teste t-Student para amostras independentes no caso dos resultados obtidos se distribuírem numa curva Normal (verificados mediante o teste Shapiro-Wilk). O método não paramétrico usado foi o Teste Mann-Whitney U.

Foi aplicado o teste t para uma amostra para avaliar se o rácio de GSH/GSSG se iguala ou difere de 449; bem como para avaliar se a concentração 3-NT se iguala ou difere de 0,031 μ M.

Capítulo III:

Resultados

3. Resultados

3.1. Nitrotirosina

Depois de várias análises em HPLC-DAD, concluiu-se que, relativamente ao pH, eluentes com pH=3,5 apresentavam melhores resultados para a identificação da 3-NT. Por análise do espectro (figura 14), os comprimentos de onda com maior absorção são 280nm e 357nm.

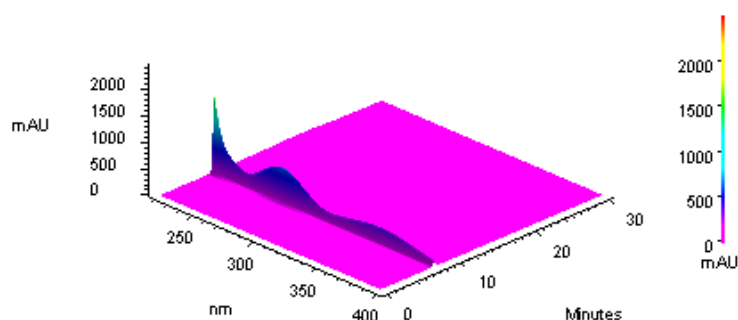


Figura 14 - Espectro de absorção da 3-NT

Os padrões foram analisados de forma a serem determinadas as condições ótimas para determinação da 3-NT. Depois das condições estabelecidas, prepararam-se várias concentrações de 3-NT e desenhou-se a curva de calibração (figura 15).

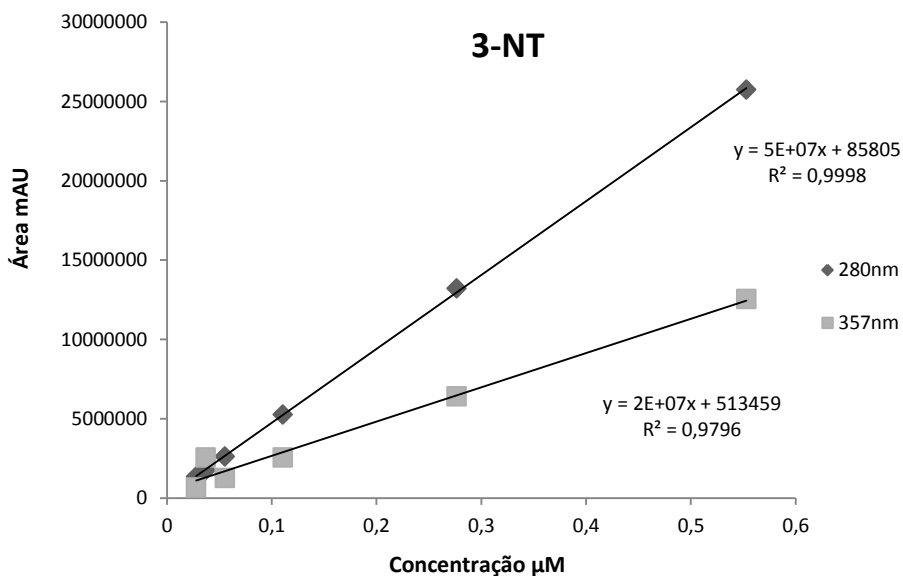


Figura 15 – Curva de calibração de 3-NT (para $\lambda=280$ e $\lambda=357$ nm)

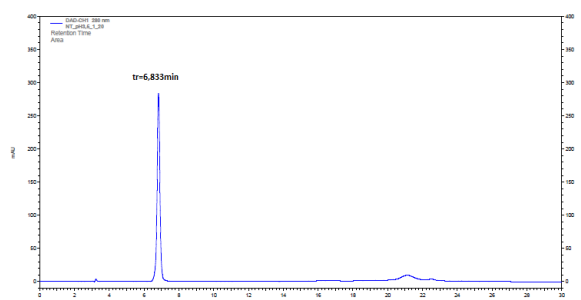
Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Foi determinado o tempo de retenção da 3-NT, bem como a sua variação, de acordo com as condições experimentais. O LD e o LQ para o método foi então determinado (tabela 8). A quantificação de 3-NT nas amostras foi obtida por integração dos picos correspondentes às condições dos padrões e substituição na reta estabelecida anteriormente.

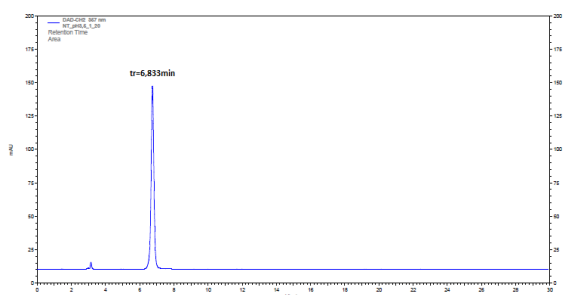
Tabela 8 – Tempo de retenção da 3-NT e parâmetros quantitativos do método desenvolvido

	Tempo retenção (min)	LD (mAU)	LQ (mAU)
3-NT	6,80±0,09	14771	49235

Por análise da área obtida para os padrões, nos dois comprimentos de onda de maior absorção, verificou-se que o comprimento de onda 280nm apresentou uma relação ruído/área ideal e menos interferências na análise de amostras do que o comprimento de onda de 357nm. As imagens seguintes apresentam os cromatogramas obtidos para o padrão e amostras (figuras 16 e 17).



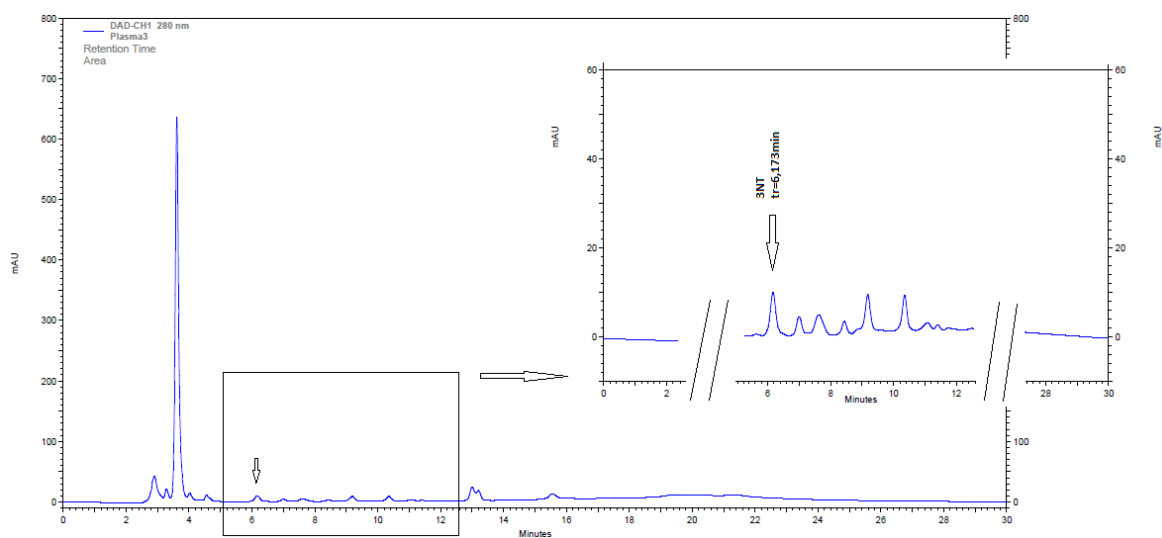
a)



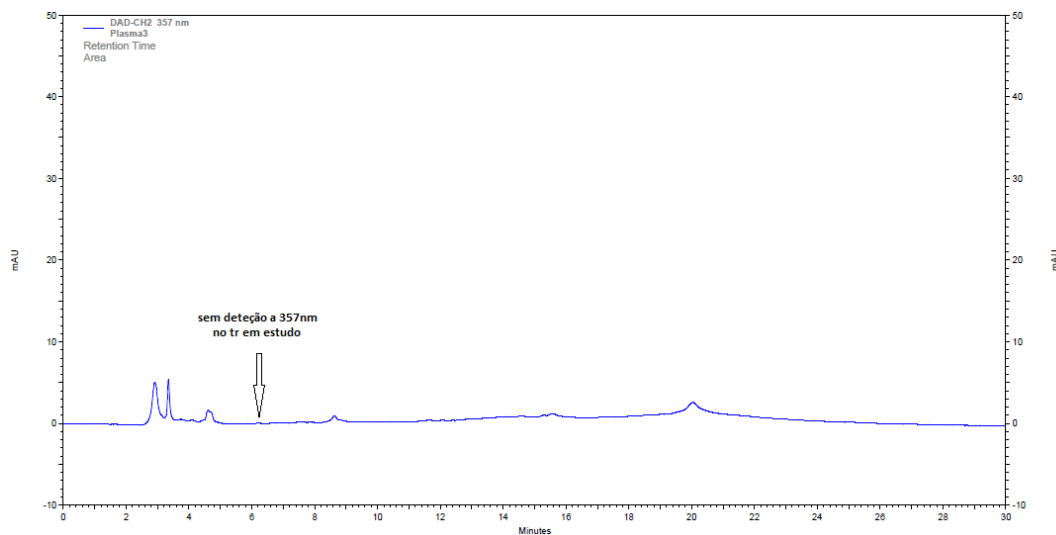
b)

Figura 16 – Cromatogramas dos padrões de 3-NT: (a) $\lambda=280\text{nm}$; (b) $\lambda=357$

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil



a)



b)

Figura 17 – Cromatogramas de uma amostra (detecção de 3-NT): (a) $\lambda=280\text{nm}$; (b) $\lambda=357\text{nm}$

Como se pode verificar pela observação dos cromatogramas apresentados, para os tempos de retenção definidos foi declinada a análise a 357nm.

As áreas integradas dos cromatogramas obtidos a 280nm das amostras encontram-se na tabela 9.

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Tabela 9 – Áreas de nitrotirosina

Áreas NT (mAU)					
493475	439632	608525	431319	321313	537824
424891	476397	543705	582065	292896	485548
497252	349178	456052	362134	449325	534302
447390	329069	507275	504945	367967	653782
439632	253277	652010	491566	486873	468315
218782	335164	335398	398618	301374	831020
241124	380922	509128	318305	541253	523476
206372	382163	488498	532782	357896	429520
238639	497375	471093	364043	574916	897334
388830	406406	416141	462837	589957	630133

Através da curva de calibração da 3-NT (figura 15) e das áreas obtidas pela análise dos cromatogramas das amostras (figura 17), calculou-se a concentração de 3-NT (tabela 10).

Tabela 10 – Concentração 3-NT (μM)

Concentração 3-NT (μM)			
8,15	4,99	6,91	4,31
6,78	5,90	9,93	9,11
8,23	5,93	5,53	5,44
7,23	8,23	8,38	9,78
7,08	6,41	8,12	10,08
2,66	10,45	6,26	9,04
3,11	9,16	4,65	7,99
2,41	7,40	8,94	8,97
3,06	8,43	5,56	11,36
6,06	11,32	7,54	7,65
7,08	4,99	4,71	14,90
7,81	8,47	4,14	8,75
5,27	8,05	7,27	6,87
4,87	7,71	5,64	16,23
3,35	6,61	8,02	10,89

A avaliação foi feita no plasma de 46 e no sangue total de 14 indivíduos. As concentrações obtidas para o plasma foram comparadas com o valor de referência e obtiveram-se os seguintes resultados (tabela 11):

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Tabela 11 – Avaliação concentração de 3-NT relativamente ao valor de referência no plasma

	N	\bar{x}	S	t	P
3-NT (μM) no plasma	46	6,561	2,083	21,266	<0.001

Através da tabela 11, pode-se verificar que existem diferenças significativas entre os valores de concentração 3-NT no plasma ($p < 0,001$) quando comparados com o valor de referência $0,031\mu\text{M}$ (Kamisaki *et. al*, 2009). Como referido anteriormente, foram analisadas amostras de plasma e de sangue total, foram comparadas as duas variáveis (tabela 12).

Tabela 12 – Estudo da comparação de 3-NT em plasma e em sangue total

3-NT	N	Md	Dq	U	P
plasma	46	3,134	3,000	546,0	<0,001
sangue total	14	9,005	3,096		

Existem diferenças significativas entre os valores de concentração de 3-NT medidos no sangue e no plasma ($p < 0,001$).

Dada a presença de disfunção erétil em todos os indivíduos, acoplada a outras patologias, fez-se uma tabela de frequências para essas outras doenças (tabela 13).

Tabela 13 – Frequência de diabetes, HTA, EAM e Dislipidémia na população em estudo

Patologia	Número de amostras			Total
	plasma	sangue total		
Diabetes	Não	23	6	60
	Sim	23	8	
HTA	Não	31	12	60
	Sim	15	2	
EAM	Não	36	10	60
	Sim	10	4	
Dislipidémia	Não	39	12	60
	Sim	7	2	

HTA - hipertensão arterial, EAM – enfarte agudo de miocárdio

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Como N de dislipidémicos, de hipertensos e de história prévia de enfarte agudo de miocárdio (EAM) no sangue total <6, não se procedeu à análise estatística destes.

Pelo cálculo das concentrações, foi possível a obtenção das médias ou medianas dos resultados nas várias patologias (tabelas 14, 15 e 16).

Tabela 14 - Mediana das concentrações da 3-NT no sangue total

Patologia		N	Md	Dq	U	P
Diabetes	Não	6	9,411	4,302	23,0	0,897
	Sim	8	8,862	2,936		

Não se detetaram diferenças significativas entre doentes com ou sem diabetes em amostras de sangue total, quando se pesquisou a concentração de 3-NT ($p \approx 0,897$).

Tabela 15 - Média das concentrações da 3-NT no plasma

Patologia		N	\bar{x}	S	t	P
Diabetes	não	23	6,734	2,296	0,560	0,579
	sim	23	6,388	1,881		
HTA	não	31	6,705	2,183	0,668	0,508
	sim	15	6,265	1,894		
EAM	não	36	6,568	2,214	0,045	0,965
	sim	10	6,535	1,621		

HTA; hipertensão arterial, EAM – enfarte agudo de miocárdio

Não se detetaram diferenças significativas, quando se pesquisou a concentração de 3-NT em amostras de plasma, entre doentes com ou sem diabetes ($p \approx 0,579$), doentes com ou sem HTA ($p \approx 0,508$) e doentes com ou sem EAM ($p \approx 0,965$).

Tabela 16 – Mediana das concentrações de 3-NT no plasma

Patologia		N	Md	Dq	U	P
Dislipidemia	não	39	6,782	2,673	120,0	0,614
	sim	7	5,267	3,242		

Não se detetaram diferenças significativas, quando se pesquisou a concentração de 3-NT em amostras de plasma, entre doentes com ou sem dislipidemia ($p \approx 0,614$).

Também se efetuou um estudo para avaliar a concentração de 3-NT com presença solitária de disfunção erétil relativamente às concentrações de 3-NT de pacientes com DE associada a outras patologias (diabetes, HTA, EAM, dislipidemia) (tabela 17).

Tabela 17 - Estudo da concentração de 3-NT em indivíduos somente com DE em relação a indivíduos com outras patologias (no plasma)

3-NT no plasma		N	\bar{x}	S	t	P
DE + outras patologias	não	10	6,769	3,015	0,265	0,796
	sim	36	6,503	1,796		

Mais uma vez, não se detectaram diferenças significativas na concentração de 3-NT em plasma de indivíduos só com DE ou com DE associada a outras patologias ($p \approx 0,796$).

3.2. Glutaciona

A primeira abordagem para a deteção e quantificação das formas oxidada e reduzida da glutaciona consistiu numa tentativa de deteção por HPLC das moléculas derivatizadas com DC, com deteção de fluorescência (figura 18) (Método A).

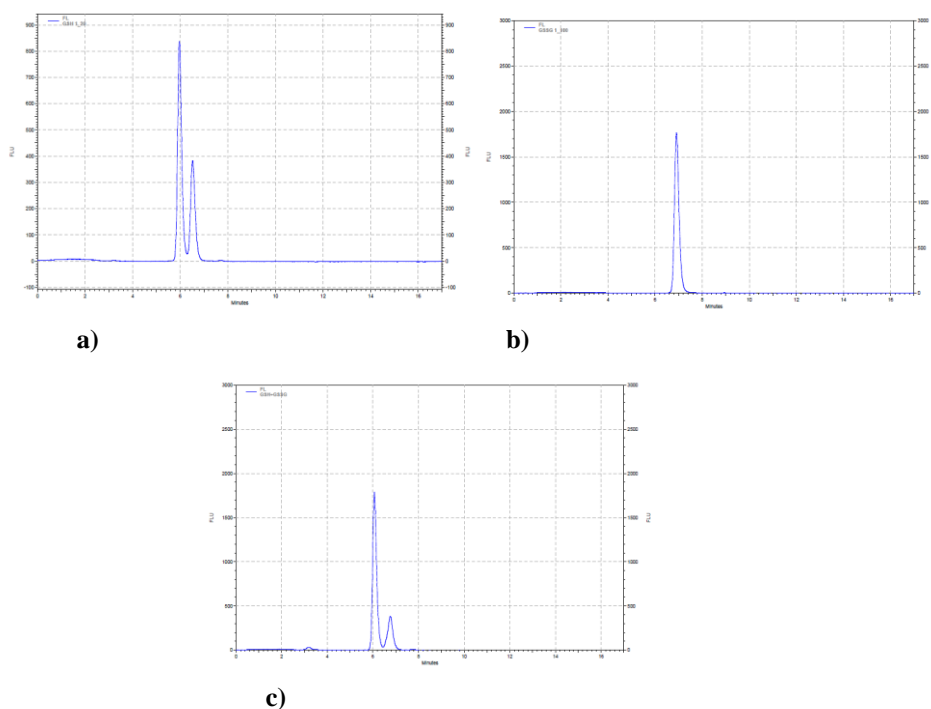


Figura 18 – Cromatogramas dos padrões pelo método baseado na deteção por fluorescência: (a) GSH, (b) GSSG; (c) GSH+GSSG. Cromatograma (a) indistinto de cromatograma (c).

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Este método não proporcionou uma análise independente das duas formas de glutatona, pelo que se optou por uma abordagem diferente.

O segundo método (método B) não recorreu ao uso de derivatizante e foi o método preferencial para a análise. Nesta segunda abordagem, recorreu-se a um detetor DAD. Na figura 19 apresenta-se o espectro de absorção das 2 formas da glutatona numa análise das duas formas em simultâneo.

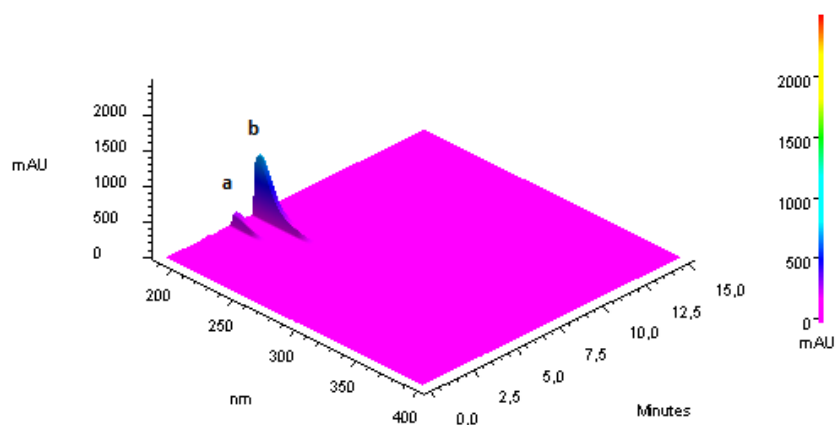


Figura 19 – Espectro de absorção de GSH+GSSG: (a) GSH; (b) GSSG.

Os padrões foram analisados, primeiramente, em separado, de forma a serem determinadas as condições óptimas para cada uma das formas. Depois das condições estabelecidas, prepararam-se várias concentrações da mistura dos padrões de GSH e GSSG e obteve-se a curva de calibração (figuras 20, 21 e 22).

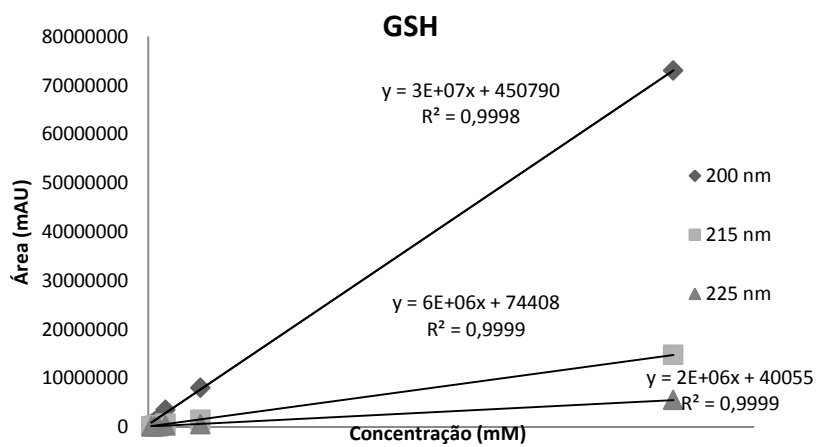


Figura 20– Curva de calibração de GSH (para $\lambda=200\text{nm}$, $\lambda=215\text{nm}$ e $\lambda=225\text{nm}$)

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

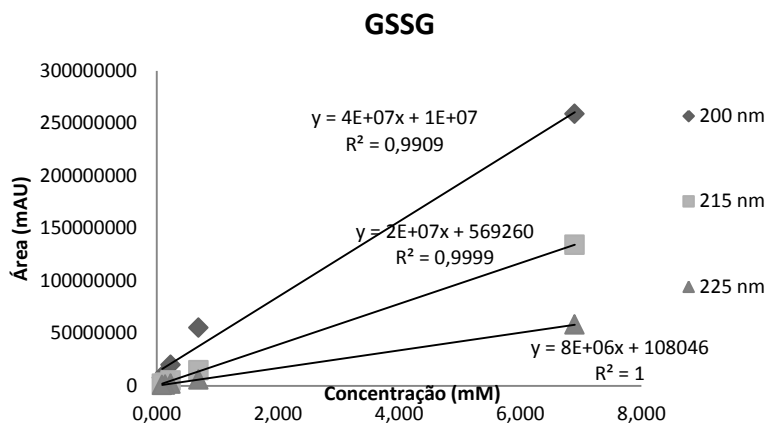


Figura 21 – Curva de calibração de GSSG (para $\lambda=200\text{nm}$, $\lambda=215\text{nm}$ e $\lambda=225\text{nm}$)

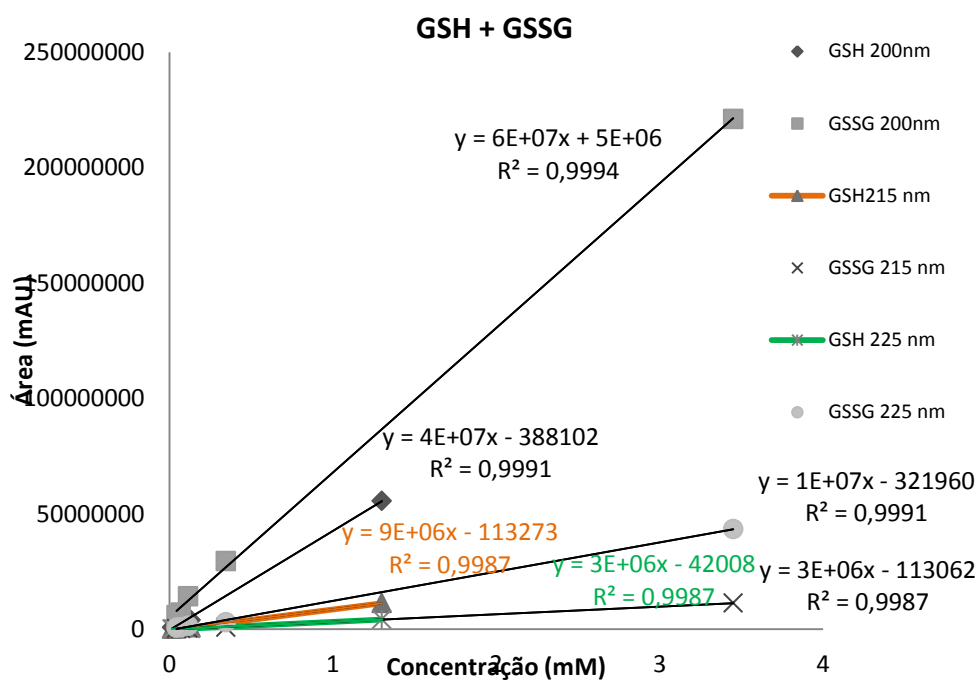


Figura 22 – Curva de calibração para os padrões de mistura GSH+GSSG (para $\lambda=200\text{nm}$, $\lambda=215\text{nm}$ e $\lambda=225\text{nm}$)

A curva de calibração para os padrões de mistura GSH+GSSG somente para o comprimento de onda 200nm encontra-se apresentada de seguida (figura 23).

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

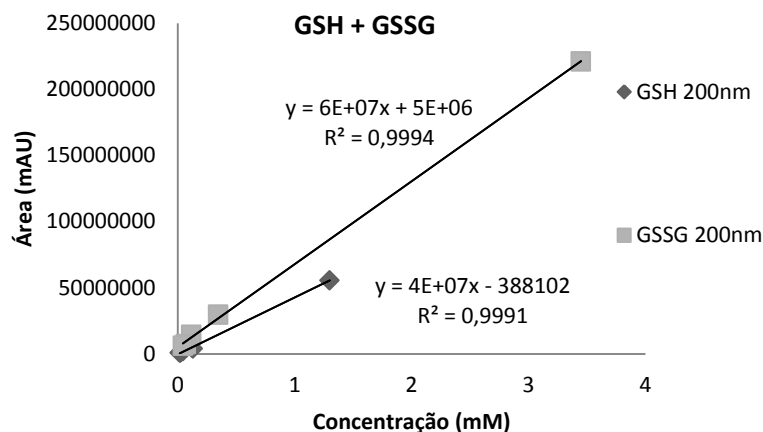


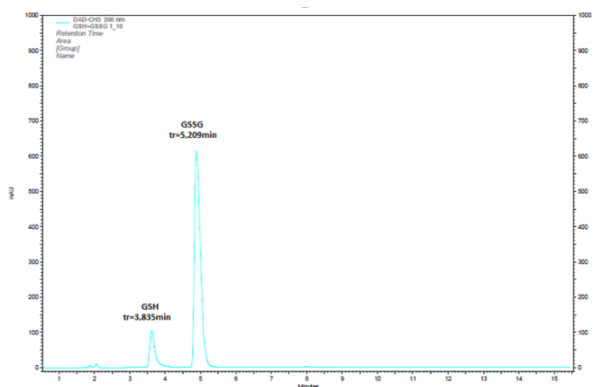
Figura 23 – Curva de calibração para os padrões de mistura GSH+GSSG (para $\lambda=200\text{nm}$)

Foi determinado o tempo de retenção da GSH e GSSG na mistura, bem como a sua variação com as condições experimentais. Foi determinado o LD e o LQ para cada padrão na mistura (tabela 18). De forma a expressar os resultados da análise das amostras, a determinação de GSH e GSSG nas amostras foi obtida por integração dos picos correspondentes às condições dos padrões.

Tabela 18 – Tempo de retenção da GSH e GSSG e parâmetros quantitativos do método desenvolvido

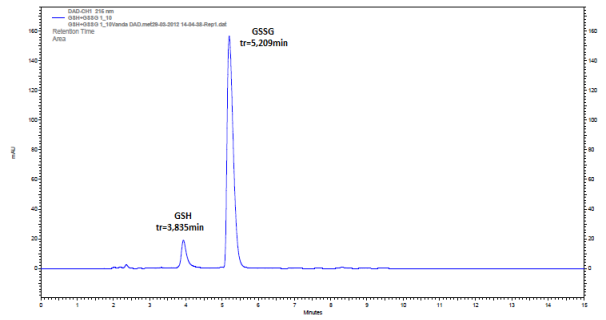
	Tempo retenção (min)	LD (mAU)	LQ (mAU)
GSH	3.91 ± 0.06	20797	69322
GSSG	$5,13 \pm 0.30$	15013	50043

Apresentam-se os cromatogramas dos padrões, aos 3 comprimentos de onda analisados (figura 24), bem como da análise de uma amostra (figura 25).

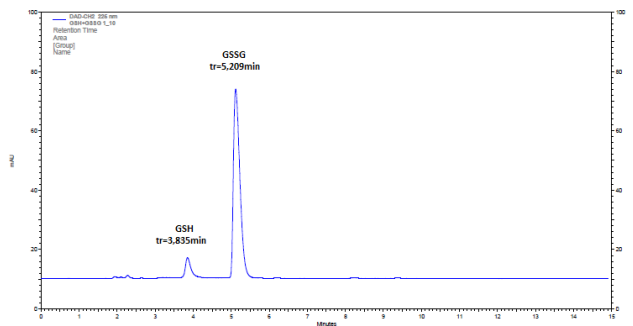


a)

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

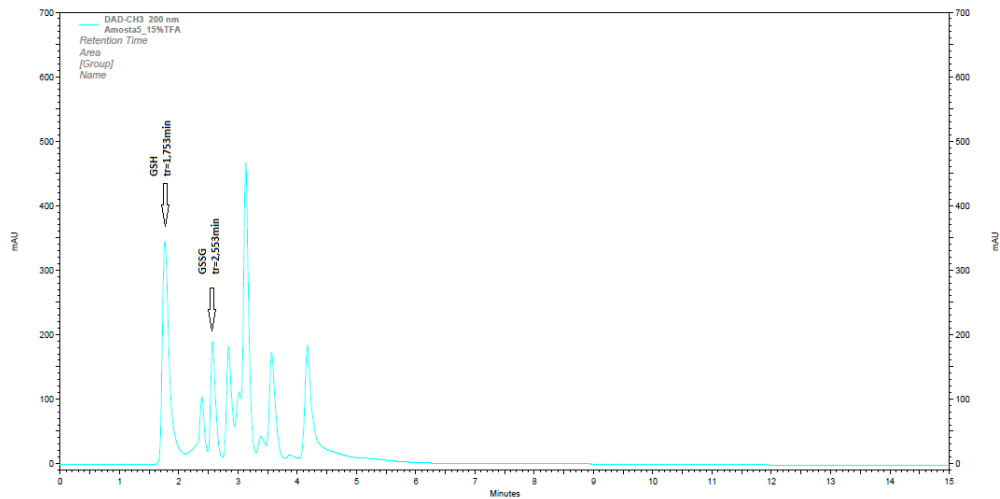


b)



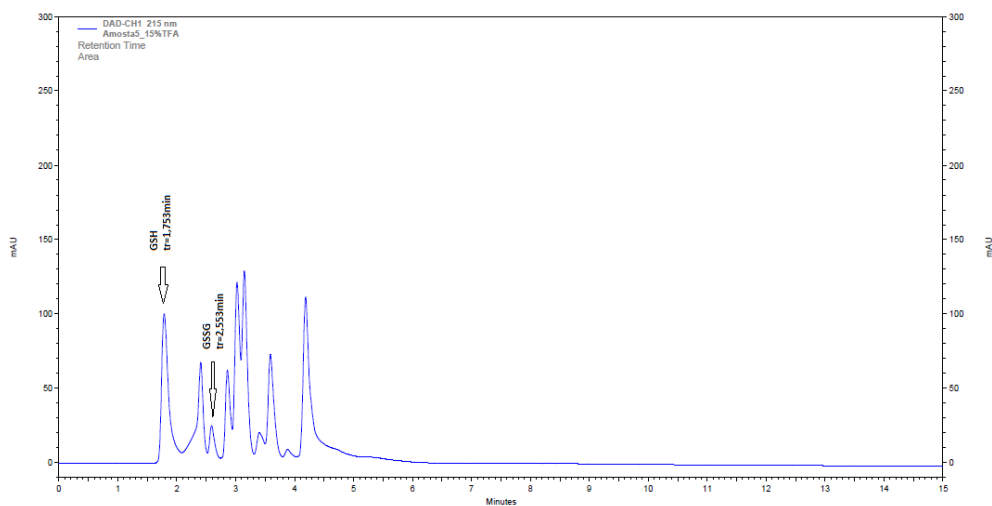
c)

Figura 24 – Cromatogramas dos padrões GSH+GSSG: (a) $\lambda=200\text{nm}$; (b) $\lambda=215\text{nm}$; (c) 225nm .

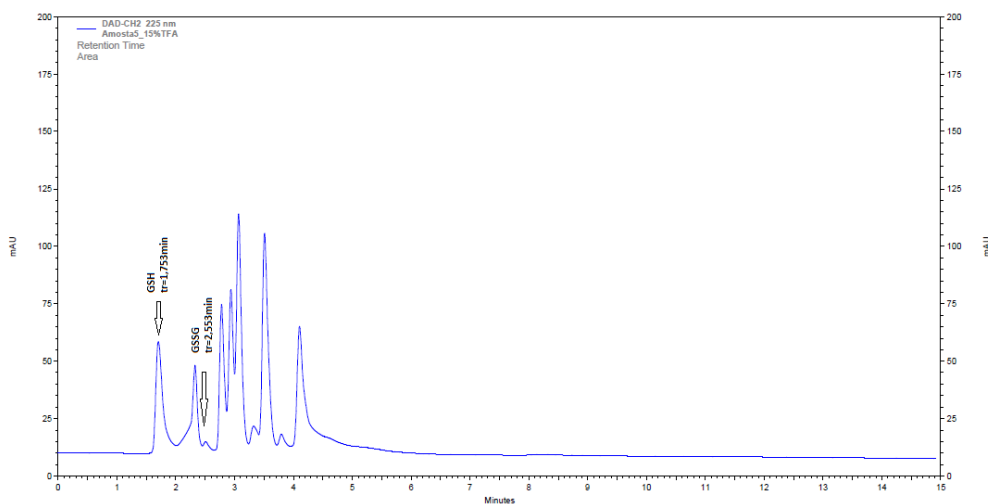


a)

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil



b)



c)

Figura 25 – Cromatogramas de uma amostra (detecção de GSH + GSSG): (a) $\lambda=200\text{nm}$; (b) $\lambda=215\text{nm}$; (c) $\lambda=225\text{nm}$.

Para os comprimentos de onda estabelecidos, 200nm foi o comprimento de onda que apresentou uma relação ruído/área ideal e menos interferências na análise de amostras.

Depois de analisadas as 60 amostras de sangue total, as amostras estudadas apresentaram glutathiona oxidada e glutathiona na forma reduzida, em rácios que foram determinados depois da integração das áreas dos picos correspondentes a cada uma das formas (tabela 19).

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Foi possível detetar GSH/GSSG num total de 49 amostras de sangue total, sendo que todos os valores se encontraram acima do LQ. As restantes 11 amostras não foram avaliadas por problemas técnicos e limitações de tempo.

Tabela 19 – Áreas e Rácio GSH/GSSG

Área picos (mAU)		Rácio	Área picos (mAU)		Rácio
GSH	GSSG	GSH/GSSG	GSH	GSSG	GSH/GSSG
16735705	2537493,5	6,6	24239018	2280829	10,6
27964874	2215345	12,6	29800931	1402675	21,2
13812345	4283225	3,2	25565035	4225818	6,0
53359831	2269661	23,5	35254479	4138433	8,5
13787792	5806831	2,4	29031585	2255364	12,9
18900562	3093164	6,1	18655430	921373	20,2
5738539	3171861	1,8	22875485	1305955	17,5
1235453	3792294	0,3	16969088	683382	24,8
4208010	3134446	1,3	23237248	3299309	7,0
18507787	3851291	4,8	72200703	1834830	39,4
29180280	3928768	7,4	28637289	4039904	7,1
17566319	9018611	1,9	24550208	3582480	6,9
19311809	2809254	6,9	38888702	5222621	7,4
28206321	3809212	7,4	24903026	1763611	14,1
31938933	1785758	17,9	26631317	3822299	7,0
12866002	1549826	8,3	25072496	2051840	12,2
32900619	2177975	15,1	28345944	2955240	9,6
42698649	1680423	25,4	16280034	2911098	5,6
17354756	2337828	7,4	12419314	2089594	5,9
18551497	2305181	8,0	20742867	3646589	5,7
17044557	1075891	15,8	25069731	2856158	8,8
37289891	1189273	31,4	20505729	2211764	9,3
37976513	2409130	15,8	15545099	4486545	3,5
19877366	511391	38,9	22926246	4793431	4,8
19573503	510200	38,4			

Efetuuou-se a comparação entre o rácio GSH/GSSG e o valor de referência (tabela 20).

Tabela 20 – Rácio GSH/GSSG das amostras relativamente ao valor de referência em sangue total

	N	\bar{x}	S	t	P
Rácio GSH/GSSG	49	11,936	9,762	-313,377	<0,001

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

Existem diferenças significativas entre o rácio GSH/GSSG determinado no sangue total dos doentes, relativamente ao valor de referência ($p < 0,001$). O valor de referência usado foi um rácio de 449, obtido a partir das concentrações de GSH e GSSG no sangue total de indivíduos saudáveis (Giustarini *et al.*, 2003; Monostori *et al.*, 2009).

Depois de calculados todos os rácios, estes foram distribuídos pela população em estudo, de acordo com as patologias que possuíam, além da disfunção erétil (tabela 21):

Tabela 21- Estudo estatístico dos rácios GSH/GSSG

Patologia		N	Md	Dq	U	P
Diabetes	não	20	7,245	18,748	278,0	0,807
	sim	29	8,300	8,165		
HTA	não	34	8,650	14,478	206,0	0,288
	sim	15	7,430	8,060		
EAM	não	37	8,520	12,345	164,0	0,178
	sim	12	6,600	8,130		
Dislipidémia	não	43	8,520	9,730	86,0	0,190
	sim	6	5,890	9,905		

HTA- hipertensão arterial; EAM- Enfarte agudo do miocárdio

Não se detetaram diferenças significativas, quando se avaliou o rácio GSH/GSSG em amostras de sangue total, entre doentes com disfunção erétil, com ou sem diabetes ($p \approx 0,807$), doentes com ou sem HTA ($p \approx 0,288$), doentes com/sem história prévia de EAM ($p \approx 0,178$) e doentes com ou sem dislipidémia ($p \approx 0,190$).

Avaliou-se, também qual a diferença de rácios relativamente à presença/ausência de patologia associada à DE (tabela 22):

Tabela 22 – Rácio GSH/GSSG de indivíduos só com DE vs com DE e outras patologias

Rácio GSH/GSSG		N	Md	Dq	U	P
DE + outras patologias	não	8	21,360	26,878	82,0	0,027
	sim	41	7,420	7,680		

Detetaram-se diferenças significativas no rácio GSH/GSSG em amostras de sangue total de indivíduos somente com DE ou com DE associada a outras patologias ($p \approx 0,027$).

Capítulo IV:

Discussão

4. Discussão

A pesquisa de biomarcadores de distúrbios que tenham por base na sua fisiopatologia o stress oxidativo tem vindo a ganhar cada vez mais relevância ao nível da investigação, principalmente para a sua aplicação médica e biológica.

O uso de métodos analíticos sensíveis para separação e deteção de biomarcadores resultantes do metabolismo oxidativo é inquestionavelmente importante, porque apoiam o diagnóstico e o tratamento de várias patologias. As diferentes técnicas analíticas usadas para a determinação das concentrações de glutathiona e/ou nitrotirosina no sangue, desde que devidamente calibradas com padrões, permitem a obtenção de análises válidas. Essas técnicas consistem, geralmente, em métodos espectrofotométricos e métodos baseados em HPLC. O método mais usado é o de HPLC acoplada a detetores UV, fluorescentes ou eletroquímicos (Duncan, 2003; Pastore *et al.*, 2003). Geralmente os métodos de HPLC são baseados em processos de derivatização, que necessitam de um gasto de tempo considerável, bem como de recursos dispendiosos. Daí que seja premente o desenvolvimento de novos métodos que se revelem mais eficazes, sensíveis e rápidos.

O presente estudo salientou a importância da deteção e quantificação destas moléculas pela sua participação em eventos fisiopatológicos da DE. Os métodos otimizados requereram a técnica HPLC-DAD, que se trata de um método cromatográfico que se destaca entre os demais devido ao facto de ser capaz de quantificar uma ampla variedade de compostos que, por exemplo, não poderiam ser analisados utilizando a cromatografia gasosa, visto que estes necessitam apenas de ser solúveis na fase móvel, o que o torna extremamente vantajoso na análise de produtos biológicos, como é o caso das amostras estudadas.

4.1. Nitrotirosina

A 3-NT existe em duas formas separadas, como aminoácido livre e como aminoácido integrado no “esqueleto” de uma proteína. O facto de se proceder à hidrólise proteica, faz com que esta pesquisa se tivesse feito no aminoácido livre. Caso o alvo fosse a 3-NT proteica, seriam necessários passos adicionais, envolvendo isolamento proteico e proteólise, passos esses que, além de difíceis de efetuar, complicariam a análise pela indução de artefactos (Shigenaga *et al.*, 1997; Duncan, 2003). A preparação da amostra

envolve, geralmente, hidrólise ácida de proteínas a aminoácidos, embora em alguns casos se recorra a hidrólise enzimática (Kovina *et al.*, 1996, Hensley *et al.*, 1998)

O maior problema destes métodos é a verificação da hidrólise completa da proteína em aminoácidos simples, bem como o estudo da possível criação ou destruição de 3-NT durante o processo de hidrólise. A 3-NT é reportada como sendo estável à hidrólise ácida, no entanto já foi detetada a conversão de 3-NT em aminotirosina durante este processo. Estão descritos métodos baseados em combinações de HPLC e vários tipos de ECD muito versáteis e bastante sensíveis por injeção de hidrolisado de proteínas. Estes são apenas limitados pela quantidade de amostra e pela preparação requerida para se obterem cromatogramas aceitáveis. A utilização de MS pode, também, revelar-se uma vantagem para localizar os resíduos de 3-NT em fragmentos peptídicos (Herce-Pagliai, *et al.*, 1998).

O presente estudo baseou-se em determinações por HPLC-DAD sem recurso a derivatização. De acordo com o espectro UV/Vis da nitrotirosina (figura 26), a pH=3,5 observam-se picos de absorção a 280nm e a 357nm; a pH=10 a absorção dá-se perto dos 425nm (Yang *et al.*, 2010).

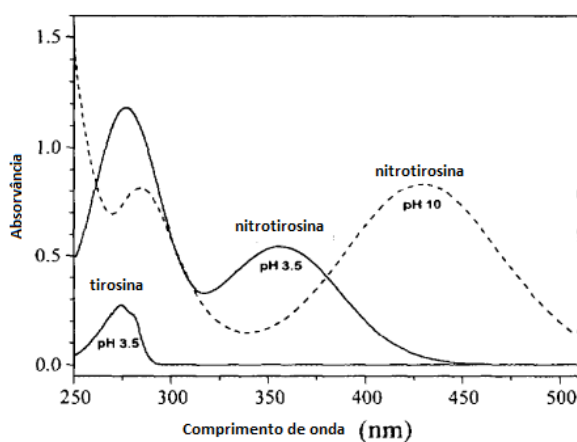


Figura 26 – Espectro UV da tirosina e nitrotirosina – (adaptado de Yang *et al.*, 2010)

Nesta análise, optou-se por efetuar um primeiro teste preparando 3 padrões aquosos a diferentes valores de pH. Acertou-se a pH=3,5, pH=7 e pH=10, recorrendo a TFA ou NaOH, respetivamente.

A figura 26 permite, também, avaliar o espectro da tirosina. Verificou-se que esta apenas absorve a 280nm, pelo que a análise da tirosina, o cálculo da sua concentração e do seu

tempo de retenção, daria um perfil mais completo das amostras, de forma a calcular o rácio 3-NT/tirosina. Pela análise do espectro, o pH ideal para determinação de 3-NT teria sido 10, pois nesse valor de pH não ocorre interferência da tirosina (a 425nm). No entanto, tal não foi possível pois nas condições utilizadas não conseguimos obter uma boa relação ruído/área nos padrões de 3-NT, a pH=10.

Depois de várias análises em HPLC-DAD, concluiu-se que, apenas relativamente ao pH=3,5 e, conseqüentemente, a 280nm e a 357nm, se obteve uma boa relação ruído/área. Foi usado, inicialmente, um fluxo de 0,3mL/min de acordo com Yang *et al.*, mas para otimizar as condições experimentais, optou-se por um fluxo de 0,7mL/min, o que originou picos melhor definidos (Yang *et al.*, 2010).

Através do espectro de absorção da 3-NT obtido nesta análise (figura 14), pode-se concluir que, pelo varrimento de 190-400nm, ocorrem ondas de absorção ao nível dos 280nm e 357nm, sendo estas mais elevadas a 280nm. Como a 3-NT tem um máximo secundário a 357 nm (pH=3,5), a deteção mais seletiva ocorreria neste λ (Yang *et al.*, 2010).

Depois de corridos todos os padrões, a curva de calibração (figura 15) obtida para 280nm apresentou um $R^2 > 0.99$, enquanto que para 357nm o $R^2 < 0.99$. Por observação direta do método e avaliação dos parâmetros gráficos optou-se pelo comprimento de onda de 280nm, apesar do objetivo inicial ser baseado na deteção seletiva dos 357nm.

O tempo de retenção do pico de 3-NT foi de $6,80 \pm 0,09$ minutos. De acordo com os cromatogramas dos padrões (figura 16) os picos apresentaram absorvância mais elevada na ordem dos 280nm e a 357nm, sendo esta superior a 280nm. No caso das amostras (figura 17), depois de toda a análise, verificou-se a ausência de picos a 357nm. Aos 280nm, pelo contrário, apareceram os picos desejados, ao tempo de retenção desejado. Como o analito se encontrava em concentrações muito baixas, na ordem dos μM , a figura 17 (a) foi ampliada para melhor visualização.

Esta técnica permitiu, portanto, a separação da 3-NT dos outros componentes da amostra. A análise a 280nm separou diferentes moléculas e o tempo de retenção referente à 3-NT variou entre os 5,4 e os 10,1 minutos. Como nas amostras se possui uma matriz complexa, esta divergência nos tempos de retenção é considerada normal. Além disso as amostras não foram analisadas no mesmo dia, sendo que as fases móveis, preparadas em alturas

diferentes, podem influenciar os tempos de retenção. De forma a precaver erros de análise, foi corrida uma solução de padrão em cada dia de análise.

Depois da integração das áreas das amostras ao comprimento de onda 280nm obteve-se a tabela 9, onde se pode verificar que todos os valores se encontraram acima do LQ (49235mAU).

As concentrações de 3-NT, obtidas através da equação da reta ($y = 5E7x + 85805$) demonstradas na tabela 10, apresentam valores que variaram entre 2,41-16,23 μM .

De acordo com Kamisaki *et al.*, os valores reportados para 3-NT no plasma rondam os $0,031 \pm 0,006 \mu\text{M}$. Os valores obtidos nas amostras não se enquadram nos valores normais para o plasma sanguíneo de indivíduos saudáveis. Efetuou-se, então, a comparação das concentrações de 3-NT nas amostras com o valor de referência no plasma (tabela 11), sendo que se pode afirmar que existem grandes diferenças entre as duas (Kamisaki *et al.*, 1996). O valor médio das concentrações de 3-NT nas amostras obtido foi de $6,561 \pm 2,083 \mu\text{M}$.

O aumento do valor de concentração de 3-NT no plasma de indivíduos com DE pode, de acordo com os resultados obtidos, ser considerado um biomarcador de stress oxidativo. Estas observações vão ao encontro a outros estudos efetuados tendo por base o papel da 3-NT no mecanismo fisiopatológico da doença. É o caso de um estudo efetuado em pacientes com artrite reumatóide. Esta doença é caracterizada por um processo inflamatório crónico relacionado com dano oxidativo e os resultados para a 3-NT variaram entre 0-1,2 μM para indivíduos doentes, sendo que ultrapassam, também, os valores de referência (Kaur & Halliwell, 1994).

As amostras utilizadas foram tanto de sangue total como de plasma. A tabela 12 compara os dois tipos de amostragem. Pelos resultados podemos verificar que, no sangue total, as concentrações de 3-NT são bastante superiores. Como não são efetuados tantos processos extrativos a percentagem de aminoácidos presentes no sangue total é, naturalmente, superior.

Sabido que as amostras estudadas não possuem um só fator de risco de desenvolvimento de stress oxidativo, traçou-se o perfil das amostras relativamente à frequência de outras patologias – diabetes, HTA, EAM e dislipidémia (tabela 13). De todas elas, há uma

predominância de diabetes, sendo que esta patologia está bastante relacionada com a DE (Fonseca & Jawal).

Avaliou-se, então, a distribuição das concentrações de 3-NT pelas patologias referidas (tabelas 14, 15 e 16). Não se encontraram diferenças significativas entre os valores de 3-NT relativamente à presença/ausência de diabetes/HTA/história prévia de EAM/dislipidémia, tanto no plasma como em sangue total. De facto o denominador comum destes pacientes é o seu histórico de DE. As patologias associadas podem estar, ou não, controladas e os indivíduos podem estar em estadios diferentes na história natural da doença, logo pode tratar-se de uma população heterógena relativamente à manifestação destas comorbilidades, não resultando numa curva normal de resultados.

Compararam-se, também, as concentrações de 3-NT dos indivíduos possuidores apenas de DE com os indivíduos com DE associada a outra patologia no plasma (tabela 17). As diferenças não foram significativas. Seria esperado que, pela associação de duas, três ou mais patologias, o nível de disfunção endotelial fosse superior, pois poderiam refletir o *síndrome metabólico* subjacente. No entanto, os resultados não comprovaram este facto.

Os resultados obtidos sustentam a hipótese de que a 3-NT pode revelar importância clínica na medição do grau de DE e realça o papel da disfunção endotelial na patogénese da doença, se bem que só ficou patente a relação com a DE.

A importância da deteção de 3-NT vai, porém, muito além do seu papel como um biomarcador de stress oxidativo. O seu papel em sistemas biológicos pode ser ainda mais complexo através da nitração de resíduos de tirosina que possam influenciar a função celular, como por exemplo ao nível das cascatas de sinalização, podendo levar a consequências imprevisíveis (Pacher *et al.*, 2007).

4.2. Glutathiona

De acordo com Simplicio *et al.*, o rácio GSH/GSSG é bastante alto a nível intracelular (30-300), enquanto no plasma apresenta valores entre 1-10. A razão para esta diferença é ainda desconhecida. No entanto é geralmente aceite que o plasma tem um poder antioxidante relativamente baixo em termos de tióis (Simplicio *et al.*, 2003). Este facto levou a que o estudo se efetuasse em sangue total.

As fontes mais importantes de artefactos nos resultados estão associadas à colheita de amostra. A hemólise dos glóbulos vermelhos, que contêm níveis de GSH muito mais elevados que o plasma, podem originar um valor superior de GSH e a manutenção da amostra à temperatura ambiente pode levar a um aumento da oxidação e, por sua vez, ao aumento de GSSG. Há também a possibilidade de diminuição de GSH por degradação enzimática por enzimas presentes no plasma humano. Os cuidados a ter são, portanto, boas-práticas durante a colheita e refrigeração imediata das amostras. Para a preservação das soluções é conveniente o uso de EDTA, anticoagulante e agente quelante de metais (incluindo o Fe^{2+}), podendo desta forma evitar reações oxidativas indesejáveis (Monostori *et al.*, 2009).

Optou-se, inicialmente pelo método A, pois os detetores de fluorescência são utilizados como uma técnica de detecção específica, aumentando a sensibilidade deste método. Este tipo de detetor pode detetar quantidades na ordem dos picogramas (Jones *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002). Pela análise da mistura dos dois padrões (figura 18) não foi possível fazer a distinção entre as duas formas, como se vê nos cromatogramas a) e c). O processo de remoção de derivatizante também não foi eficaz, sendo que houve interferências deste na análise dos padrões.

Decidiu-se, então, aplicar o método B em que não foi utilizado nenhum agente derivatizante. Prepararam-se os padrões de GSH e GSSG, e as moléculas foram corridas com H_2O com 0,085% de H_3PO_4 , em modo isocrático.

De acordo com Yilmaz *et al.*, a detecção ideal das moléculas de glutathione ronda os 215nm (Yilmaz *et al.*, 2009). Algumas referências indicam o comprimento de onda de 220nm como o ideal para análise de GSH e GSSG sem recorrer a derivatização (Monostori *et al.*, 2009).

A detecção foi feita através de DAD (diode array detector), baseado na absorvância das substâncias na região do UV e visível. Essa detecção foi efetuada a 3 comprimentos de onda previamente selecionados e de acordo com a bibliografia consultada, de forma a determinar qual o que mais se adequou à análise das amostras. Os λ selecionados foram 200nm, 215nm e 225nm, sendo que o programa de *software* executa uma leitura com varrimento entre os comprimentos de onda 190 e 400nm, definidos pelo operador. O

espectro de absorção da mistura de GSH e GSSG (figura 19) demonstra a absorvância dos padrões nos comprimentos de onda escolhidos.

De acordo com as curvas de calibração dos padrões (figuras 20, 21, 22 e 23), como $R^2 > 0,99$ para os 3 comprimentos de onda, a análise das amostras foi, também, efetuada a 200, 215 e 225nm.

O tempo de retenção associado aos padrões foi de $3,91 \pm 0,06$ min e $5,13 \pm 0,30$ min para a GSH e GSSG, respetivamente (tabela 18).

Pela análise dos cromatogramas dos padrões (figura 24) foi possível a separação e análise nos três comprimentos de onda estabelecidos, mas o $\lambda = 200$ nm foi o que apresentou uma relação ruído/área superior e menos interferências na análise de amostras, sendo que, desta forma foram calculados o LD e LQ (tabela 18).

Relativamente às amostras, e como é evidente na figura 25, os picos ficaram bem definidos e ocorreu separação das diferentes moléculas presentes no sangue, incluindo as moléculas a estudar.

O tempo de retenção das amostras foi inferior ao verificado nos padrões, pelo que a identificação das formas da glutathiona foi feita com recurso à análise do espectro de absorção para cada pico. O desvio verificado pode dever-se à complexidade da matriz das amostras, que interagem, quer com a fase estacionária da coluna, quer com os constituintes da própria matriz, fazendo com que o tempo de retenção da GSH e GSSG na coluna seja menor. O facto de as amostras recorrerem à hidrólise ácida de proteínas, altera o pH da amostra, alterando também o tempo de retenção. Ao comparar os três cromatogramas da amostra pode-se verificar a melhor resolução ao nível dos 200nm, sendo que os picos estão melhor definidos.

Depois da integração das áreas das amostras, ao comprimento de onda de 200nm, através da equação das retas $y = 6E7x + 5E6$ e $y = 4E7x - 388102$ (para GSH e GSSG, respetivamente), obteve-se a tabela 16, onde se pode verificar que todos os valores se encontraram acima do LQ (69322mAU e 50043mAU, para GSH e GSSG, respetivamente). O rácio GSH/GSSG foi também calculado. De acordo com as evidências experimentais, o rácio de GSH/GSSG varia consoante a presença/ausência de doença associada e,

normalmente, os valores de rácio mais elevados são indicativos de indivíduos saudáveis (Pastore *et al.*, 2003).

Foi efetuada a comparação entre os rácios das amostras e do valor de referência, que foi considerado 449 (Giustarini *et al.*, 2003). Verificaram-se diferenças significativas entre o rácio GSH/GSSG das amostras e o valor de referência (tabela 19). Os valores de rácio das amostras encontraram-se muito abaixo deste valor, o que poderá levar a uma associação entre a DE e stress oxidativo.

Todos os pacientes que participaram no estudo tinham o diagnóstico de DE, podendo, ou não, ser diabéticos, ser hipertensos, ter tido uma história prévia de EAM ou ter dislipidémia. As frequências destas variáveis estão evidenciadas na tabela 20, bem como as comparações entre portadores e não portadores, de cada uma destas doenças. Todas as diferenças revelaram-se não significativas. De facto, o grau de cada uma destas patologias não é descrito isoladamente para cada doença, pelo que não foi possível a comparação entre os grupos “sim” e os grupos “não”.

Procurou-se então comparar o rácio GSH/GSSG em indivíduos só com DE e analisar as diferenças com os que possuíam DE associada a outras patologias (tabela 21). Neste caso, pela associação de várias patologias, verificou-se um aumento significativo do rácio nas amostras de sangue dos indivíduos só com DE. Pode-se concluir que o aumento dos fatores de risco propiciando mais stress oxidativo, levou a uma diminuição dos valores de rácio nestes pacientes. A associação das várias patologias estudadas, caracterizam doentes com *síndrome metabólico*, fazendo com que os resultados obtidos sustentem a hipótese de um dano endotelial elevado com as comorbilidades.

Através dos resultados pode-se afirmar que existem evidências que relacionem o papel do stress oxidativo, pela diminuição do rácio GSH/GSSG, com a DE, e principalmente com a associação desta a outras patologias que intervenham na disfunção endotelial.

4.3. Limitações

A grande limitação deste estudo foca-se na impossibilidade de comparação dos níveis estudados entre amostras de indivíduos diagnosticados com DE e de indivíduos saudáveis, pois não foi possível o fornecimento destas últimas. As relações estabelecidas entre os valores obtidos e a bibliografia consultada podem não refletir a verdadeira dimensão das

diferenças. Outra das limitações tem que ver com o facto de o processamento das amostras ter sido feito sempre alguns dias/semanas após a sua colheita, o que pode ter contribuído para a alteração dos valores da concentração de 3-NT e do rácio GSH/GSSG.

Quanto à determinação de 3-NT, a sua deteção foi efectuada a 280nm, apesar de neste λ ocorrer absorção de tirosina. A determinação da tirosina seria também importante mas tal não foi possível por falta do reagente.

Quanto ao rácio GSH/GSSG, não existe bibliografia que indique valores diretos deste índice para sangue total, sendo que os valores reportados normalmente se referem a plasma. Foi feito o cálculo do valor do rácio GSH/GSSG em sangue total a partir das concentrações encontradas na literatura.

Por limitações de tempo não foi possível a pesquisa de polimorfismos genéticos.

4.4. Perspetivas futuras

Os resultados obtidos, tanto para a 3-NT como para o rácio GSH/GSSG podem ser indicadores de stress oxidativo em indivíduos com DE. Revela-se importante a confirmação desses mesmos valores com estudos futuros, principalmente pela avaliação do impacto da hidrólise ácida e do processamento de amostras na possível alteração dos níveis de 3-NT e do rácio GSH/GSSG. Torna-se fulcral analisar um maior número de amostras de forma a possibilitar mais análises comparativas entre as patologias, principalmente a DE e a *diabetes mellitus*, visto que, num total de 60 amostras de indivíduos com DE, 31 deles eram também diabéticos.

A determinação do rácio 3-NT/tirosina será um índice muito mais fidedigno de avaliação de stress oxidativo do que a 3-NT isoladamente.

Neste momento estão a decorrer os processos de extração de DNA das amostras e a otimização da análise por PCR. Novas investigações relacionadas com pesquisas dos polimorfismos devem ser levadas a cabo, desde que a evidência da terapia genética possa ser eficaz, de forma a restaurar a função erétil.

Capítulo V:

Conclusão

5. Conclusão

A ereção peniana normal depende da integridade do endotélio. A DE pode ter origem numa diminuição na biodisponibilidade de NO, devido ao aumento da produção de ROS. Os mecanismos usados pelo organismo para contornar este aumento de stress oxidativo envolvem a intervenção do sistema GSH/GSSG. A nitração de biomoléculas é também um processo comum quando se está na presença de ROS, principalmente a nitração de resíduos de tirosina, produzindo 3-NT.

Com esta dissertação, pretendia-se o desenvolvimento de um método cromatográfico dirigido à análise do teor de GSH, GSSG e 3-NT em sangue total e plasma de indivíduos apresentando DE. Este distúrbio pode, também, estar intimamente ligado à fisiopatologia de outras doenças, tais como *diabetes mellitus*, HTA, EAM e dislipidémias que muitas vezes se associam entre si. O *síndrome metabólico* comporta, geralmente, dano endotelial e aterosclerose, pelo que o seu papel no aumento do stress oxidativo é, também, relevante.

GSH, GSSG e 3-NT podem ser diretamente analisadas por HPLC-DAD. Os métodos otimizados revelaram-se práticos, sensíveis e rápidos para a análise destes marcadores biológicos. O estudo atual focou-se, também, em aspetos de colheita de amostras e processamento que podem contribuir em variações de medidas mesmo com métodos analíticos fidedignos de medição destas três moléculas.

Este estudo constituiu um contributo científico que reforçou o papel do stress oxidativo e da pesquisa de biomarcadores como componentes essenciais no estudo da etiologia, deteção, prevalência e gravidade da DE.

Referências bibliográficas

- AGARWAL, A., NANDIPATI, K. C., SHARMA, R. K., ZIPPE, C. D. & RAINA, R. 2006. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl*, 27, 335-47.
- AMER, M. A., GHATTAS, M. H., ABO-ELMATTY, D. M. & ABOU-EL-ELA, S. H. 2011. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. *Genet Mol Res*, 10, 3722-30.
- ANGELI, V., CHEN, H., MESTER, Z., RAO, Y., D'ULIVO, A. & BRAMANTI, E. 2010. Derivatization of GSSG by pHMB in alkaline media. Determination of oxidized glutathione in blood. *Talanta*, 82, 815-20.
- ARAND, M., MUHLBAUER, R., HENGSTLER, J., JAGER, E., FUCHS, J., WINKLER, L. & OESCH, F. 1996. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem*, 236, 184-6.
- ARAUJO, A. R., SARAIVA, M. L. & LIMA, J. L. 2008. Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system. *Talanta*, 74, 1511-9.
- ARGYRI, A. A., DOULGERAKI, A. I., BLANA, V. A., PANAGOUE, E. Z. & NYCHAS, G. J. 2011. Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. *Int J Food Microbiol*, 150, 25-33.
- BACKOS, D. S., FRANKLIN, C. C. & REIGAN, P. 2012. The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem Pharmacol*, 83, 1005-12.
- BALD, E., CHWATKO, G., GLOWACKI, R. & KUSMIEREK, K. 2004. Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr A*, 1032, 109-15.
- BECKMAN, J. S. & KOPPENOL, W. H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-37.
- BENTZ, B. G., HAINES, G. K., 3RD & RADOSEVICH, J. A. 2000. Increased protein nitrosylation in head and neck squamous cell carcinogenesis. *Head Neck*, 22, 64-70.
- BERNARDI, S., TOFFOLI, B., ZENNARO, C., TIKELLIS, C., MONTICONE, S., LOSURDO, P., BELLINI, G., THOMAS, M. C., FALLO, F., VEGLIO, F., JOHNSTON, C. I. & FABRIS, B. 2012. High-salt diet increases glomerular ACE/ACE2 ratio leading to oxidative stress and kidney damage. *Nephrol Dial Transplant*, 27, 1793-800.
- BICKLEY L. S., Bate's Guide to physical examination and history taking. 2007. 9th ed, *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, 411-2.
- BRAMANTI, E., VECOLI, C., NEGLIA, D., PELLEGRINI, M. P., RASPI, G. & BARSACCHI, R. 2005. Speciation and quantification of thiols by reversed-phase chromatography coupled with on-line chemical vapor generation and atomic fluorescence spectrometric detection: method validation and preliminary application for glutathione measurements in human whole blood. *Clin Chem*, 51, 1007-13.
- BURNETT, A. L., MAGUIRE, M. P., CHAMNESS, S. L., RICKER, D. D., TAKEDA, M., LEPOR, H. & CHANG, T. S. 1995. Characterization and localization of nitric oxide synthase in the human prostate. *Urology*, 45, 435-9.
- CALLES-ESCANDON, J. & CIPOLLA, M. 2001. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev*, 22, 36-52.
- CARTLEDGE, J. J., EARDLEY, I. & MORRISON, J. F. 2000. Impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation by glycosylated human haemoglobin. *BJU Int*, 85, 735-41.
- CHITALEY, K., KUPELIAN, V., SUBAK, L. & WESSELLS, H. 2009. Diabetes, obesity and erectile dysfunction: field overview and research priorities. *J Urol*, 182, S45-50.
- DE ANGELIS, L., MARFELLA, M. A., SINISCALCHI, M., MARINO, L., NAPPO, F., GIUGLIANO, F., DE LUCIA, D. & GIUGLIANO, D. 2001. Erectile and endothelial dysfunction in Type II diabetes: a possible link. *Diabetologia*, 44, 1155-60.
- DE YOUNG, L., YU, D., BATEMAN, R. M. & BROCK, G. B. 2004. Oxidative stress and antioxidant therapy: their impact in diabetes-associated erectile dysfunction. *J Androl*, 25, 830-6.
- DI SIMPLICIO, P., FRANCONI, F., FROSALI, S. & DI GIUSEPPE, D. 2003. Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids*, 25, 323-39.
- DUNCAN, M. W. 2003. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*, 25, 351-61.
- ERCAL, N., YANG, P. & AYKIN, N. 2001. Determination of biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by ThioGlo maleimide reagents. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 753, 287-92.
- EVANS, P., KAUR, H., MITCHINSON, M. J. & HALLIWELL, B. 1996. Do human atherosclerotic lesions contain nitrotyrosine? *Biochem Biophys Res Commun*, 226, 346-51.
- FAN, Q., CHEN, M., FANG, X., LAU, W. B., XUE, L., ZHAO, L., ZHANG, H., LIANG, Y. H., BAI, X., NIU, H. Y., YE, J., CHEN, Q., YANG, X. & LIU, M. 2012. Aging might augment reactive oxygen species (ROS) formation and affect reactive nitrogen species (RNS) level after myocardial

- ischemia/reperfusion in both humans and rats. *Age (Dordr)*.
- FERRINI, M. G., RIVERA, S., MOON, J., VERNET, D., RAJFER, J. & GONZALEZ-CADAVID, N. F. 2010. The genetic inactivation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) intensifies fibrosis and oxidative stress in the penile corpora cavernosa in type 1 diabetes. *J Sex Med*, 7, 3033-44.
- FONSECA, V. & JAWA, A. 2005. Endothelial and erectile dysfunction, diabetes mellitus, and the metabolic syndrome: common pathways and treatments? *Am J Cardiol*, 96, 13M-18M.
- GAMIDOV, S. I., IREMASHVILI, V. V. & NOSIKOV, V. V. 2011. [The role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in development of erectile dysfunction in patients with metabolic syndrome]. *Urologiia*, 34-7.
- GIUSTARINI, D., DALLE-DONNE, I., COLOMBO, R., MILZANI, A. & ROSSI, R. 2003. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic Biol Med*, 35, 1365-72.
- GIUSTARINI, D., DALLE-DONNE, I., MILZANI, A. & ROSSI, R. 2011. Detection of glutathione in whole blood after stabilization with N-ethylmaleimide. *Anal Biochem*, 415, 81-3.
- GOW, A. J., FARKOUH, C. R., MUNSON, D. A., POSENCHEG, M. A. & ISCHIROPOULOS, H. 2004. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287, L262-8.
- GUTOWICZ, M., KAZMIERCZAK, B. & BARANCZYK-KUZMA, A. 2011. The influence of heroin abuse on glutathione-dependent enzymes in human brain. *Drug Alcohol Depend*, 113, 8-12.
- HATZIMOURATIDIS, K., AMAR, E., EARDLEY, I., GIULIANO, F., HATZICHRISTOU, D., MONTORSI, F., VARDI, Y. & WESPES, E. 2010. Guidelines on male sexual dysfunction: erectile dysfunction and premature ejaculation. *Eur Urol*, 57, 804-14.
- HELLOU, J., ROSS, N. W. & MOON, T. W. 2012. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environ Sci Pollut Res Int*, 19, 2007-23.
- HENSLEY, K., MAIDT, M. L., YU, Z., SANG, H., MARKESBERY, W. R. & FLOYD, R. A. 1998. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci*, 18, 8126-32.
- HERCE-PAGLIAI, C., KOTECHA, S. & SHUKER, D. E. 1998. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide*, 2, 324-36.
- HORVATH, E. M., MAGENHEIM, R., KUGLER, E., VACZ, G., SZIGETHY, A., LEVARDI, F., KOLLAI, M., SZABO, C. & LACZA, Z. 2009. Nitrate stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in healthy and gestational diabetic pregnancies. *Diabetologia*, 52, 1935-43.
- HOSSAINI, A. M., ZAMRRONI, I. M., KASHEM, R. A. & KHAN, Z. F. 2008. Polymorphism of glutathione S-transferases as genetic risk factors for the development of complications in type 2 diabetes mellitus. *J Crit Care*, 23, 444-8.
- HUANG, Y. Q., RUAN, G. D., LIU, J. Q., GAO, Q. & FENG, Y. Q. 2011. Use of isotope differential derivatization for simultaneous determination of thiols and oxidized thiols by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 416, 159-66.
- ISOBE, C., ABE, T. & TERAYAMA, Y. 2009. Remarkable increase in 3-nitrotyrosine in the cerebrospinal fluid in patients with lacunar stroke. *Brain Res*, 1305, 132-6.
- JAISWAL, M., LARUSSO, N. F., BURGART, L. J. & GORES, G. J. 2000. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res*, 60, 184-90.
- JI, A. J., SAUNDERS, J. P., WADGAONKAR, N. D., PETERSEN, P. J., O'LEARY, K., MCWILLIAMS, W. E., AMORUSI, P., LEAL, M. & FLUHLER, E. N. 2007. A novel antibiotic bone assay by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for quantitation of tigecycline in rat bone. *J Pharm Biomed Anal*, 44, 970-9.
- JIAAN, D. B., SEFTEL, A. D., FOGARTY, J., HAMPEL, N., CRUZ, W., POMERANTZ, J., ZUIK, M. & MONNIER, V. M. 1995. Age-related increase in an advanced glycation end product in penile tissue. *World J Urol*, 13, 369-75.
- JIALAL, I., DEVARAJ, S., ADAMS-HUET, B., CHEN, X. & KAUR, H. 2012. Increased cellular and circulating biomarkers of oxidative stress in nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, E1844-50.
- JIN, H., WEBB-ROBERTSON, B. J., PETERSON, E. S., TAN, R., BIGELOW, D. J., SCHOLAND, M. B., HOIDAL, J. R., POUNDS, J. G. & ZANGAR, R. C. 2011. Smoking, COPD, and 3-nitrotyrosine levels of plasma proteins. *Environ Health Perspect*, 119, 1314-20.
- JONES, D. P., CARLSON, J. L., MODY, V. C., CAI, J., LYNN, M. J. & STERNBERG, P. 2000. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med*, 28, 625-35.
- JONES, D. P., CARLSON, J. L., SAMIEC, P. S., STERNBERG, P., JR., MODY, V. C., JR., REED, R. L. & BROWN, L. A. 1998. Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection,

- storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clin Chim Acta*, 275, 175-84.
- JONES, D. P., MODY, V. C., JR., CARLSON, J. L., LYNN, M. J. & STERNBERG, P., JR. 2002. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med*, 33, 1290-300.
- JONES, L. H. 2012. Chemistry and biology of biomolecule nitration. *Chem Biol*, 19, 1086-92.
- KAMISAKI, Y., WADA, K., NAKAMOTO, K., KISHIMOTO, Y., KITANO, M. & ITOH, T. 1996. Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 685, 343-7.
- KAUR, H. & HALLIWELL, B. 1994. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*, 350, 9-12.
- KENNON, B. & CONNELL, J. M. 2000. ACE gene polymorphism and diabetic complications: is there a connection? *BioDrugs*, 14, 73-81.
- KHAN, M., DIXIT, K., MOINUDDIN, MALIK, A. & ALAM, K. 2012. Role of peroxynitrite-modified H2A histone in the induction and progression of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*.
- KIMURA, M., RABBANI, Z. N., ZODDA, A. R., YAN, H., JACKSON, I. L., POLASCIK, T. J., DONATUCCI, C. F., MOUL, J. W., VUJASKOVIC, Z. & KOONTZ, B. F. 2012. Role of oxidative stress in a rat model of radiation-induced erectile dysfunction. *J Sex Med*, 9, 1535-49.
- KITANO, S., YOSHIDA, Y., KAWANO, K., HIBI, N. & NIKI, E. 2007. Oxidative status of human low density lipoprotein isolated by anion-exchange high-performance liquid chromatography--assessment by total hydroxyoctadecadienoic acid, 7-hydroxycholesterol, and 8-iso-prostaglandin F(2alpha). *Anal Chim Acta*, 585, 86-93.
- KOMATSU, H. & OBATA, F. 2003. An optimized method for determination of intracellular glutathione in mouse macrophage cultures by fluorimetric high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 17, 345-50.
- KOVINA, M., VIRYASOV, M., BARATOVA, L. & KOCHETOV, G. 1996. Localization of reactive tyrosine residues of baker's yeast transketolase. *FEBS Lett*, 392, 293-4.
- KUSMIEREK, K., CHWATKO, G., GLOWACKI, R. & BALD, E. 2009. Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877, 3300-8.
- LEE, M. 2011. Focus on phosphodiesterase inhibitors for the treatment of erectile dysfunction in older men. *Clin Ther*, 33, 1590-608.
- LEVINE, L. A. 2000. Erectile dysfunction: a review of a common problem in rapid evolution. *Prim Care Update Ob Gyns*, 7, 124-129.
- LIPPI, G., PLEBANI, M., MONTAGNANA, M. & CERVELLIN, G. 2012. Biochemical and genetic markers of erectile dysfunction. *Adv Clin Chem*, 57, 139-62.
- LIU, Y. & HE, R. 2010. Fasting induces a high level of 3-nitrotyrosine in the brain of rats. *Neurosci Lett*, 472, 204-9.
- LOPUSHNYAN, N. A. & CHITALEY, K. 2012. Genetics of erectile dysfunction. *J Urol*, 188, 1676-83.
- MACMILLAN-CROW, L. A., CROW, J. P., KERBY, J. D., BECKMAN, J. S. & THOMPSON, J. A. 1996. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11853-8.
- MANDAL, P. K., TRIPATHI, M. & SUGUNAN, S. 2012. Brain oxidative stress: detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 417, 43-8.
- MONOSTORI, P., WITTMANN, G., KARG, E. & TURI, S. 2009. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877, 3331-46.
- MOREIRA, E. D., JR., BESTANE, W. J., BARTOLO, E. B. & FITTIPALDI, J. A. 2002. Prevalence and determinants of erectile dysfunction in Santos, southeastern Brazil. *Sao Paulo Med J*, 120, 49-54.
- MOSLEY, R. L., BENNER, E. J., KADIU, I., THOMAS, M., BOSKA, M. D., HASAN, K., LAURIE, C. & GENDELMAN, H. E. 2006. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Clin Neurosci Res*, 6, 261-281.
- MURATA, M. & KAWANISHI, S. 2004. Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*, 316, 123-8.
- NEBOT, C., GIBB, S. W. & BOYD, K. G. 2007. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 598, 87-94.

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

- NETO, F., & NUNES D. 2003. Cromatografia Princípio básicos e Técnicas afins. *Ed Interciência*, Rio de Janeiro, 49-53.
- NETTER, F. H. Atlas of Human Anatomy. 2006. 4th ed, *Saunders Elsevier*, Philadelphia, 381-2.
- OLIVENZA, R., MORO, M. A., LIZASOAIN, I., LORENZO, P., FERNANDEZ, A. P., RODRIGO, J., BOSCA, L. & LEZA, J. C. 2000. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem*, 74, 785-91.
- PACHER, P., BECKMAN, J. S. & LIAUDET, L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87, 315-424.
- PASTORE, A., FEDERICI, G., BERTINI, E. & PIEMONTE, F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 333, 19-39.
- PERDIGAO, C., RABACAL, C. & GIL, V. M. 2008. Consensus meeting on erectile dysfunction: erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Rev Port Cardiol*, 27, 115-26.
- PHE, V. & ROUPRET, M. 2012. Erectile dysfunction and diabetes: a review of the current evidence-based medicine and a synthesis of the main available therapies. *Diabetes Metab*, 38, 1-13.
- POCERNICH, C. B., SULTANA, R., MOHMMAD-ABDUL, H., NATH, A. & BUTTERFIELD, D. A. 2005. HIV-dementia, Tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic considerations. *Brain Res Brain Res Rev*, 50, 14-26.
- RAHMAN, I., KODE, A. & BISWAS, S. K. 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, 1, 3159-65.
- RIGAT, B., HUBERT, C., ALHENC-GELAS, F., CAMBIEN, F., CORVOL, P. & SOUBRIER, F. 1990. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 86, 1343-6.
- ROGERS, L. K., BATES, C. M., WELTY, S. E. & SMITH, C. V. 2006. Diquat induces renal proximal tubule injury in glutathione reductase-deficient mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 217, 289-98.
- SAFARINEJAD, M. R. 2004. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction in diabetic men: a randomized double-blind and placebo-controlled study. *J Diabetes Complications*, 18, 205-10.
- SCHOPFER, F. J., BAKER, P. R. & FREEMAN, B. A. 2003. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci*, 28, 646-54.
- SEFTEL, A. D., VIOLA, K. A., KASNER, S. E. & GANZ, M. B. 1996. Nitric oxide relaxes rabbit corpus cavernosum smooth muscle via a potassium-conductive pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 219, 382-7.
- SHI, G. X., LIU, C. Z., WANG, L. P., GUAN, L. P. & LI, S. Q. 2012. Biomarkers of oxidative stress in vascular dementia patients. *Can J Neurol Sci*, 39, 65-8.
- SHIGENAGA, M. K., LEE, H. H., BLOUNT, B. C., CHRISTEN, S., SHIGENO, E. T., YIP, H. & AMES, B. N. 1997. Inflammation and NO(X)-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3211-6.
- SILVA A. L., Associação entre o polimorfismo I/D da ECA da Diabetes mellitus tipo 2: estudo da população portuguesa. 2011. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde. ESTSP. Porto.
- STONE, D. K., KIYOTA, T., MOSLEY, R. L. & GENDELMAN, H. E. 2012. A model of nitric oxide induced alpha-synuclein misfolding in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 523, 167-73.
- STRANGE, R. C., SPITERI, M. A., RAMACHANDRAN, S. & FRYER, A. A. 2001. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res*, 482, 21-6.
- TELES, A. G., CARREIRA, M., ALARCAO, V., SOCIOL, D., ARAGUES, J. M., LOPES, L., MASCARENHAS, M. & COSTA, J. G. 2008. Prevalence, severity, and risk factors for erectile dysfunction in a representative sample of 3,548 portuguese men aged 40 to 69 years attending primary healthcare centers: results of the Portuguese erectile dysfunction study. *J Sex Med*, 5, 1317-24.
- THORVE, V. S., KSHIRSAGAR, A. D., VYAWAHARE, N. S., JOSHI, V. S., INGALE, K. G. & MOHITE, R. J. 2011. Diabetes-induced erectile dysfunction: epidemiology, pathophysiology and management. *J Diabetes Complications*, 25, 129-36.
- TOHGI, H., ABE, T., YAMAZAKI, K., MURATA, T., ISHIZAKI, E. & ISOBE, C. 1999. Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 269, 52-4.
- TOWNSEND, D. M. & TEW, K. D. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22, 7369-75.
- TRUSSELL, J. C. & LEGRO, R. S. 2007. Erectile dysfunction: does insulin resistance play a part? *Fertil Steril*, 88, 771-8.
- VALLES-ANTUNA, C., FERNANDEZ-GOMEZ, J. & FERNANDEZ-GONZALEZ, F. 2011. Peripheral neuropathy: an underdiagnosed cause of erectile dysfunction. *BJU Int*, 108, 1855-9.
- VENDEIRA, P., PEREIRA, N., TOMADA, N., & LAFUENTE-DE-CARVALHO, J. 2011. Estudo EPISEX-

Avaliação do stress oxidativo na disfunção erétil

- PT/Masculino: prevalência das disfunções sexuais masculinas em Portugal. *Cadernos Sexologia*, 4, 15-22.
- VERNET, D., CAI, L., GARBAN, H., BABBITT, M. L., MURRAY, F. T., RAJFER, J. & GONZALEZ-CADAVID, N. F. 1995. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology*, 136, 5709-17.
- VIERA, L., YE, Y. Z., ESTEVEZ, A. G. & BECKMAN, J. S. 1999. Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine. *Methods Enzymol*, 301, 373-81.
- WANG, W. 2011. [Psychological factors involved in erectile dysfunction]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 17, 1146-51.
- WANG, X., CHI, D., SONG, D., SU, G., LI, L. & SHAO, L. 2012. Quantification of glutathione in plasma samples by HPLC using 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan as a fluorescent labeling reagent. *J Chromatogr Sci*, 50, 119-22.
- WANG, X. L., RAINWATER, D. L., LEONE, A. & MAHANEY, M. C. 2004. Effects of diabetes on plasma nitrotyrosine levels. *Diabet Med*, 21, 577-80.
- WESSELLS, H., PENSON, D. F., CLEARY, P., RUTLEDGE, B. N., LACHIN, J. M., MCVARY, K. T., SCHADE, D. S. & SARMA, A. V. 2011. Effect of intensive glycemic therapy on erectile function in men with type 1 diabetes. *J Urol*, 185, 1828-34.
- WINYARD, P. G., MOODY, C. J. & JACOB, C. 2005. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci*, 30, 453-61.
- YANG, H., ZHANG, Y. & POSCHL, U. 2010. Quantification of nitrotyrosine in nitrated proteins. *Anal Bioanal Chem*, 397, 879-86.
- YAP, L. P., SANCHETI, H., YBANEZ, M. D., GARCIA, J., CADENAS, E. & HAN, D. 2010. Determination of GSH, GSSG, and GSNO using HPLC with electrochemical detection. *Methods Enzymol*, 473, 137-47.
- YILMAZ, O., KESER, S., TUZKU, M., GUVENC, M., CETINTAS, B., IRTEGUN, S., TASTAN., H., & SAHIN, K. 2009. A practical HPLC method to measure reducer (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations. *J Animal Vet Advanc*, 8, 343-7.
- ZHANG, W., WAN, F., ZHU, W., XU, H., YE, X., CHENG, R. & JIN, L. T. 2005. Determination of glutathione and glutathione disulfide in hepatocytes by liquid chromatography with an electrode modified with functionalized carbon nanotubes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 818, 227-32.
- ZHANG, W. Z., LANG, C. & KAYE, D. M. 2007. Determination of plasma free 3-nitrotyrosine and tyrosine by reversed-phase liquid chromatography with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan derivatization. *Biomed Chromatogr*, 21, 273-8.