

Curso temporal de la concentración de S-nitroso-hemoglobina

en paquetes globulares almacenados para transfusión sanguínea

Palabras clave: Eritrocitos, óxido nítrico, paquete globular, S-nitroso hemoglobina, transfusión sanguínea.

Key words: Blood transfusions, erythrocytes, globular package, nitric oxide, S-nitrosohemoglobin.

Recibido: 18/12/2007
Aceptado: 04/01/2008

José Gutiérrez-Salinas,* Leticia Cruz-Tovar,* Sergio García-Méndez**

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” (CMN-20N), ISSSTE.

** Banco de Sangre, CMN-20N, ISSSTE.

Correspondencia:

Dr. José Gutiérrez Salinas,
Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental,
División de Investigación Biomédica,
Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE,
San Lorenzo Núm. 502, 2º piso, Col. Del Valle,
03100, México, D.F.
Tel.: 5200-5003, ext. 14603
Fax: 5559-3256.
E-mail: quauhtlicutli@yahoo.com

65

Resumen

El almacenamiento de paquetes globulares puede producir metabolitos tóxicos para el individuo que lo recibe. Algunos de esos metabolitos pueden ser derivados del óxido nítrico los cuales se unen a la hemoglobina y forman S-nitroso-hemoglobina. La S-nitroso-hemoglobina tiene menos afinidad por el oxígeno, por lo que su presencia puede implicar daño en el individuo que lo recibe. **Objetivo:** Determinar la concentración de S-nitroso-hemoglobina en paquetes globulares preservados hasta por 30 días. **Material y métodos:** Diez paquetes globulares obtenidos del banco de sangre de nuestra institución fueron elegidos para este estudio. Se tomaron muestras de cada paquete globular consecutivamente hasta por 30 días y se determinó la concentración de S-nitrosohemoglobina presente en los eritrocitos. **Resultados:** Los resultados muestran que existe un incremento importante

Abstract

Storage of blood bags can produce toxic metabolites that can damage the receptor that receives it. Some of these toxic metabolites are from nitric oxide as can react with hemoglobin to form S-nitrosohemoglobin. Lower oxygen affinity is developed by S-nitrosohemoglobin thus a damage to human receptor is possible. **Objective:** Our objective was to determine the concentration of S-nitrosohemoglobin in blood bags storage by 30 days. **Material and methods:** Ten globular packages were chosen following the routine procedures of the blood bank of our institution. Samples of each package were obtained daily for five days and every five days until 30 days. Concentration of S-nitrosohemoglobin was determined on erythrocytes. **Results:** An important increment was shown in the concentration of S-nitrosohemoglobin along the time in the erythrocytes from globular packages.

en la concentración de S-nitroso-hemoglobina a lo largo del tiempo en los eritrocitos obtenidos de los paquetes globulares. **Conclusiones:** El incremento en la concentración de S-nitroso-hemoglobina en los paquetes globulares, puede ser un factor que provoque reacciones adversas en el paciente que recibe una transfusión sanguínea.

Conclusions: The increment in the concentration of S-nitrosohemoglobin in the globular packages it can be a factor that produces adverse reactions in the patient that receives a blood transfusion.

Introducción

La transfusión de eritrocitos se lleva a cabo para mantener una adecuada oxigenación de los tejidos en el receptor y así aumentar su supervivencia ante un evento patológico determinado. Dicho procedimiento es un recurso terapéutico muy extendido para el tratamiento de enfermedades cronicodegenerativas (como es el caso de las leucemias); así como en cirugías mayores (cardiaca y grandes vasos) o en situaciones de emergencia con pérdida importante de sangre (accidentes).¹⁻⁶

Sin embargo, a pesar de sus ventajas y potencial terapéutico, la transfusión de paquetes globulares puede representar un gran riesgo para la salud del receptor ya que éste puede presentar reacciones adversas de tipo inmunológico, infeccioso o metabólico que pueden incluso, causarle la muerte.¹⁻⁶

En la actualidad, los bancos de sangre de todo el mundo realizan pruebas para detectar un número importante de agentes infecciosos en los paquetes globulares destinados para transfusión, lo que minimiza el riesgo para el sujeto que lo recibe; sin embargo, poco se ha hecho para la detección de agentes no infecciosos y que, por su naturaleza, pueden afectar el metabolismo general del paciente que es transfundido. Así, ha sido reportado que un paquete globular puede contener elementos tóxicos y/o dañinos para el receptor que pueden provenir directamente del donante (citocinas, exceso de potasio, etcétera) o ser originados durante el proceso de almacenamiento, en donde los productos o subproductos del metabolismo normal del eritrocito tienden a acumularse y pueden ser una fuente de metaboli-

tos tóxicos para el receptor. En este último caso, se ha reportado en paquetes globulares la presencia de proteínas leucocitarias, factores de crecimiento, así como productos de la lipoperoxidación lipídica (que denotan la acción de radicales libres derivados del oxígeno).⁷⁻¹⁰ Además, se ha reportado que a lo largo del tiempo de almacenamiento, los paquetes globulares presentan un incremento en la concentración de potasio libre y de lactato, lo que sugiere que, a pesar de la baja temperatura de almacenamiento del paquete global, los eritrocitos contenidos en él no dejan de tener un metabolismo activo.¹¹⁻¹³

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha reportado que existe un incremento a lo largo del tiempo de almacenamiento en la concentración de nitratos y metahemoglobina en paquetes globulares almacenados en el banco de sangre hasta por 30 días.¹⁴ Este incremento en la concentración de nitratos puede ser causa de alteraciones en el organismo del receptor de dicho paquete global. El efecto de los nitratos sobre los mecanismos homeostáticos en el ser humano es bastante conocida.¹⁵⁻¹⁷

El óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés para *nitric oxide*) es un metabolito originalmente descubierto como producto del metabolismo de las células epiteliales de los vasos sanguíneos; sin embargo, ha sido implicado en diversos mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos en el ser humano, lo que le confiere una gran actividad metabólica al regular procesos como la coagulación, la respuesta inmunológica de los leucocitos, el proceso de regulación del tono de las vías aéreas, así como en procesos cardiocirculatorios, cardiopulmonares y cardiorrenales.¹⁵⁻¹⁹

Por otro lado, ha sido descrito que el NO que se forma en los epitelios vasculares puede atravesar la membrana celular del eritrocito y combinar con la oxihemoglobina, formando un compuesto nitrosilado llamado S-nitroso-hemoglobina (S-nitroso-Hb), la cual es una molécula de hemoglobina que ha sido nitrosada en su cisteína 93.²⁰⁻²³ La S-nitroso-Hb una vez formada dentro del eritrocito es un compuesto que presenta una afinidad menor por el oxígeno, lo que puede provocar menor oxigenación de los tejidos; sin embargo, la S-nitroso-Hb es una molécula inestable que, bajo ciertas condiciones de hipoxia, puede liberar NO al medio ambiente, lo que provocaría incremento de esta molécula activa con sus consecuentes alteraciones metabólicas locales y/o generales en el organismo.²⁰⁻²³ Por otro lado, ha sido descrito que el eritrocito es el mayor reservorio de NO, nitratos y nitritos en la sangre humana debido a que la hemoglobina que posee actúa como catalizador de las reacciones espontáneas que producen a dichos metabolitos.²⁴

Como se mencionó con anterioridad, nuestro grupo de trabajo ha descrito¹⁴ que existe acumulación de nitratos y metahemoglobina en los paquetes globulares almacenados bajo condiciones estándar que se manejan en un banco de sangre y puesto que dichos paquetes globulares pueden ser una fuente potencial de S-nitroso-Hb para el paciente que lo recibe, el objetivo del presente trabajo fue monitorear la concentración de dicho metabolito en paquetes globulares preservados en un banco de sangre por treinta días.

Material y métodos

Obtención de muestras. Se obtuvieron paquetes globulares por venopunción (aproximadamente 400 mL) de 10 sujetos masculinos (27.5 ± 7.5 años de edad), aparentemente sanos, que acudieron como donadores voluntarios al Banco de Sangre de nuestra institución utilizando el protocolo ya establecido en el mismo. La sangre fue colec-

tada en el sistema de bolsas cuádruples de Baxter (Baxter-Fenwal; Unidad Bolsag con CPD/ADSOL, Opti-System PL-146). Previa centrifugación de la sangre total, el paquete eritrocitario fue aislado del plasma y del buffy coat (paquete leucocitario) por medio del sistema Opti-press (Baxter-Fenwal). Los paquetes globulares así obtenidos fueron almacenados y mantenidos en refrigeración ($1-6^{\circ}\text{C}$) bajo las condiciones en que normalmente se encuentran en el banco de sangre, durante todo el tiempo que duró nuestra observación. Todos los procedimientos fueron realizados acorde a normas y procedimientos establecidos para el manejo de muestras sanguíneas en el banco de sangre de nuestra institución, tal como fueron descritas previamente.¹⁴

Diseño experimental. Los paquetes globulares fueron puncionados por una de sus salidas con jeringa de plástico bajo condiciones estériles para aspirar una muestra (5 mL) de eritrocitos. Una vez tomada la muestra, la bolsa fue sellada para mantener la esterilidad del sistema. La toma de muestras de eritrocitos se llevó a cabo en el momento de ser preparados los paquetes globulares (tiempo cero) y cada día por cinco días consecutivos, y posteriormente cada cinco días hasta por treinta días totales. Las muestras de eritrocitos así obtenidas fueron procesadas el mismo día de su obtención de acuerdo con los procedimientos descritos por Gutiérrez y colaboradores,²⁵ como se describe a continuación: la muestra de eritrocitos fue colocada en un tubo de vidrio y centrifugada a 1,500 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos. Al término de la centrifugación, el sobrenadante fue retirado agregándose a los eritrocitos tres volúmenes de solución salina isotónica con amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7) frío. Los eritrocitos fueron agitados hasta resuspenderlos totalmente y fueron centrifugados nuevamente bajo las condiciones previamente descritas. Los eritrocitos fueron lavados dos veces y se dejaron a un hematocrito de 50% en PBS para su uso posterior.

Determinación de S-nitroso-Hb. Todos los reactivos químicos fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemical St. Louis, USA), de Merck (Merck de México, SA) o de Mallinckrot (Mallinckrot de México, SA) de grado analítico y de la mejor calidad posible. Se determinó la concentración de S-nitroso-hemoglobina (S-nitroso-Hb) en los eritrocitos de acuerdo a la técnica reportada por Wolz y colaboradores.²⁶ Brevemente, se procedió como sigue: Una muestra de eritrocitos fue lisada, agregando dos volúmenes de agua bidestilada e incubándolos por diez minutos a 4 °C. Al término de la incubación, la muestra fue centrifugada a 10,000 rpm por 10 minutos en microcentrifuga (Hettich, Mod. EBA-12-R, Zurich, Germ.). El sobrenadante fue recuperado y se mezcló con un volumen de sulfato de amonio (0.1% en HCl al 0.4 N). La mezcla fue nuevamente centrifugada como ya fue descrito en líneas anteriores y el sobrenadante fue recuperado. A un volumen del sobrenadante resultante del paso anterior se le agregó un volumen de sulfanilamida (3%) y HgCl_2 (0.25% p/v en HCl al 0.4 N) de acuerdo con la técnica reportada por Cortas y Wakid²⁷ modificada por Sun.²⁸ La mezcla fue agitada por un minuto y se le agregó un volumen de N-naptiletilendiamina (0.1% p/v en HCl al 0.4 N). La muestra fue agitada e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, al término de los cuales fue leída en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal., USA) a 540 nm. La concentración de S-nitroso-Hb fue estimada con base en una curva patrón hecha con cantidades crecientes de NaNO_3 , reportando la concentración de S-nitroso-Hb en μM de acuerdo a lo descrito por Wolz y colaboradores.²⁶

Análisis estadístico. Los resultados se expresan como promedios \pm error estándar de 10 muestras (paquetes globulares) independientes realizando al menos tres determinaciones por muestra por punción. Los resultados fueron analizados usando el programa estadístico GraphPad Prism V-4.00 (GraphPad Software, San Diego,

Cal., USA), usando la prueba t de Student y tomando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

La figura 1 muestra el curso temporal de la concentración de S-nitroso-Hb en los eritrocitos de los paquetes globulares preservados durante los primeros cinco días posteriores a su obtención.

Como puede observarse, la concentración de S-nitroso-Hb en los eritrocitos presenta un aumento sostenido durante los primeros cinco días de almacenamiento; este aumento fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) a partir del tercer día de almacenamiento en comparación con el tiempo cero. En promedio, este incremento respecto al tiempo cero fue de 63.43% al tercer día de almacenamiento, de 109.13% al cuarto día y de 128.13% al quinto día (figura 1).

Por otro lado, la figura 2 muestra el curso temporal de la concentración de S-nitroso-Hb, en

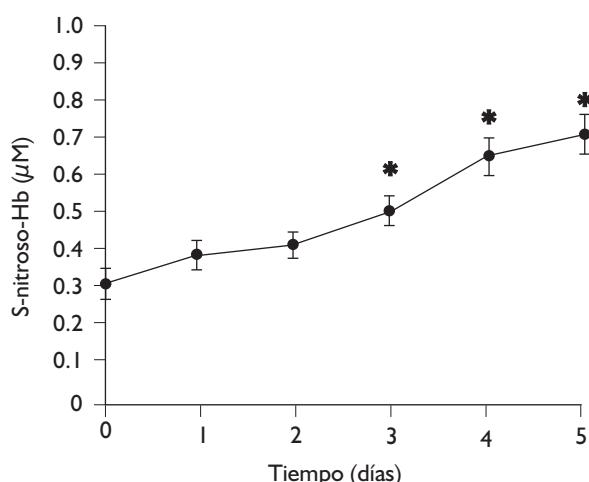


Figura 1. Curso temporal de la concentración de S-nitroso-Hb en eritrocitos provenientes de paquetes globulares almacenados por cinco días en condiciones estándar del banco de sangre. La concentración de S-nitroso-Hb está expresada en μM y cada resultado como promedio \pm el error estándar de 10 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. * $p < 0.05$ vs tiempo cero.

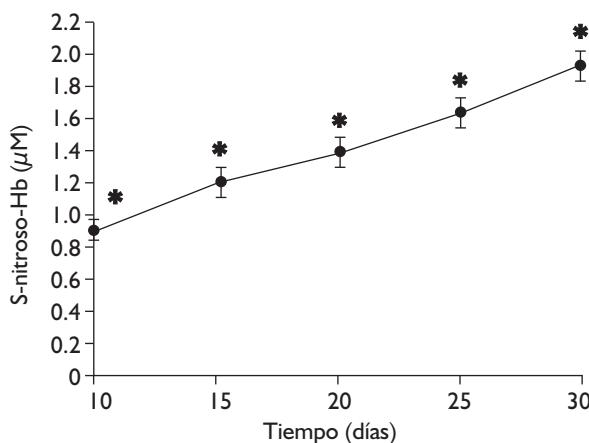


Figura 2. Curso temporal de la concentración de S-nitroso-Hb en eritrocitos provenientes de los paquetes globulares mostrados en la *figura 1* a partir de los 10 días de almacenados y hasta por treinta días en condiciones estándar del banco de sangre. La concentración de S-nitroso-Hb está expresada en μM y cada resultado como promedio \pm el error estándar de 10 muestras independientes y al menos tres determinaciones por muestra. * $p < 0.05$ vs tiempo cero.

periodos de cinco días, a partir del día 10 hasta el día 30 de almacenamiento, bajo las condiciones de observación ya descritas. Como se puede observar, el perfil de incremento en la concentración de S-nitroso-Hb en los eritrocitos mostrada durante los primeros cinco días de almacenamiento del paquete globular se mantiene a lo largo de los 30 días que duró el estudio. Este incremento se presenta en forma gradual conforme pasa el tiempo de almacenamiento y llega a ser de hasta 503% sobre la concentración encontrada en el tiempo cero (1.93 ± 0.093 versus $0.32 \pm 0.03 \mu\text{M}$, respectivamente; $p < 0.001$) a los 30 días de almacenamiento.

Discusión

La transfusión de paquetes globulares obtenidos a partir de donadores aparentemente sanos es un medio de tratamiento muy utilizado en diversas patologías clínicas y quirúrgicas que comprometen el estado de salud del paciente.¹⁻⁶

Sin embargo, su uso puede representar un riesgo para la salud del individuo transfundido, ya que un paquete globular que es almacenado en un banco de sangre presenta un deterioro normal originado del metabolismo del eritrocito, aun cuando éste se encuentra a bajas temperaturas.¹³ De esta forma, aunque ciertos elementos que representan un riesgo directo para la salud del individuo pueden ser detectados (por ejemplo los virus, los anticuerpos y los grupos sanguíneos), no todas las sustancias contenidas en un paquete globular pueden ser detectadas y neutralizadas. Entre estas últimas se encuentran fragmentos de hemoglobina y de membrana eritrocitaria, lipoperóxidos, incremento en calcio, sodio y potasio extraeritrocitarios y acumulación de ácido láctico entre otras muchas cosas más.^{4,7-13}

Al igual que todas las sustancias anteriores, los metabolitos derivados del NO pueden estar presentes en los eritrocitos de los sujetos que sirven como donantes de sangre. De acuerdo con reportes recientes, el NO puede reaccionar espontáneamente con la hemoglobina dentro del eritrocito, formando S-nitroso-Hb; el NO se acumula en esta célula y representa una fuente potencial de NO en el torrente circulatorio que a su vez puede ser liberado espontáneamente de la S-nitroso-Hb y, de esta forma, incrementar su concentración en el torrente circulatorio.^{20-24,29,30}

En condiciones normales, la concentración de S-nitroso-Hb presente en los eritrocitos está en el rango de 30 a $40 \mu\text{M}$,²²⁻³⁰ pero se ha descrito que, bajo condiciones de hipoxia tisular o *in vitro*, esta concentración puede incrementarse hasta en 50%, originando constrictión de las arterias de mediano y grueso calibre.^{29,30} De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la concentración de S-nitroso-Hb en el tiempo cero en los paquetes globulares es de $32.3 \mu\text{M}$ en promedio, lo que coincide con lo reportado previamente.^{16,22-24,29,30} Conforme aumenta el tiempo de almacenamiento de los paquetes globulares, la concentración de S-nitroso-Hb se incrementa

gradualmente llegando a ser mayor a 500% a los 30 días de almacenamiento (figura 2).

Esta gradual acumulación de S-nitroso-Hb en los eritrocitos contenidos en los paquetes globulares puede ser en parte producida por la reacción espontánea del grupo hemo de la hemoglobina con el NO previamente acumulado en los eritrocitos del sujeto donante.²⁰⁻²⁴ También se ha descrito que los eritrocitos *in vitro* muestran producción espontánea de NO, la cual se piensa es el producto de la reacción espontánea de la liberación de radicales libres derivados del oxígeno, cuando la oxihemoglobina presente en estas células libera al oxígeno que contiene. Este oxígeno liberado de forma espontánea es capaz de reaccionar con los compuestos de nitrato y nitrito presentes en el medio ambiente y producir al NO, el cual reaccionaría con la hemoglobina formando S-nitroso-Hb.^{20-24,29-34} Puesto que todas las reacciones descritas anteriormente se realizan de manera espontánea, el factor limitante es la disposición de oxihemoglobina en el medio que, en un paquete globular, puede alcanzar altas concentraciones.

A pesar de lo anteriormente descrito, el origen exacto de la acumulación de S-nitroso-Hb en los paquetes globulares a lo largo del tiempo debe ser investigada. Este metabolito puede estar presente en grandes cantidades en un paquete globular destinado a la transfusión y representar un alto riesgo porque, al ser una fuente potencial de NO, puede liberarlo en la circulación del receptor y ocasionar alteraciones generales relacionadas con los procesos fisiológicos normales del individuo.

Conclusiones

La transfusión de paquetes globulares que han sido almacenados por más de cinco días puede contener una cantidad importante de S-nitroso-Hb, lo que involucra un riesgo para el sujeto que lo reciba. La generación espontánea de S-nitroso-Hb representa sólo uno de muchos otros

cambios metabólicos que seguramente están llevándose a cabo en un paquete globular que es almacenado por varios días en un banco de sangre. Estas reacciones son el reflejo del metabolismo de los eritrocitos, así como de reacciones químicas y bioquímicas espontáneas llevadas a cabo dentro del paquete globular, por lo que futuras investigaciones deben ser encaminadas a identificar dichos metabolitos y reacciones que pueden comprometer el estado de salud del paciente que lo recibe.

Referencias

1. Barba EJR. Transfusión de sangre y sus componentes: riesgos, beneficios e indicaciones. *Rev Mex Patol Clin* 2004; 51 (2): 97-118.
2. García ERM, Méndez LTIA. Reacciones adversas por transfusión sanguínea en pacientes cardiópatas. *Rev Mex Patol Clin* 2006; 53(3): 139-145.
3. Serrano VX. Hemotransfusión como factor de riesgo en cirugía cardiaca. *Arch Cardiol Mex* 2006; 76 (supl 2): 86-91.
4. Bunn HF, May MH, Kocholaty WF, Shields CE. Hemoglobin function in stored blood. *J Clin Invest* 1969; 48: 311-321.
5. Rodríguez MH. TRALI: daño pulmonar agudo por transfusión. *Rev Med IMSS* 2004; 42 (6): 501-506.
6. Nielsen HJ. Detrimental effects of perioperative blood transfusion. *Bri J Surg* 1995; 82: 582-587.
7. Cint C, Johansen JS, Swko F, Price PA, Nielsen HJ. Accumulation of the neutrophil-derived protein YKL-40 during storage of various blood components. *Inflamm Res* 2001; 50: 107-111.
8. Nielsen HJ, Werther K, Mynster T, Brüner N. Soluble vascular endothelial growth factor in various blood transfusion components. *Transfusion* 1999; 39: 1078-1083.
9. Korgum DK, Bilmen S, Yesilkaya A. Alterations in the erythrocyte antioxidant system of blood stored in blood bags. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 109: 357-363.
10. Deepa DV, Manoj KV, Arun P, Santhosh A. Increase lipid peroxidation of erythrocytes in blood stored in polyvinyl chloride blood storage bags plasticized with di-(2-ethyl hexyl) phthalate and effect of antioxidants. *Vox Sang* 1998; 75 (3): 198-204.
11. Szpisják D, Edgell DS, Bissonnette B. Potassium as a surrogate marker of debris in cell-salvaged blood. *Anesth Analg* 2000; 91: 40-43.
12. Estep TN, Pedersen RA, Miller TJ, Stupar KR. Characterization of erythrocyte quality during the refrigerated storage of whole blood containing di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Blood* 1984; 64: 1270-1276.
13. Sawant RB, Jathar SK, Rajadhyaksha SB, Kadam PT. Red cell hemolysis during processing and storage. *Asian J Transf Sci* 2007; 1: 707-810.
14. Gutiérrez-Salinas J, Cruz-Tovar L, García-Méndez S. Incremento en la concentración de óxido nítrico y meta-hemoglobina en eritrocitos contenidos en bolsas para transfusión sanguínea. *Rev Mex Patol Clin* 2008; 55 (1): 21-28.

15. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53 (4): 503-514.
16. Stankevicius E, Kévelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicine* 2003; 39 (4): 333-341.
17. Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. *J Biomed Biotechnol* 2004; 4: 227-237.
18. Ricciardolo FIM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84: 731-765.
19. Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp Biol Med* 2006; 231: 343-365.
20. Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 697-705.
21. Noble DR, Williams DLH. Nitrosation products from S-nitrosothiols via preliminary nitric oxide formation. *J Chem Soc Perkin Trans* 2002; 2: 1834-1838.
22. Gladwin MT, Schechter AN. NO contest: Nitrite versus S-nitroso-hemoglobin. *Circ Res* 2004; 94: 851-855.
23. Gladwin MT, Wang X, Reiter CD, Yang BK. S-nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks O₂/NO-linked allosteric function. *J Biol Chem* 2002; 277: 27818-27828.
24. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MH, Hsu SS, Machado RF, Gordon SS. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 2005; 106: 734-739.
25. Gutiérrez-Salinas J, Zentella de Piña M, Piña E. Acute ethanol intake produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes. *Biochem Mol Biol Int* 1993; 29: 263-270.
26. Wolz M, MacAllister RJ, Davis D, Feelisch M, Moncada S. Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. *J Biol Chem* 1999; 274: 28983-28990.
27. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 38: 1440-1443.
28. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensor* 2003; 3: 276-284.
29. Crawford JH, White CR, Patel RP. Vasoactivity of S-nitrosohemoglobin: role of oxygen, heme, and NO oxidation states. *Blood* 2003; 101: 4408-4415.
30. Petel RP, Spencer NY, Kalyanaraman B, Matalon S, Darley-Usmar VM. Biochemical characterization of human S-nitrosohemoglobin: effects on oxygen binding and transnitrosation. *J Biol Chem* 1999; 274: 15487-15492.
31. Bunn HF, May MH, Kocholaty WF, Shields CE. Hemoglobin function in stored blood. *J Clin Invest* 1969; 48: 311-321.
32. May JM, Zhi-Chao Q, Xia L, Cobb CE. Nitric uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1946-C1954.
33. Recchia FA, Voger TR, Hintze TH. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H852-H856.
34. Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3566-3571.