



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ FACULDADE DE  
FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA DE MEDICAMENTOS**

**DARCIELLE BRUNA DIAS ELIAS**

**EFICÁCIA DA L-ARGININA COMO FÁRMACO COADJUVANTE NO  
TRATAMENTO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

**FORTALEZA-CE 2014**

**DARCIELLE BRUNA DIAS ELIAS**

**EFICÁCIA DA L-ARGININA COMO FÁRMACO COADJUVANTE  
NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Tese de Doutorado apresentada à  
Pós-Graduação em  
Desenvolvimento e Inovação  
Tecnológica de Medicamentos da  
Universidade Federal do Ceará para  
a Obtenção do Título de Doutor em  
Desenvolvimento e Inovação  
Tecnológica de  
Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia  
Pinheiro Gonçalves Lemes

**FORTALEZA**

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- E41e Elias, Darcielle Bruna Dias.  
Eficácia da l-arginina como fármaco coadjuvante no tratamento de pacientes com anemia falciforme. / Darcielle Bruna Dias Elias. – 2014.  
107 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará; Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos; Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Inovação Tecnológica em Medicamentos. Orientação:  
Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

1. Anemia Falciforme. 2. Hidroxiureia. 3. Arginina. 4. Citocinas. 5. Estresse Oxidativo. I.  
Título.

CDD 616.1527

---

**DARCIELLE BRUNA DIAS ELIAS**

**EFICÁCIA DA L-ARGININA COMO FÁRMACO COADJUVANTE NO  
TRATAMENTO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/ 2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico primeiramente a Deus a concretização de mais este sonho na minha vida.

À minha mãe Francisca por sempre acreditar no meu sucesso e por ter me dado como exemplo de vida, o estudo. Obrigada pelo sorriso e pelo brilho nos olhos a cada conquista.

Ao meu esposo, Isaac, pelo grande companheirismo, compreensão e pelo grande incentivo para que eu nunca deixe de lutar pelos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Bruno e Jônatas, que sempre estão à disposição para me ajudar nas horas mais difíceis.

À minha orientadora, Dra Romélia, pelo grande incentivo a pesquisa, e

por acreditar que tudo ia dá certo,  
quando nem eu mesma acreditava.  
E finalmente, a pessoinha mais  
importante da minha vida, a minha  
filha Isabelle, que me faz buscar  
sempre o melhor de mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A minha orientadora Profa. Dra Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, pelo carinho maternal, que me incentivaram em todas as horas, a dedicação e acima de tudo pela sua preciosa amizade.

A Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho pela receptividade no seu laboratório e pela amizade.

Aos médicos, Dra. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado e Dr. Herivaldo Fereira da Silva, do Hemocentro do Estado do Ceará por acompanhar os pacientes, sempre relevando a importância da pesquisa;

A minha grande e sempre amiga Lilianne Brito da Silva Rocha, pelo grande apoio e incentivo;

À minhas grandes amigas, inicialmente IC, depois mestrandas, que nunca mediram esforços na colaboração deste trabalho, Maritza, Luana, Thalita e Thayna

A todos os meus grandes amigos do laboratório de Hematologia da Universidade Federal do Ceará, Maritza, Thalita, Thayna, Lilianne, Luana, Alano, Izabel, Mauriclécio, Marília e Pedro pela amizade, companheirismo, entusiasmo e alegria.

Aos pacientes, que acreditaram na pesquisa e sem dúvida foram o motivo para o desenvolvimento desse estudo;

A Raimundinha, secretária do curso de Pós-Graduação, pela amizade e atenção dispensada durante a realização deste curso.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

E acima de tudo, a Deus que esteve do meu lado sempre, me dando forças para continuar e vencer mais esse desafio. À ele toda honra, glória e louvou. Obrigada por tantas alegrias.

## SER FELIZ

Ser feliz não é ter um céu sem tempestades, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas,  
relacionamentos sem decepções.

Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo,  
amor nos desencontros.

Ser feliz não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos.

Ser feliz não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato. Ser  
feliz é reconhecer que vale a pena viver a vida, apesar de todos os desafios,  
incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz não é uma fatalidade do destino, mas uma conquista de quem sabe viajar para dentro  
do seu próprio ser.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si e ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz, é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um “não”.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

É beijar os filhos, curtir os pais!

É ter momentos poéticos com os amigos, mesmo que eles nos magoem.

Ser feliz é deixar viver a criança livre, alegre e simples que mora dentro de cada um de nós.

É ter maturidade para falar: “Eu errei”.

É ter ousadia para dizer: “Me perdoe!”

É ter sensibilidade para expressar: “Eu preciso de você”.

É ter capacidade de dizer “Eu te amo”.

E, quando você errar o caminho, recomece tudo de novo. Pois assim você será cada vez mais  
apaixonado pela vida. E descobrirá que...

Ser feliz não é ter uma vida perfeita.

Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância.

Usar as perdas para refinar a paciência.

Usar as falhas para esculpir a serenidade.

Usar a dor para lapidar o prazer.

Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.

(Augusto Cury)

## **RESUMO**

A anemia falciforme (AF) é caracterizada por episódios crônicos de hemólise e crises de vaso-oclusão (CVO), anormalidades de adesão celular, aumento do estresse oxidativo que culminam com danos a órgãos, sendo responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade. O tratamento se baseia principalmente no uso de hidroxiuréia (HU). A HU promove um aumento na produção de hemoglobina fetal (HbF), diminuição da leucometria, redução da hemólise e aumento da utilização da arginina para produção de óxido nítrico (NO), diminuindo o número de eventos vaso-oclusivos, síndrome torácica aguda (STA), transfusões e hospitalizações. Entretanto, a resposta a HU é variável, fato atribuído a múltiplos fatores tais como os moduladores genéticos, como os polimorfismos nos genes BCL11A, que modulam a expressão da HbF. O objetivo foi avaliar o efeito da terapia HU+L-arginina nos parâmetros hematológicos, no estresse oxidativo e no perfil inflamatório, associando à resposta com os polimorfismos no gene BCL11A. Trata-se de um estudo prospectivo de coorte com 19 pacientes com diagnóstico de AF, em tratamento com HU por mais de um ano. A L-arginina foi prescrita na dose de 250mg/dia em associação com a HU, por um período de 12 semanas. As análises foram realizadas antes do uso da HU+L-arginina e com 4, 8 e 12 semanas do uso da associação. Houve aumento das concentrações de  $\text{NO}_2^-$ , HbF e reticulócitos após 12 semanas de uso da associação quando comparados ao momento inicial. Verificou-se aumento das concentrações séricas de TGF- $\beta$  após 12 semanas da associação HU+L-arginina comparados a quatro semanas de uso concomitante. Verificou-se uma correlação direta entre as concentrações séricas de TGF- $\beta$ , HbF e  $\text{NO}_2^-$ . Houve aumento da IL-17 após 12 semanas de uso da associação quando comparados ao momento inicial. Não houve modificação das concentrações de IL-10, IL-6 e catalase. Em relação aos polimorfismos em BCL11A observou-se quanto ao SNP rs11886868, que os indivíduos heterozigóticos para o alelo mais raro (TC) tinham média de HbF de  $14,88 \pm 3,003$ , seguido de  $18,10 \pm 2,784$  para o CC, enquanto que no homozigótico para esse alelo (TT) de  $2,0 \pm 0,0$ . Relativamente ao polimorfismo rs4671393 pôde constatar-se que a presença do alelo em heterozigotia (AG) conferia média de HbF de  $18,16 \pm 2,700$ , os GG  $11,03 \pm 3,814$ , e os AA  $18,9 \pm 0,0$ . Ao rs 7557939 verificou-se para o alelo AA média de HbF de  $7,200 \pm 5,506$ , para AG  $17,43 \pm 2,814$  e GG  $18,10 \pm 2,784$ . Os exames bioquímicos Ur, Cr, AST, ALT e LDH não se alteraram. Foi



validado o método de quantificação de HU em plasma por UPLC. As concentrações médias de HU foram 190,88  $\mu\text{M}$  e 302,71  $\mu\text{M}$ , para pacientes em uso de HU nas dosagens de 1000mg/dia e 1500mg/dia, respectivamente. Não houve correlação entre as concentrações plasmáticas de HU com as concentrações de HbF. Os resultados demonstram que a suplementação de arginina promove uma resposta acentuada ao tratamento com HU nos parâmetros hematológicos e inflamatórios analisados. Sendo a variabilidade da resposta a esta associação dependente da influência dos SNPs do gene BCL11A sobre a expressão da gama globina.

**Palavras Chaves:** Anemia Falciforme. Hidroxiuréia. L-arginina. Polimorfismo. Citocinas. Estresse Oxidativo.

## ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is characterized by chronic hemolysis and crises episodes of vasoocclusion (CVO), cellular abnormalities, increased oxidative stress culminating in organ damage accession, being responsible for high rates of morbidity and mortality. The treatment is based primarily on the use of hydroxyurea (HU). HU causes an increase in the production of fetal hemoglobin (HbF), reduced leukocyte count, reduced hemolysis and increased use of arginine to nitric oxide (NO), reducing the number of vaso-occlusive events, acute chest syndrome (STA), transfusions and hospitalizations. However, the response to HU is variable, which was attributed to multiple factors such as genetic modulators, such as polymorphisms in the BCL11A gene, which modulate the expression of HbF. The objective was to evaluate the effect of HU + L-arginine therapy in hematological parameters, oxidative stress and inflammatory profile, associating the response with polymorphisms in the BCL11A gene. This is a prospective cohort study of 19 patients diagnosed with SCD treated with HU for more than a year. L-arginine was prescribed at a dose of 250 mg in combination with HU, for a period of 12 weeks. Analyses were performed before the use of HU + L-arginine and 4, 8 and 12 weeks of use of the association. There were increased concentrations of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and HbF reticulocytes after 12 weeks of the association when compared to the initial time. An increase of serum TGF-β after 12 weeks of combination HU + L-arginine compared to four weeks of concurrent use. There was a direct correlation between serum concentrations of TGF-β, HbF and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. There was an increase of IL-17 after 12 weeks of the association when compared to the initial time. There was no change in the concentrations of IL-10, IL-6 and catalase. In relation to the polymorphisms in BCL11A is observed as the SNP rs11886868, which heterozygous individuals for the rarer allele (TC) had a mean of 14.88 ± HbF 3,003, followed by 18.10 ± 2.784 for CC, while in homozygous for this allele (TT) of 2.0 ± 0.0. For the rs4671393 polymorphism could be seen that the presence of the allele in heterozygous (AG) gave HbF average of 18.16 ± 2.700, 11.03 ± 3.814 GG, AA, and 18.9 ± 0.0. When rs 7557939. Found to the AA allele average HbF 7,200 ± 5,506 to 2,814 ± 17.43 AG and GG 18.10 ± 2.784. Biochemical tests Ur, Cr, AST, ALT and LDH did not change. The quantification method HU plasma was validated by UPLC. The average concentrations of HU were 190.88 and 302.71

mM mM, for patients using HU in dosages 1000mg/day and 1500mg/day respectively. There was no correlation between plasma concentrations of HU at the concentrations of HbF. The results demonstrate that arginine supplementation promotes a marked response to treatment with HU in hematological and inflammatory parameters analyzed. As the variability of the response is dependent association of SNPs BCL11A influence on the gene expression of gamma globin

**KeyWords:** Sickle cell disease. Hydroxyurea. L-arginine. Polymorphism. Cytokines. Oxidative Stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	□ Alteração da membrana do eritrócito por polímeros de Hb S .....	23
Figura 2	□ Participação da ativação das células endoteliais na fisiopatologia da AF....	25
Figura 3	□ Vasculopatia e AVC na AF .....	26
Figura 4	□ Mecanismo Fisiopatológico da hemoglobina livre no plasma e óxido nítrico ..	28
Figura 5	□ Estrutura química da L-arginina .....	30
Figura 6	□ Mecanismo regulatório dependente de citocinas que afeta a indução das enzimas arginase-1 e óxido nítrico sintase .....	31
Figura 7	□ Estrutura química da HU .....	33
Figura 8	□ O <i>locus</i> da beta globina e interações com outros loci em populações normais e de adultos com anemia falciforme .....	37
Figura 9	□ Concentrações de Nitrito em pacientes com AF tratados com HU+L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	52
Figura 10	□ Concentrações de HbF em pacientes com AF tratados com HU+L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	53
Figura 11	□ Contagem de Reticulócitos em pacientes com AF tratados com HU+L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	53
Figura 12	□ Atividade da Catalase em pacientes com AF tratados com HU+L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	54
Figura 13	□ Concentrações de TGF- $\beta$ em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	55
Figura 14	□ Concentrações de IL-17 em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	55
Figura 15	□ Concentrações de IL-10 em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	56

Figura 16 □ Concentrações de IL-6 em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	57
Figura 17 □ Correlação entre TGF- $\beta$ e HbF, nos diferentes momentos de uso da associação HU+L-arginina .....	58
Figura 18 □ Correlação entre TGF- $\beta$ e NO, nos diferentes momentos de uso da associação HU+L-arginina .....	59
Figura 19 □ Cromatograma de plasma branco enriquecido com Hydroxyurea 1200 $\mu$ M e Methylurea 15,5mM (padrão interno) .....	60
Figura 20 □ Cromatograma de plasma de paciente com AF em terapia com Hidroxiurea 1000mg/dia enriquecido com Metiluréia 15,5mM (padrão interno) .....	60
Figura 21 □ Curva de calibração da HU no intervalo de 50-1600 $\mu$ M de HU em plasma humano .....	61
Figura 22 □ Correlação das concentrações séricas de HU x concentrações de HbF em 15 pacientes com AF em uso de HU+L-arginina .....	63
Figura 23 □ Concentrações de LDH em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	67
Figura 24 □ Concentrações de Uréia em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	68
Figura 25 □ Concentrações de Creatinina em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	68
Figura 26 □ Concentrações de AST em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	69
Figura 27 □ Concentrações de ALT em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas .....	70

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	-	Evolução dos parâmetros hematológicos e do estresse oxidativo e citocinas de pacientes com AF (n=16) .....	51
Tabela 2	-	Correlação entre TGF- $\beta$ , NO e HbF nos diferentes momentos de uso da associação HU+L-arginina .....	56
Tabela 3	-	Limites de confiança do método de análise da Hidroxiurea .....	62
Tabela 4	-	Média das concentrações de HU de pacientes com AF .....	63

Tabela 5	-	Estatística descritiva relativa a concentração de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs11886868 .....	64
Tabela 6	-	Estatística descritiva relativa a concentração de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs4671393 .....	64
Tabela 7	-	Estatística descritiva relativa a concentração de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs7557939 .....	65
Tabela 8	-	Associação entre o valor de HbF e os genótipo do SNP rs11886868 no gene BCL11A nos diferentes momentos de uso da associação HU+L-arginina .....	65
Tabela 9	-	Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do SNP rs4671393 no gene BCL11A .....	66
Tabela 10	-	Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do SNP rs7557939 no gene BCL11A.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente vascular encefálico
AST	Aspartato transaminase
ALT	Alanina transaminase
ARG	Arginase
CAT	Catalase
Cr	Creatinina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
GC	Guanilato ciclase
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
Hb S	Hemoglobina S
HbSS	Homozigose da Hemoglobina S
HbF	Hemoglobina Fetal
HU	Hidroxiuréia
Hb A	Hemoglobina normal
HEMOCE	Hemocentro do Estado do Ceará
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL-6	Interleucina 6
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
LDH	Lactato desidrogenase láctica
LHDGH	Laboratório de hemoglobina e doenças genéticas hematológicas
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase



eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
PS	Fosfatidilserina
STA	Síndrome torácica aguda
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
Ur	Ureia
VCAM-1	Molécula de adesão vascular
VCM	Volume corpuscular médio
UPLC	Ultra Cromatografia Líquida de alta eficiência

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>	<b>2</b>
	<b>..REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>	
<b>2.1</b>	<b>Anemia Falciforme.....</b>	<b>20</b>	<b>2.2</b>
	<b>Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....</b>	<b>21</b>	<b>2.3</b>
	<b>Vasculopatia na Anemia Falciforme .....</b>	<b>23</b>	<b>2.4</b>
	<b>Óxido Nítrico .....</b>	<b>26</b>	<b>2.5</b>
	<b>L-arginina .....</b>	<b>29</b>	<b>2.6</b>
	<b>Citocinas .....</b>	<b>31</b>	<b>2.7</b>
	<b>Estratégias Terapêuticas.....</b>	<b>32</b>	
<b>2.7.1</b>	<b>Hidroxiuréia.....</b>		
	32 ...		
<b>2.7.2</b>	<b>L-arginina como opção terapêutica.....</b>	<b>35</b>	
<b>2.7.3</b>	<b>Demais Estratégias Terapêuticas.....</b>	<b>35</b>	
<b>2.8</b>	<b>Moduladores Genéticos da Anemia Falciforme .....</b>	<b>36</b>	
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>	
	..		
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>39</b>	<b>3.2</b>
	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>39</b>	
<b>4</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>	
	.....		
<b>4.1</b>	<b>Considerações Éticas.....</b>	<b>40</b>	<b>4.2</b>
	<b>Desenho do Estudo.....</b>	<b>40</b>	
	.....		
	.....		
<b>4.3</b>	<b>Casuística.....</b>	<b>40</b>	
	.....		
<b>4.4</b>	<b>Locais do Estudo.....</b>	<b>40</b>	<b>4.5</b>
	<b>Seleção da Amostra.....</b>	<b>41</b>	
	.....		
	.....		
<b>4.6</b>	<b>Coleta.....</b>		
	41 .....		
<b>4.7</b>	<b>Testes Realizados.....</b>	<b>42</b>	
	.....		
<b>4.7.1</b>	<b>Dosagem de HbF.....</b>	<b>42</b>	
<b>4.7.2</b>	<b>Dosagem dos níveis plasmáticos de HU.....</b>	<b>42</b>	
	.....		
<b>4.7.3</b>	<b>Perfil Oxidativo.....</b>	<b>45</b>	
	.....		
<b>4.7.3.1</b>	<b>Catalase (CAT).....</b>		
	45		
	<b>4.7.3.2 Ensaio do NO<sub>2</sub></b>		

.....	-
.....	45
.....	
<b>4.7.4</b>	<b>Perfil Inflamatório..... 46</b>
.....	
<b>4.7.4.1</b>	<b>Citocinas (IL-6, TGF-<math>\beta</math>, IL-10, IL-17)..... 46</b>
.....	
<b>4.7.5</b>	<b>Análises Moleculares..... 47</b>
.....	
<b>4.8</b>	<b>Descarte do material biológico..... 50</b>
	<b>Análise Estatística..... 50</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS..... 51</b>
.....	
<b>5.1</b>	<b>Análise dos Parâmetros Hematológicos, do Estresse Oxidativo e do Perfil Inflamatório..... 51</b>
<b>5.2</b>	<b>Padronização e Validação do método de Análise de Hidroxiuréia em Plasma..... 61</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise dos Polimorfismos..... 66</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise dos Parâmetros Renais, Hepáticos e Marcador de Hemólise..... 69</b>
<b>5.5</b>	<b>5.5 Eventos</b>
	<b>Adversos..... 73</b>
	<b>6</b>
	<b>DISCUSSÃO..... 74</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....79</b>
.....	
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>
	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS..... 81</b>
.....	
	<b>ANEXO A – Artigo Publicado..... 90</b>
	<b>ANEXO B – Artigo Aceito..... 93</b>
	<b>APÊNDICE A – TCLE ..... 107</b>
	<b>APÊNDICE B – COMITÊ DE ÉTICA..... 109</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hematológica, determinada pela homozigose da hemoglobina S (HbSS). A elevada taxa de morbidade e mortalidade se deve a complexa fisiopatologia que se manifesta por hemólise crônica, elevada frequência de episódios vasooclusivos, disfunção endotelial, caracterizada por um estado inflamatório crônico, e vasculopatia progressiva com consequente desequilíbrio na sinalização mediada pelo óxido nítrico (NO), gerando danos a múltiplos órgãos (WOOD; GRANDER, 2007; JAIN; GLADWIN, 2010; SCAVELLA *et al.*, 2010;).

A AF tem sido caracterizada como uma doença inflamatória crônica (ASLAN; CANATAN, 2008). A leucocitose representa um fator de risco para a gravidade da doença, sendo associada com o aumento do índice de síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral (AVC) e de óbito em crianças com AF (PLATT *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 2000). Os leucócitos são os principais moduladores do processo inflamatório, quando ativados aumentam a secreção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo a interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), por macrófagos teciduais. Uma vez secretados, IL-1 e TNF- $\alpha$  ativam o endotélio, levando a um aumento da expressão de moléculas de adesão, que funcionam como receptores de leucócitos, contribuindo assim para o bloqueio do fluxo sanguíneo (ASLAN; CANATAN, 2008).

O NO é um potente vasodilatador que atua impedindo a adesão dos leucócitos ao endotélio, inibindo a expressão de VCAM e ICAM, atuando como uma substância antiinflamatória (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). Estudos apontam o NO como sendo um importante modulador do processo inflamatório contribuindo para a redução dos eventos de vaso-oclusão e consequentemente com dano aos órgãos (MORRIS *et al.*, 2008; LITTLE *et al.*, 2009; LOU TZU-FANG *et al.*, 2009; COX *et al.*, 2011). Na AF a arginase, enzima presente no interior da hemácia, é liberada durante o processo de hemólise, catalisando a hidrólise de L-arginina, substrato para a produção de NO em ornitina e uréia, reduzindo a biodisponibilidade de NO (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). A diminuição de L-arginina, também ocorre devido ao aumento do consumo de NO; a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), em detrimento ao aumento de hemoglobina livre; a injúria isquêmica de reperusão recorrentes; ao estado pró-inflamatório e a elevada auto-oxidação da hemoglobina S (HbS) (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; NUR *et al.*, 2011).

Entretanto, o quadro clínico é extremamente variável, e as razões para essa heterogeneidade ainda não estão totalmente elucidadas. Concentrações elevadas de HbF diminuem a incidência de alguns subfenótipos na doença, como osteonecrose, STA e crises dolorosas, mas não têm sido associados à proteção contra hipertensão pulmonar, AVC ou priapismo. Os principais benefícios clínicos da HbF são sobre o fenótipo viscosidade-vasooclusão, potencialmente devido ao efeito antifalczante da HbF (PLATT *et al.*, 1994). A HbF é um fator importante para o prognóstico, no entanto não deve ser a única ferramenta diagnóstica para prever o quadro clínico destes pacientes, grupos de haplótipos da beta globina S e a presença dos polimorfismos como o BCL11A, associados a expressão de HbF, também constituem fatores de prognóstico na AF (LETTRE *et al.*, 2008).

A HU é a única droga utilizada no tratamento dessa doença por induzir a síntese de HbF e agir como doadora de NO, sugerindo que o NO possa estar envolvido no mecanismo de indução de HbF. A HU é um agente citotóxico, mutagênico, recombinogênico e antineoplásico. Tem sido utilizada no tratamento da AF por aumentar a síntese da HbF e da hemoglobina total e reduzir a hemólise. A HU atua também na redução da expressão de moléculas de adesão, com propriedades anti-inflamatória e anti-agregante contribuindo para a diminuição das crises vaso-oclusivas, reduzindo a necessidade de transfusões sanguíneas, a frequência de hospitalizações e a mortalidade (STROUSE *et al.*, 2008). Estudos atribuem ainda, à HU, uma ação no metabolismo do NO, aumentando a produção do mesmo, via ciclo da GMPc e conseqüentemente aumento da HbF (GLOVER *et al.*, 1999; MORRIS *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2004;). A terapia com HU aumenta a utilização do substrato L-arginina, para produção de NO pela atividade de óxido nítrico sintase (NOS) (NAHAVANDI *et al.*, 2000).

A L-arginina, é um aminoácido semi-essencial, substrato para enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) para a produção de NO, estando reduzida em portadores de AF limitando a eficácia da HU (MORRIS, *et al.*, 2000; SULLIVAN *et al.*, 2010). A biodisponibilidade reduzida da arginina global, mensurada por baixos níveis plasmáticos de L-arginina ou L-ornitina ou L-ornitina e L-citrulina, está associada com o aumento da mortalidade em pacientes com AF (MORRIS *et al.*, 2005). Morris *et al.* (2008) demonstraram que a redução dos níveis de L-arginina nos pacientes com AF, está associada ao dano endotelial, à lesão de múltiplos órgãos, ao aumento da hemólise e à hipertensão pulmonar, contribuindo para a alta taxa de mortalidade destes pacientes.

Muitos estudos sugerem que a produção de NO é influenciada pela terapia com HU, enfatizando o envolvimento do NO na indução de HbF pela HU (GLOVER *et al.*, 1999;

MORRIS *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2004;). Alguns estudos indicam que a HU é somente doadora de NO (JIANG *et al.*, 1997), entretanto outros estudos indicam que a eNOS, enzima que converte L-arginina em NO, pode desenvolver um importante papel na síntese de NO, através da regulação do TNF- $\alpha$ . Desta forma, a terapia com HU aumenta a utilização do substrato L-arginina para produção de NO, pela atividade de NOS (NAHAVANDI *et al.*, 2000).

O estudo da farmacogenética permite avaliar a resposta individual do paciente ao fármaco, contribuindo para a escolha da melhor estratégia terapêutica. Polimorfismos no gene BCL11A estão associados à redução da expressão de HbF. Portanto, relacionar a resposta a associação HU+L-arginina, através da variação dos níveis de NO e de HbF nos pacientes com AF, estando o polimorfismo do gene BCL11A diretamente correlacionado com a habilidade da HU ser doadora de NO e consequentemente produzir aumento de HbF, pode justificar a grande variabilidade da resposta terapêutica a este medicamento (CHERNEY *et al.*, 2009).

Embora o mecanismo dos processos que influenciam a polimerização da HbS estejam bem caracterizados, a explicação para a heterogeneidade fenotípica e a ampla variabilidade clínica da doença falciforme, assim como o perfil de resposta ao medicamento a HU ainda não está bem elucidado.

Nesse contexto, investigamos os efeitos da HU associada à suplementação com L-arginina em relação às propriedades da biodisponibilidade de NO e ao processo inflamatório, através da dosagem das citocinas (IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-17). Além disso, avaliamos a resposta terapêutica dessa associação com modificadores genéticos, como polimorfismos do gene BCL11A no cromossomo 2. Em suma avaliamos a eficácia da L-arginina como um protocolo terapêutico coadjuvante ao tratamento com HU.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Anemia Falciforme

A AF é uma doença hemolítica crônica, causada por uma mutação pontual (GAG→GTG) no gene da globina β (beta), originando uma hemoglobina anormal, denominada HbS, ao invés da hemoglobina normal denominada HbA. Essa mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina no 6º aminoácido da cadeia β, com consequente modificação físico-química da molécula de hemoglobina (CHAVES, 2007). Essas moléculas em baixas tensões de oxigênio sofrem polimerização, com falcização das hemácias, ocasionando encurtamento da vida média dos glóbulos vermelhos, fenômenos de vaso-oclusão, episódios de dor e lesão de órgãos alvos, estando associada a elevadas taxas de morbidade e mortalidade (WOOD; GRANDER, 2007).

A HbS no estado de baixa tensão de oxigênio sofre modificação em sua molécula devido à interação de natureza hidrofóbica da valina com a fenilalanina da posição 85 e da leucina da posição 88, desencadeando assim a formação de polímeros num processo de nucleação e criando estrutura multipolimérica. A cinética de falcização depende do grau de desoxigenação, concentrações intracelular de HbS e HbF. Alterações físico-químicas, além de deformar e enrijecer a membrana celular predispõe os eritrócitos falcêmicos a aderirem ao endotélio vascular contribuindo para os episódios de crises de vaso-oclusão. As células irreversivelmente falcizadas formadas em decorrência do afoçamento, são removidas e destruídas tanto no meio extravascular como intravascular, diminuindo a sobrevida média eritrocitária para cerca de dezessete dias (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

Dentre as comorbidades na AF são documentadas as crises dolorosas; infecções recorrentes; enfartes pulmonares; AVC; retardo do crescimento e da maturação sexual; priapismo; úlceras de membros inferiores; STA; sequestro esplênico; necrose asséptica de fêmur; retinopatia; insuficiência renal crônica; autoesplenectomia, entre outras (STEINBERG; ADEWOYE, 2006 ; QUINN *et al.*, 2007).

A distribuição das doenças falciformes é ampla, abrangendo todos os continentes, notadamente África, América do Norte, América Latina e parte da Ásia. Segundo dados do Ministério da Saúde, as prevalências referentes à doença em diferentes regiões brasileiras permitem estimar a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS; mais de 8 mil afetados com a forma homozigótica (HbSS) que se manifesta por anemia grave. Estima-se



o nascimento de setecentos a mil casos novos anuais de doenças falciformes no país (BANDEIRA *et al.*, 2007). Inclui-se no grupo de doenças das células falciformes as dupla heterozigoses da HbS com as hemoglobinas C (HbC), hemoglobina D (HbD) e ou talassemias (NAOUM, 2000).

O gene da HbS é um gene semi-dominante que pode se manifestar em heterozigose (HbAS), originando o portador ou traço falcêmico, ou em homozigose (HbSS) caracterizando a AF. A AF ocorre com maior frequência na região central da África (5 a 20% da população), também ocorre nos países do mediterrâneo e na Índia, porém em porcentagens menores. A presença desta anemia nas Américas se deve a imigração de descendentes daquelas regiões. Quanto à etnia, a AF é característica dos negros, no entanto devido a intensa miscigenação no nosso país isso não ocorre (NAOUM, 2000).

No Brasil, mais de 8.000 indivíduos apresentam anemia falciforme (forma homozigota), e cerca de 2 milhões são portadoras do traço falciforme. Estima-se, a cada ano, o nascimento de 700-1000 novos casos de portadores de doenças falciformes, incluindo a formas interativas com outras anormalidades hereditárias da hemoglobina. A AF é a doença hematológica hereditária mais prevalente na população brasileira. Tendo se originado na África e trazida à América pela imigração forçada dos escravos, sendo mais frequente nos países colonizados por negros. A doença distribuiu-se heterogeneamente no Brasil em virtude da miscigenação racial, favorecendo assim a continuidade dessa anemia no país e sendo apontada pela literatura científica brasileira como grave problema de saúde pública. (NAOUM, 1997). Uma vez que esta alteração genética tem origem no continente africano, a prevalência do gene  $\beta^s$  apresenta diferenças regionais decorrentes do processo de miscigenação e migração da população brasileira, variando entre 1 e 2% na região sul e de 6 a 10% entre negros e pardos na região nordeste. Pinheiro *et al.* (2006) demonstraram em Fortaleza, Ceará a prevalência de 4,1% de HbS sendo 3,8% de recém-nascidos AS e 0,2% Hb SS.

## **2.2. Fisiopatologia da Anemia Falciforme**

As manifestações clínicas da AF derivam diretamente da anormalidade molecular representada pela presença da HbS. As moléculas de HbS, quando desoxigenadas se organizam em longos polímeros de filamentos longos, que por sua vez se associam em feixes com um duplo filamento central rodeado de seis filamentos duplos de polímeros. Esses feixes de cristais dentro das hemácias podem ser vistos à microscopia eletrônica e determinam deformações das células. A deformação mais conhecida é provocada por esse feixe de polímeros se organizando

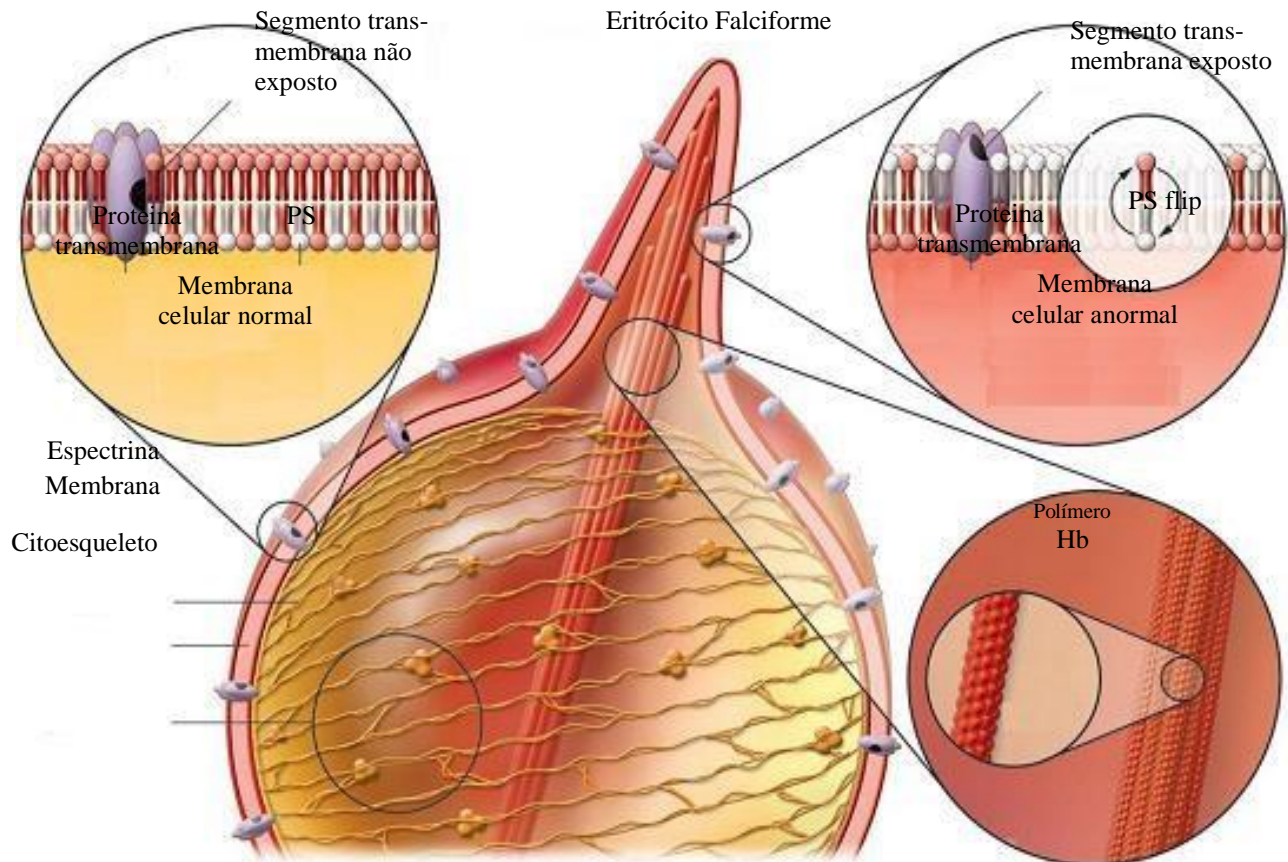
mais ou menos paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou drepanócitos (ZAGO; PINTO, 2007).

A velocidade e a extensão da formação de polímeros no interior das hemácias dependem primariamente de três variáveis independentes: grau de desoxigenação, concentração intracelular de HbS e presença ou ausência de HbF (ZAGO; PINTO, 2007).

Na AF, uma alteração genética na globina faz com que os eritrócitos assumam a forma de foice, depois que o oxigênio é liberado. As células em foice apresentam-se rígidas ou endurecidas, levando a obstrução dos vasos sanguíneos, ocasionando fenômenos de vasooclusão e crises dolorosas (QUINN *et al.*, 2007).

O processo de polimerização da hemoglobina S acarreta múltiplas alterações no eritrócito, dentre as quais o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e a formação de polímeros da HbS que levam a exposição de proteínas transmembrana, em especial a fosfatidilserina (PS), de dentro para fora da célula, expondo cargas negativas glicolípídicas que contribuem para um estado pró-inflamatório e pró-trombótico (Figura 1) (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

Figura 1 - Alteração da membrana do eritrócito por polímeros de HbS.



A formação de polímeros de HbS ocasiona a exposição da proteína transmembrana, PS, no eritrócito falciforme, expondo cargas negativas glicolípídicas, contribuindo para um estado pró-inflamatório. Fonte: FRENETTE; ATWEH, 2007.

Outra importante alteração da hemácia na AF é a perda da sua maleabilidade, fato que pode comprometer o transportar de oxigênio, principalmente na microcirculação. A perda da elasticidade da célula deve-se ao incremento da concentração de HbS intracelular, resultando no aumento da viscosidade no citosol, à polimerização da HbS e à rigidez da membrana. Estes fatores, associados a uma maior adesão do eritrócito falcizado ao endotélio, mediada pelo complexo de integrina  $\alpha_4\beta_1$ , trombospondina, fator de von Willebrand e fibronectina, favorecem a formação de trombos na micro e na macrocirculação (FRENETTE; ATWEH, 2007).

### 2.3 Vasculopatia na Anemia Falciforme

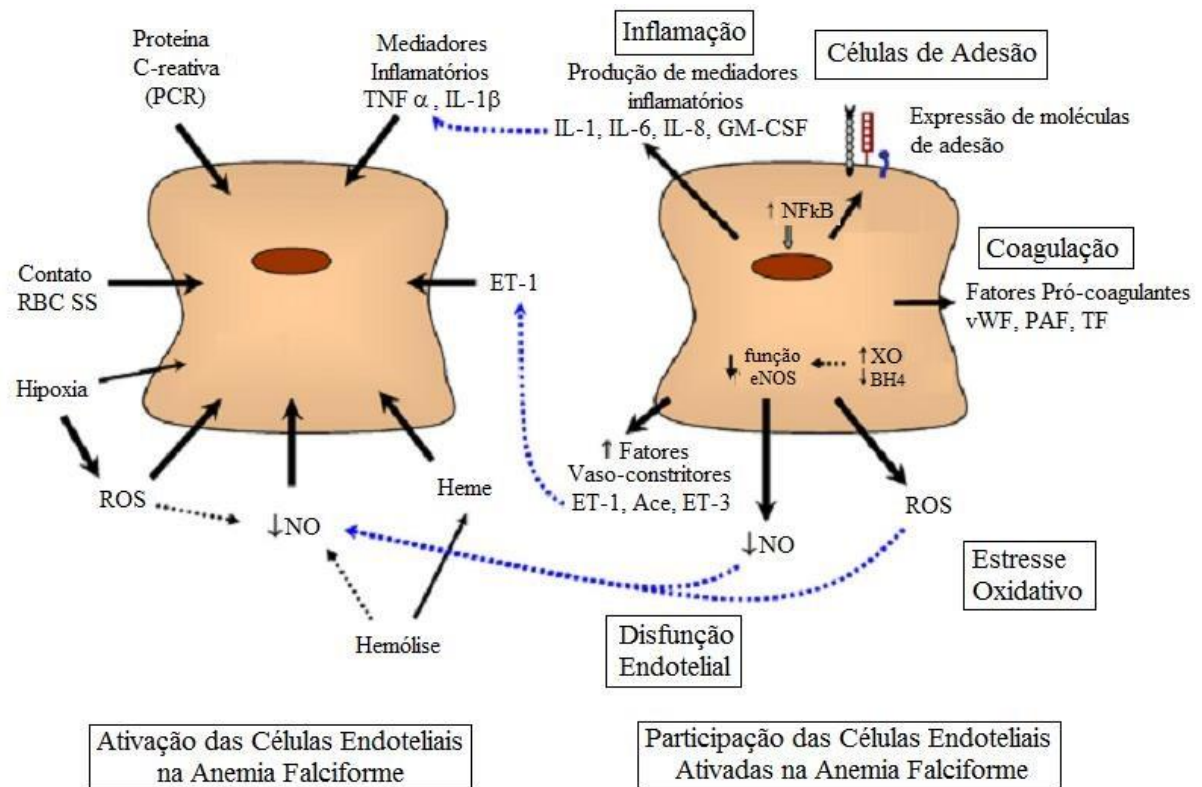
O mecanismo inicial destas crises vaso-oclusivas é controverso e multifatorial. A vaso-oclusão pode ocorrer quando há lentidão no fluxo sanguíneo através dos leitos capilares, com maior desoxigenação da HbS, e conseqüente polimerização. Como a aderência dos eritrócitos ao endotélio vascular pode impedir o fluxo de sangue e aumentar o tempo de trânsito nos capilares, sugere-se que o aumento da aderência celular possa iniciar e propagar o fenômeno de vaso-oclusão. A rigidez destas hemácias deformadas (hemácias em forma de “foice”) contribui para oclusão vascular constituindo a maior causa de morbidade (HEBBEL, 1997; PLATT *et al.*, 1994; PATHARE *et al.*, 2003; BRITTAIN; PARISE, 2007).

Outros fatores tais como proteínas plasmáticas, citocinas, plaquetas e anormalidades endoteliais estão envolvidos na vaso-oclusão. Evidências também sugerem que os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) desempenham uma função importante no mecanismo da vasooclusão, estando a leucocitose associada com o aumento do índice de morte prematura, STA e AVC em crianças com AF (PLATT *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 2000). A adesão leucocitária contribui com o microambiente inflamatório que se instala nos pacientes com AF. Por se tratar de células grandes e que não se deformam com facilidade são capazes de obstruir o lúmen vascular. Durante o fluxo sanguíneo normal, os eritrócitos circulantes podem interagir com os leucócitos aderidos, sofrer desoxigenação e posterior falcização (FRENETTE; ATWEH, 2007; CANALLI *et al.*, 2008). Os leucócitos promovem agregação de outras células sanguíneas, aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão, dano e injúria tecidual o que exacerba ainda mais o processo inflamatório local (CONRAN; COSTA, 2009). As células endoteliais são responsáveis pela síntese do NO, potente vasodilatador, além da produção de outros vasodilatadores como as prostaciclina, bem como pela produção de substâncias vasoconstritoras incluindo endotelina, angiotensina II e prostaglandinas. Porém nos pacientes com AF ocorre um desequilíbrio entre a produção e consumo destas substâncias vaso reguladoras (GALLEY; WEBSTER, 2004).

A presença de mediadores inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina -1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e proteína C-reativa (PCR), contribui para o estado inflamatório. Fatores como a reduzida biodisponibilidade de óxido nítrico, o aumento de endotelina-1 induzem alterações no endotélio, tais como a expressão da molécula de adesão. Além disso, o contato com as hemácias em foice, a maior produção de espécies reativas de oxigênio e a hemólise crônica levam a ativação da célula endotelial, através do consumo aumentado de NO. Uma vez ativadas, células endoteliais promovem a liberação de fatores vasoconstritores, fatores

pró-coagulantes, com uma expressão aumentada de moléculas de adesão e moléculas inflamatórias, que desencadeiam processos inflamatórios, adesão celular, ativação da coagulação e estresse oxidativo, culminando com disfunção e ativação endotelial e com o estado inflamatório crônico (CONRAN; COSTA, 2009) (Figura 2).

Figura 2 – Participação da ativação de células endoteliais na fisiopatologia da AF: mecanismos de ativação do endotélio e conseqüente ativação das células endoteliais.



A ativação endotelial ocorre na presença de mediadores inflamatórios, tais como  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e PCR. A ET-1, um potente vasoconstritor, também induz alterações no endotélio, tais como a expressão da molécula de adesão. O contato direto de eritrócitos SS com endotélio provoca ativação endotelial por um mecanismo desconhecido. Os dímeros de hemoglobina livre, produzido por hemólise, têm um efeito prejudicial e de ativação sobre as células endoteliais. Hemólise e EROS contribuem para a remoção do NO e, conseqüentemente diminui a sua biodisponibilidade, além de induzir a produção de ET-1 e a expressão de moléculas de adesão. Uma vez ativadas as células endoteliais produzem mediadores inflamatórios, passam a expressar moléculas de adesão, fatores pró-coagulantes, espécies reativas de oxigênio, fatores vaso-constritores, além de reduzir a biodisponibilidade de óxido nítrico contribuindo para a disfunção endotelial.

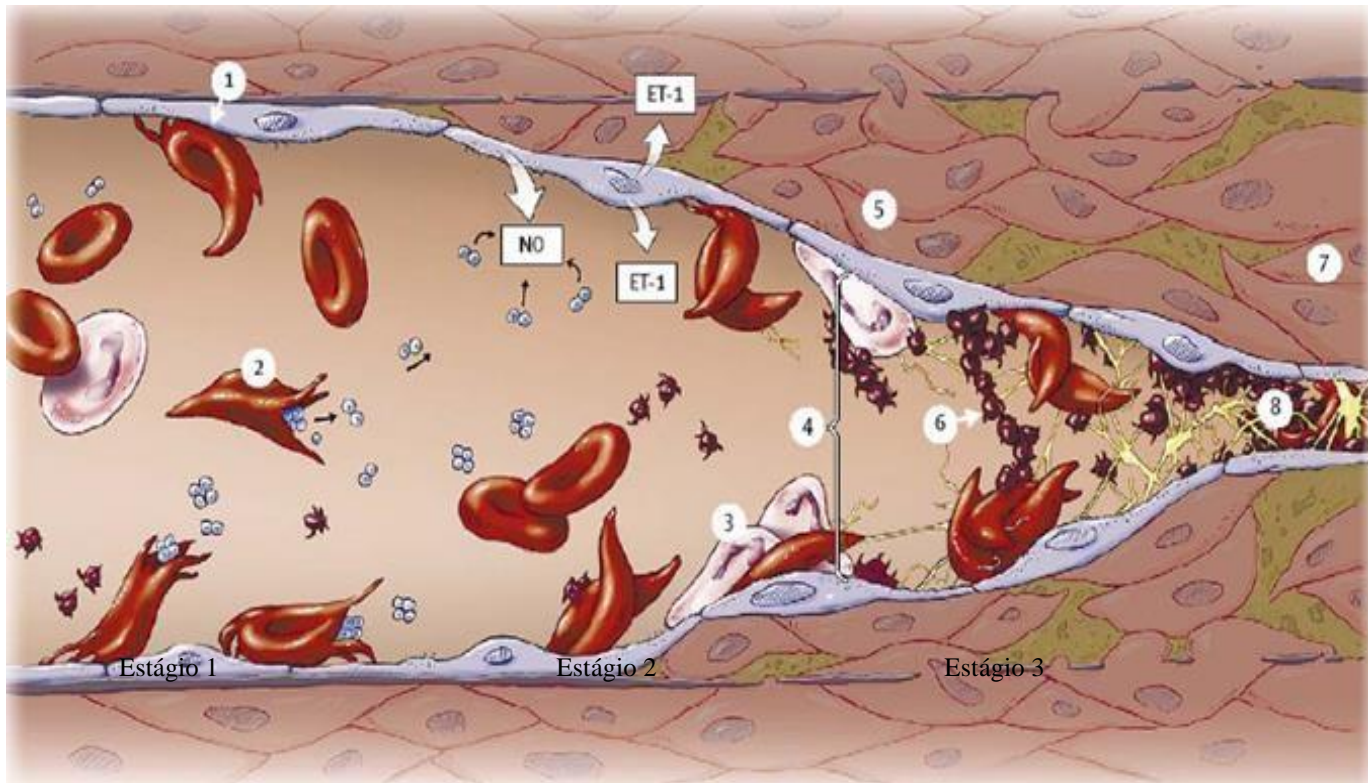
Fonte: Adaptado de CONRAN; COSTA, 2009

Todos esses fatores agem como moduladores do fenômeno obstrutivo vascular característico da doença. A ativação das células endoteliais predispõe ao desenvolvimento de vasculopatia devido ao dano endotelial e aos episódios crônicos de hemólise. O contato direto dos eritrócitos SS com o endotélio gera hemólise, com liberação de dímeros de hemoglobina que consomem o óxido nítrico e geram dano ao endotélio com uma maior produção de



endotelina-1, desregulando a produção destas substâncias vaso-reguladoras. Estes eventos desencadeiam um estado pró inflamatório crônico, manifestado por adesão de células vermelhas, adesão leucocitária e agregação plaquetária culminando com a oclusão do vaso (Figura 3).

Figura 3 - Vasculopatia e AVC na anemia falciforme.



e agregação plaquetária. (6) Agregação plaquetária. (7) Vasculopatia. (8) Oclusão vascular.  
Fonte: Adaptado por GONÇALVES *et al.*, 2007

## 2.4 Óxido Nítrico

Recentemente tem sido de muito interesse o entendimento do mecanismo fisiopatológico e farmacológico do óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador fisiológico. Além disso, devido à disfunção endotelial nos pacientes falciformes, a concentração de endotelina (vasoconstritor) sobrepõe a concentração de NO (vasodilatador) contribuindo para a vasoconstrição. Os dados da literatura sugerem que o NO pode ser importante na fisiopatologia da AF, particularmente durante o estresse oxidativo (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; WOOD; GRANGER, 2007).

O óxido nítrico, um gás e um radical livre muito reativo, é um dos maiores reguladores do tônus vascular, especificamente arteriolar (GLADWIN *et al.*, 2002). Existem três formas da enzima que produz o NO, a óxido nítrico sintase (NOS), que são: a eNOS produzida no

endotélio, a bNOS produzida no cérebro e a iNOS que é a enzima induzida. O NO formado pelo endotélio (eNOS) é responsável por manter o baixo tônus vascular, inibir a adesão dos leucócitos e a agregação plaquetária (IGNARRO *et al.*, 2001). O NO formado constitutivamente pelo neurônio (bNOS) atua como um neuro-modulador ou neuro-mediador em alguns neurônios centrais e periféricos. O NO formado pela iNOS, presente em macrófago e em outras células, tem múltiplos efeitos na resposta inflamatória (MICHEL; FERON, 1997). A elevação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) por ativação da enzima guanilato ciclase (GC) (principal receptor de NO) é responsável pela vasodilatação e por outras funções fisiológicas regulatórias de NO (IGNARRO *et al.*, 2001). A ativação da GC leva ao aumento intracelular de GMPc, o qual ativa a quinase dependente de GMPc que regula a ação de NO, produzindo vaso-relaxamento e aumento da permeabilidade vascular (LUGNIER *et al.*, 1999).

Existem três grandes mecanismos de redução da biodisponibilidade do NO na AF: pela diminuição da L-arginina, pelo consumo de NO por meio das espécies reativas de NO (ROS) e, talvez o mais importante, pelo consumo de NO através da hemoglobina livre no plasma. O substrato L-arginina para a produção de NO através da enzima NOS pode também ser degradado para ornitina na presença da enzima arginase-1. A arginase-1 é encontrada em elevadas concentrações em eritrócitos jovens. Assim, a L-arginina plasmática é transformada em ornitina, diminuindo, a disponibilidade de L-arginina para a produção de NO (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). O NO pode também ser consumido pelo excesso de ROS e pela hemoglobina livre no plasma. A hemoglobina livre no plasma reage com o NO produzindo metahemoglobina e nitrato (ROTHER *et al.*, 2005; FIGUEIREDO, 2007). A diminuição do NO induz a ativação plaquetária e a adesão leucocitária levando ao processo vaso-oclusivo (Figura 4) (CANALLI *et al.*, 2008).

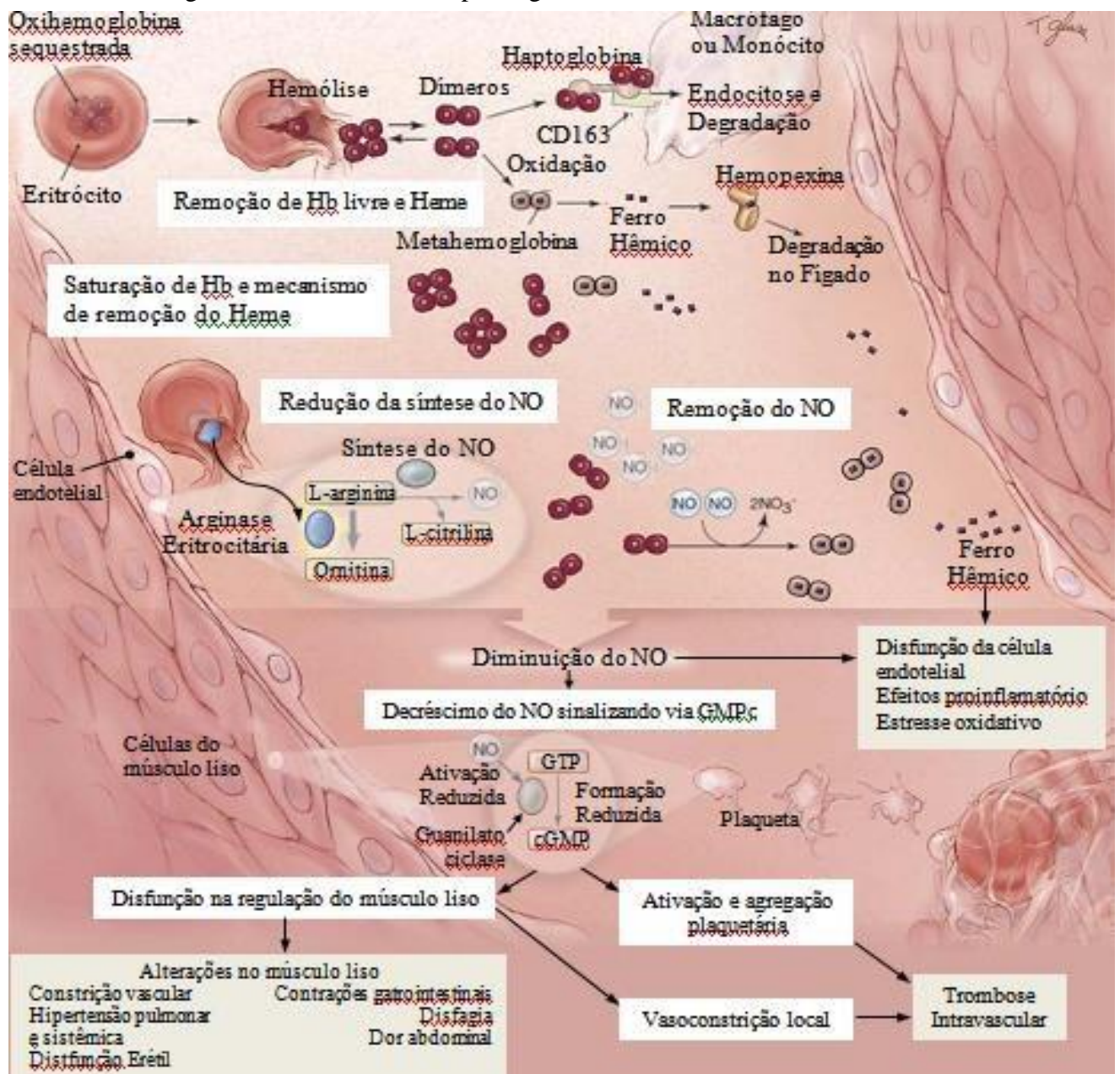
Vários estudos demonstram a importância dos neutrófilos no processo de vasooclusão, sugerindo que a diferença na expressão gênica dos neutrófilos pode ser responsável por algumas das variações fenotípicas observadas na AF (DHANANJAY *et al.*, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

Células endoteliais circulantes de pacientes com AF apresentam aumento da expressão de ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion factor*) e fator tissular (DHANANJAY *et al.*, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

É sabido que a interação entre células endoteliais e eritrócitos falciformes é

mediada por citocinas inflamatórias, que se encontram aumentadas em pacientes em estado basal. Portanto, de modo geral, a ativação endotelial observada nos pacientes com AF parece ser fator contribuinte da oclusão vascular (FIGUEIREDO, 2007; ROTHER *et al.*, 2005).

Figura 4 – Mecanismo fisiopatológico do consumo do óxido nítrico.



Durante a hemólise intravascular, a Hb é liberada no plasma, onde é removida através da haptoglobina, CD163, e hemopexina. O complexo haptoglobina-Hb se liga ao CD163 na superfície do macrófago onde é endocitado e degradado. A Hb também libera ferro hêmico quando oxidada, o qual se liga a hemopexina e é degradado através



dos hepatócitos no fígado. Excesso de hemólise leva a saturação desse mecanismo de remoção de Hb, deixando Hb e heme livre no plasma, gerando um estado pró inflamatório, pró oxidante e disfunção da célula endotelial. NO é normalmente gerado a partir a L-arginina nas células endoteliais através da enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Durante a hemólise intravascular, NO biodisponível pode ser reduzido através da reação com oxihemoglobina e da redução da L-arginina, que é consumida através da arginase eritrocitária, e transformada em ornitina. Redução de NO resulta em redução da ativação da guanilato ciclase. Decréscimo de GMPc resulta em distonias, hipertensão pulmonar sistêmica, disfunção erétil, disfagia, e dor abdominal e podem desencadear a ativação e agregação plaquetária, promovendo trombose intravascular.

Fonte: Adaptado de ROTHER *et al.*, 2005

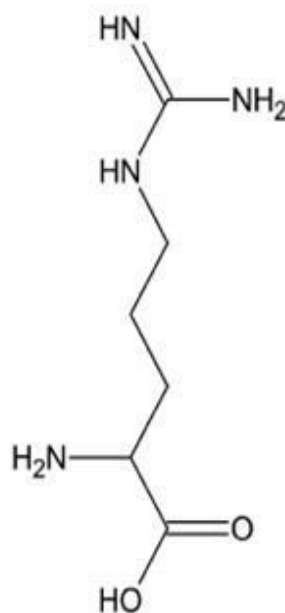
## 2.5 L-arginina

A L-arginina ou ácido L-amino-5-guanidino-valérico (Figura 5) é um aminoácido básico. Possui quatro átomos de nitrogênio por molécula e devido a essa característica estrutural é o principal carreador de nitrogênio em humanos e animais, apresentando importante função na síntese protéica e no metabolismo intermediário de nitrogênio por participar do ciclo da uréia (WU *et al.*, 2009).

O metabolismo da arginina está alterado na AF. A arginase, enzima presente no interior da hemácia, é liberada durante o processo de hemólise, catalisando a hidrólise de Larginina, substrato para a produção de NO, inativando-a em ornitina e uréia. Desta forma os pacientes com AF apresentam uma reduzida biodisponibilidade de NO, podendo ser atribuída a diminuição de L-arginina, a um maior consumo de NO por meio das espécies reativas de oxigênio (EROs) e dímeros de hemoglobina livre no plasma transformando-o em metahemoglobina e em nitrato inativo. O óxido nítrico é um potente vasodilatador que atua impedindo a adesão dos leucócitos ao endotélio, inibindo a expressão de moléculas de adesão, atuando como uma substância anti-inflamatória (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

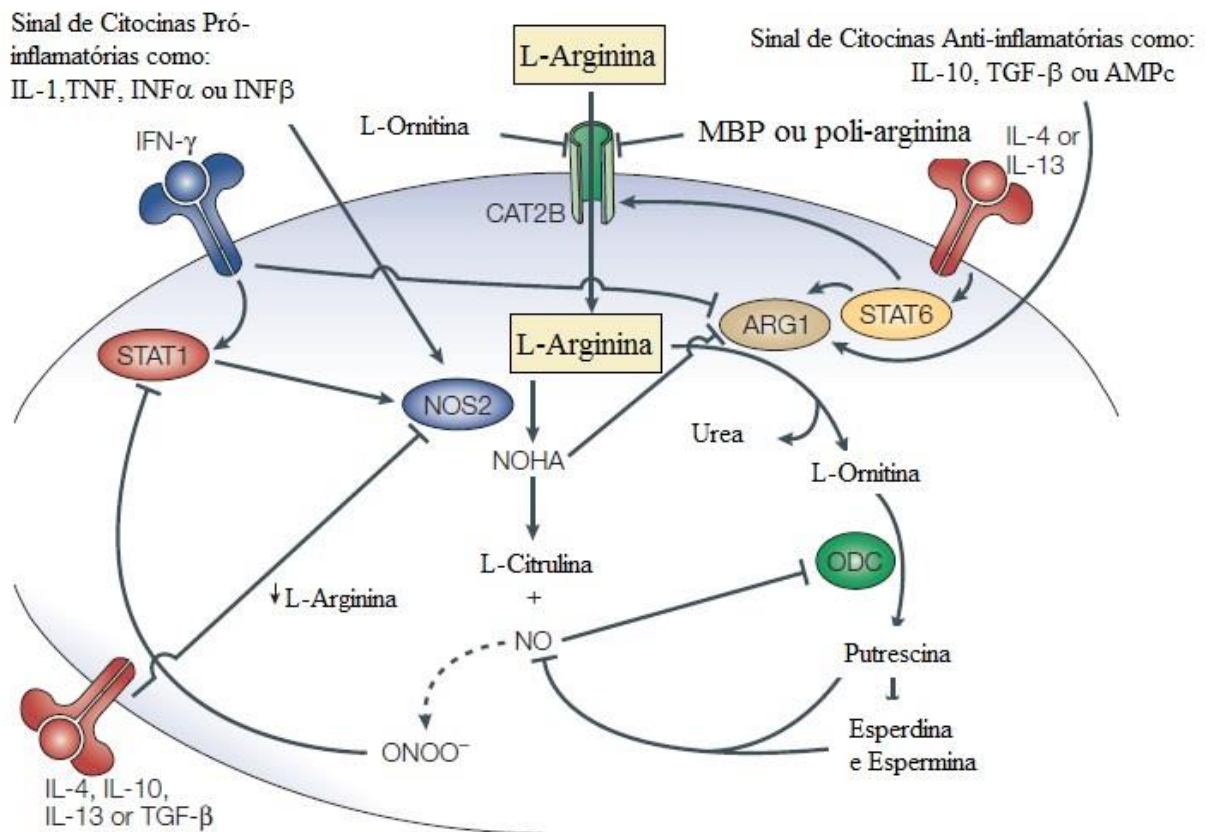
O fenômeno central da vasculopatia na AF é a anemia hemolítica crônica e uma desregulação da sinalização mediada pelo NO (JAIN; GLADWIN, 2010). O NO é um vasodilatador endógeno crítico que é sintetizado nas células endoteliais a partir do aminoácido L-arginina pelas várias isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A nível vascular o NO inibe a ativação plaquetária e a expressão de moléculas de adesão. Desta forma a deficiente sinalização do NO associado com anemia hemolítica crônica contribui com a vasculopatia presente na doença (JAIN; GLADWIN, 2010).

Figura 5 – Estrutura química da L-arginina.



A alteração no metabolismo da arginina contribui para a disfunção endotelial e hipertensão pulmonar (MORRIS *et al.*, 2005). A vasculopatia pode ser explicada pelas condições de hemólise crônica e disfunção endotelial, caracterizado pela redução e resistência do NO. O metabolismo da arginina é regulado pelas células supressoras mielóides através de duas enzimas que competem pelo substrato L-arginina, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a Arginase (ARG), as quais são reguladas por citocinas Th1 (IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$ ), respectivamente (Figura 6). As enzimas catabólicas, ARG e iNOS, quando metabolizam a L-arginina produzem uréia e L-ornitina, e óxido nítrico (NO) e L-citrulina, respectivamente, sendo os produtos metabólicos destas enzimas importantes moderadores da função das células T (BRONTE; ZANOVELO, 2005).

Figura 6 - Mecanismo regulatório dependente de citocinas que afeta a indução das enzimas arginase 1 (ARG1) e óxido nítrico sintase (NOS2).



A L-arginina pode ser consumida por duas enzimas: ARG1 e NOS2 ativadas por citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias respectivamente. O que leva ao equilíbrio entre a produção de L-citrulina e NO e Ornitina e Urea.

Fonte: Bronte ; Zanovelo, 2005

## 2.6 Citocinas

Várias citocinas, tais como as interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-8 e TNF- $\alpha$  estão associadas com o processo inflamatório crônico na AF. A ativação de células e a liberação de citocinas estimulam o fator nuclear kappa- $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), contribuindo para a manutenção do processo inflamatório (THASSILA *et al.*, 2013).

A IL-6 promove uma variedade de funções celular, incluindo diferenciação, maturação, proliferação e sobrevivência. Estudos têm comprovado um aumento da IL-6 em pacientes com AF

em relação ao grupo de indivíduos normais. O aumento da IL-6 é mais pronunciado em pacientes com AF em crises em relação aos em estado basal (THASSILA *et al.*, 2013).

A IL-17 é produzida por um subtipo de células T, denominado de células Th17, que é diferente das células Th1 e Th2. A diferenciação de células *naive* para células Th17 requer a presença de TGF- $\beta$  e subsequente expansão da resposta Th17 requer IL-23 (THASSILA *et al.*, 2013).

A função da IL-17 e do TGF- $\beta$  na AF ainda não está totalmente documentada. Keikhaei *et al.*, (2013) recentemente observou aumento da IL-17 e TGF- $\beta$  em pacientes com AF em relação a controle normal, porém sem significância entre os pacientes em estado basal e em crises. Os pacientes em uso de HU apresentaram valores inferiores em relação aos que não se encontravam em uso. Vilas-Boas *et al.*, (2010) demonstraram uma correlação positiva entre a arginase sérica e o TGF- $\beta$  em pacientes com AF, achados que fortalecem a hipótese de que o TGF- $\beta$  induz uma regulação positiva do mecanismo da arginase e uma regulação negativa no mecanismo de produção do NO.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória cujo principal efeito é a inibição da síntese de várias citocinas, tais como o TNF- $\alpha$ ; GM-CSF; IL-1; IL-6; IL-8 e IL-12, para promover a captação e retenção de ferro no interior dos macrófagos e do sistema retículo endotelial. A IL10 inibe a proliferação das células Th1, facilitando o desenvolvimento da resposta Th2. Lanaro (2009) verificou aumento da IL-10 em pacientes com AF em uso de HU, porém o mecanismo não foi descrito.

## **2.7 Estratégias terapêuticas**

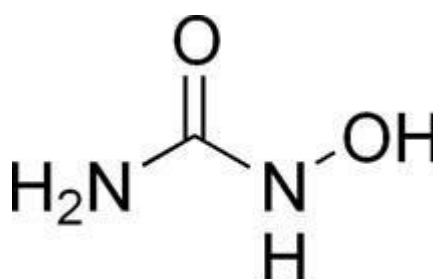
As opções terapêuticas utilizadas no tratamento da AF são ácido fólico, hidroxiuréia (HU), transfusão sanguínea e transplante de medula óssea. Entretanto, com as novas descobertas a cerca da fisiopatologia da doença têm surgido perspectivas no sentido de se buscar novas propostas terapêuticas, com a finalidade de atenuar os processos de inflamação, estresse oxidativo, a disponibilidade de óxido nítrico, entre outras colaborando para amenizar com os episódios de vaso-oclusão e de hemólise (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

### **2.7.1 Hidroxiuréia**

A hidroxiuréia (HU) é um hidroxycarbamato inibidor seletivo da síntese de ribonucleotídeo difosfato redutase, enzima necessária na conversão de ribonucleotídeos difosfatados em deoxiribonucleotídeos difosfatados, assim mantendo as células na fase G1/S do ciclo celular. A HU é usada principalmente em neoplasias do sistema hematopoético como, por exemplo, na leucemia mielóide crônica (LMC). Atualmente, HU é o principal fármaco disponível para o tratamento de anemia falciforme liberado pela agência reguladora norteamericana FDA (HANFT *et al.*, 2000).

A HU, considerada como um agente citotóxico, mutagênico, recombinogênico e antineoplásico vêm sendo, utilizada no tratamento da AF. A HU é composta de simples estrutura molecular, semelhante à ureia. Diferenciando-se apenas no que diz respeito à hidroxilação do átomo de Nitrogênio adjacente à cetona da ureia, presumindo-se, dessa forma, que sua atuação medicamentosa esteja associada a esse átomo (Figura 7). Vários estudos têm reportado a eficácia da HU em pacientes com AF devido ao aumento da concentração da Hb F, logo diminuindo os episódios de hemólise e conseqüentemente melhorando o quadro clínico. A droga é indicada para pacientes, incluindo crianças, com três ou mais episódios de crises vaso-occlusivas com necessidade de atendimento médico; uma crise torácica aguda recidivante; uma ou mais acidentes vasculares encefálicos; priapismo recorrente e anemia grave e persistente, nos últimos 12 meses (SILVA; SHIMAUTI, 2006; CANÇADO *et al.*, 2009).

Figura 7 – Estrutura química da HU.



Alguns estudos mostram que a HU é um doador de NO. A HU é oxidada pela hemoglobina gerando a nitrosilhemoglobina (HbNO) e o NO (GLADWIN *et al.*, 2002), além de gerar NO através das enzimas peroxidase, urease e catalase (JIANG *et al.*, 1997). Outros estudos mostram que a HU estimula a fosforilação e a ativação da eNOS que resultam na produção de NO (CANALLI *et al.*, 2008; COKIC *et al.*, 2008).

Foi observado também que a HU apresenta propriedades antioxidantes contribuindo com a redução da peroxidação lipídica e formação de metahemoglobina na AF (AGIL; SADRZADEH, 2000).

Dentre os efeitos hematológicos promovido pelo uso da HU estão a diminuição nas contagens de granulócitos, monócitos e plaquetas circulantes e o aumento no número de eritroblastos que sintetizam grandes quantidades de HbF. A celularidade da medula óssea pode também ser diminuída. Elevadas concentrações de HbF reduzem a polimerização da HbS e o número de eritrócitos deformados, densos ou danificados, atenuando a hemólise e diminuindo a contagem de reticulócitos. A diminuição do número de eritrócitos densos e deformados também reduz os episódios vaso oclusivas (MANFREDINI *et al.*, 2008).

Acredita-se que os efeitos benéficos da HU decorram em parte de sua capacidade, de se biotransformar em óxido nítrico (NO) (KING, 2003). Vários trabalhos tem atribuído um aumento significativo do NO, GMPc e da HbF em pacientes com AF ao uso da HU (ALMEIDA *et al.*, 2008; CANALLI, 2008; COKIC *et al.*, 2008 ; ALMEIDA *et al.*, 2012). Cokic *et al* (2008) demonstraram aumento do GMPc, em eritrócitos de pacientes com AF, em uso de HU quando comparados com indivíduos aparentemente saudáveis. O aumento do NO pelo tratamento com HU contribui de forma significativa auxiliando nos casos de vaso-oclusão, diminuindo a expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular e inibindo a agregação plaquetária, mantendo o equilíbrio homeostático vascular (STEINBERG, 2006).

A HU gera NO, o qual ativa a sGC. A ativação de sGC aumenta a expressão de  $\gamma$  globina em células eritroleucêmicas e eritroblastos humanos primários. A via sGC regula a expressão de  $\gamma$  globina, e conseqüentemente a síntese de HbF. Conran *et al.*, (2004), demonstraram que a HU ativa GCs e também induz a expressão de RNAm  $\gamma$  globina, aumentando os níveis de HbF em células eritroleucêmicas K562 e células progênitoras humanas.

A despeito desta série de efeitos benéficos, o tratamento com HU pode gerar efeitos adversos como mielossupressão, hiperpigmentação cutânea, lesões ulcerativas em membros inferiores, aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , agravando as crises álgicas (NAHAVANDI *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado que a droga possui potencial teratogênico, carcinogênico e mutagênico, podendo estar associada com um risco aumentado de desenvolvimento de leucemia (; BYRD *et al.*, 1999; HANFT *et al.*, 2000; DAVIES; GILMORE, 2003; BARBUI, 2004; PLATT, 2008, STEINBERG *et al.*, 2010).

Entretanto, é importante destacar que cerca de 25% dos pacientes não respondem à terapia com HU, e em diversos casos de tratamento crônico o efeito benéfico diminui ou até mesmo se extingue, necessitando doses cada vez maiores para se obter o efeito, aumentando a toxicidade (ALIYU *et al.*, 2005).

### **2.7.2 L-arginina como opção terapêutica**

A arginina é o único aminoácido substrato para a produção de NO por todas as isoformas da NOS. Regular a disponibilidade de arginina é um mecanismo potencial que pode levar ao controle da produção de NO (JAIN; GLAWIN, 2010).

A L-arginina, é um aminoácido semi-essencial, substrato para enzima oxido nítrico sintase endotelial (NOSe) para a produção de NO, esta se encontra reduzida em portadores de AF limitando a eficácia da HU (MORRIS *et al.*, 2000; SULIVAN *et al.*, 2010). As concentrações plasmáticas de L-arginina estão deficientes em adultos e crianças durante as crises vaso-oclusivas e crises de síndrome torácica aguda, e seu efeito está associado a baixos níveis do metabólito NO (MORRIS, 2000). Estudos mais recentes enfatizam a importância do NO como um componente fundamental na fisiopatologia da AF (MORRIS *et al.*, 2008; LITTLE *et al.*, 2009; LOU TZU-FANG *et al.*, 2009; COX *et al.*, 2011). A biodisponibilidade reduzida da arginina global, mensurada por baixos níveis plasmáticos de L-arginina ou L-ornitina ou L-citrulina, está associada com a mortalidade em pacientes com AF (MORRIS *et al.*, 2005). Morris *et al.*, (2008) confirmaram que a redução de arginina está associada ao dano endotelial, a lesão de múltiplos órgãos, ao aumento da hemólise e a hipertensão pulmonar, contribuindo para a elevada taxa de mortalidade destes pacientes. Estudos clínicos com suplementação de L-arginina aumenta a biodisponibilidade do NO amenizando a hipertensão pulmonar (KATO *et al.*, 2006; MORRIS *et al.*, 2008).

### **2.7.3 Demais Estratégias terapêuticas**

Entre as novas propostas terapêuticas para a AF destacam-se a sulfasalazina, como terapia antiinflamatória e anti-adesiva, sendo um potente inibidor de NF- $\kappa$ B, que controla a expressão de uma variedade de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e imunes, além de promover uma redução significativa da expressão de receptores de adesão (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina) em células endoteliais. Aslan e Bruce (2007) demonstraram uma

redução de 73% em dias de hospitalização e 74% em horas gastas em sala de emergência por ano, de pacientes com AF com crises álgicas recorrentes.

O uso da vitamina E, como antioxidante de baixo peso molecular, promoveu o aumento da concentração de  $\alpha$ -tocoferol ( $0.7 \pm 0.2$  para  $2.3 \pm 0.3$  mg/g lipídio) e uma redução significativa de células falcizadas ( $25 \pm 3\%$  para  $11 \pm 1\%$ ) em pacientes com AF (ASLAN; BRUCE, 2007). Além disso, outras drogas, tais como o Sildenafil, a inalação de NO foram utilizadas como estratégias terapêuticas com a finalidade de promover o aumento do NO. O inibidor da 5-fosfodiesterase, sildenafil, age potencializando o efeito do NO através da inibição da degradação de GMPc (ASLAN; BRUCE, 2007; WOOD; HSU; GLADWIN, 2008).

Agentes indutores de HbF tais como o dimetilbutirato de sódio e o pomalidomide têm sido avaliados em associação com a HU na AF (KUTLAR *et al.*, 2012) porém com resultados pouco promissores (MEILER *et al.*, 2011).

Recentemente, outra ferramenta terapêutica que está sendo estudada são os inibidores da fosfodiesterase 9 ( PDE9 ). Tendo em vista a importância da via NO, GMPc na indução de HbF, a modulação dos níveis intracelulares de NO e GMPc pode ser efetivo no tratamento da AF. A PDE9 é expressa em células hematopoéticas e é, portanto, um alvo terapêutico promissor (ALMEIDA *et al.*, 2012) Sabendo-se que a PDE9 degrada GMPc com uma afinidade extremamente alta ( $K_m=170\text{nM}$ ) (FISHER *et al.*, 1998), inibir essa enzima altamente expressa em eritrócitos falciformes, pode representar um alvo farmacológico para o aumento intra-eritrocitário de GMPc, com uma consequente indução de HbF. Estudos atuais avaliaram o uso de inibidor de PDE9 associado a HU e demonstraram uma diminuição nas crises de vaso-oclusão em modelo murino falciforme, mediada pela elevação de cGMP, o que sugere que a HU pode ter benefício imediato na definição de CVO (ALMEIDA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2012)

## 2.8 Moduladores genéticos da Anemia Falciforme

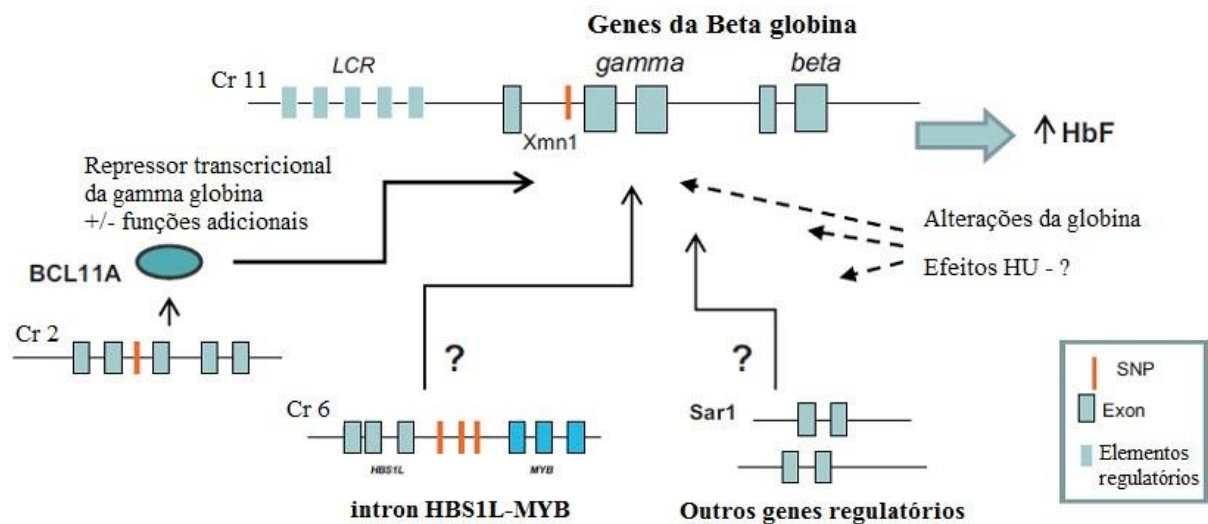
Embora o mecanismo dos processos que influenciam a polimerização da HbS estejam bem caracterizados, a explicação para a heterogeneidade fenotípica e a ampla variabilidade clínica da AF permanece um mistério. Vários são os fatores identificados como moduladores da clínica da AF, entre eles a concentração de HbF, grupos de haplótipos da beta globina e a presença dos polimorfismos como o *BCL11A*, associados a expressão de HbF (LETTRE *et al.*,



2008). A concentração de HbF é bem conhecida como um parâmetro laboratorial crítico, os mesmos estão associados com menor risco de complicações vaso-oclusivas, danos a órgãos e mortalidade (PLATT *et al.*, 1994).

Os haplótipos da  $\alpha$ -globina são padrões de polimorfismos do DNA, na sexta posição da cadeia globínica  $\beta$ , localizados no cromossomo 11 de indivíduos portadores do gene  $\alpha$ . Os haplótipos são classificados de acordo com a região geográfica onde foram identificados: Benin, originário da África ocidental; Bantu (ou Central Africano República), proveniente da África oriental e centro-sul; Senegal, oriundo da África atlântico-ocidental; Árabe-Indiano, encontrado na Índia e Península Arábica e Camarões localizado na costa Africana ocidental (NAGEL, 1984). Além de alterar a concentração da HbF (22), os haplótipos também podem influenciar a gravidade clínica da AF através da presença de SNPs (polimorfismos de nucleotídeos simples) que teriam influência reguladora nos genes da  $\alpha$ -globin (STEINBERG, 2006).

Figura 8 - O locus da beta globina e interação com outros loci em populações normais e de adultos com AF.



Fonte: GREEN; BARRAL, 2011.

Os diferentes SNPs determinantes na regulação da HbF, foram determinados através dos estudos de associação em todo o genoma (GWAS), o qual revelou forte associação com SNPs em três diferentes genes ou loci gênicos, como a maioria fortemente associada com a expressão de HbF: Xmn1-HBG2, HBS1L-MYB, e BCL11A (Figura 8) (GREEN; BARRAL, 2011).

Um único SNP no íntron 2 do oncogene BCL11A no cromossomo 2p16 em populações saudáveis é responsável por 15% da variabilidade de células F. O BCL11A é um fator de transcrição linfóide, indispensável para o desenvolvimento da linhagem linfóide e cuja expressão desregulada está envolvida em leucemias (GREEN; BARRAL, 2011). Estudos em cultura de células precursoras eritróides e *in vivo* em camundongos modificados com AF demonstraram que BCL11A liga-se ao *locus* da globina beta e desempenha um papel direto na inibição na substituição da globina gama pela beta, regulando a expressão de HbF (GALARNEAU *et al.*, 2010).

As variantes intrônicas dos SNPs no gene BCL11A está associado com maior ou menor produção de HbF. Os SNPs do gene BCL11A apresentam-se como dois alelos, sendo que a presença do alelo menos frequente influencia no aumento de HbF, tendo como consequência a redução da expressão do gene *BCL11A*, o que leva a uma diminuição da síntese do fator repressor BCL11A e, conseqüentemente, a uma menor repressão e subsequente um aumento da expressão dos genes  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  que codificam as cadeias  $\gamma$ -globina constituintes da HbF (LETTRE *et al.*, 2008; GREEN; BARRAL, 2011). Desta forma os SNPs do gene BCL11A regulam a expressão de HbF modificando a globina através de uma mutação estrutural que afeta a cinética de crescimento e a diferenciação dos glóbulos vermelhos (THEIN *et al.*, 2009).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar os efeitos da L-arginina como um protocolo terapêutico coadjuvante no tratamento dos pacientes com AF acompanhados no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – UFC

#### **3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar o perfil hematológico através das concentrações de hemoglobina (Hb), hemoglobina Fetal (HbF) e da contagem de reticulócitos;
- ✓ Determinar o perfil bioquímico através das dosagens de uréia, creatinina, aminotransferase alanina sérica (ALT), Aminotransferase aspartato sérica (AST) e lactato desidrogenase (LDH);
- ✓ Avaliar as concentrações séricas de  $\text{NO}_2^-$  e catalase;
- ✓ Validar o método de detecção da HU por UPLC
- ✓ Avaliar as concentrações séricas de HU e correlacionar com a concentração da HbF;
- ✓ Avaliar o perfil inflamatório através das dosagens das citocinas IL-6, IL-10, IL-17 e TGF $\beta$ ;

- ✓ Correlacionar as concentrações séricas de  $\text{NO}_2^-$  e da HbF com as concentrações de TGF- $\beta$ ;
- ✓ Identificar o polimorfismo no gene BCL11A e correlacionar as concentrações de  $\text{NO}_2^-$  e da HbF;

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações Éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Ceará sob protocolo N°110.10.10.

### **4.2 Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo, analítico, desenvolvido segundo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, contidas na Resolução N° 466 / 2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

### **4.3 Casuística**

Foram selecionados 19 pacientes adultos (4 homens e 15 mulheres entre 20 e 40 anos de idade) com diagnóstico clínico e laboratorial de AF confirmado por biologia molecular, em estado basal da doença e em tratamento com HU (Hydréia® 1000mg/dia ou 1500mg/dia) há mais de um ano, em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza, Ceará, no período de fevereiro de 2011 a julho de 2012. Foi prescrito L-arginina (Reforgan® 250 mg – 1vez ao dia) por 12 semanas em associação com HU, com coletas de amostras biológicas realizadas antes do uso da L-arginina+HU (tempo 0), com 4, 8 e 12 semanas de tratamento. O Reforgan® foi dispensado gratuitamente aos pacientes sendo orientados a ingerir juntamente com a Hydréia®. Destes 19 pacientes, 03 pacientes apresentaram reações adversas já previstas para a L-arginina, tais como náuseas, urticárias ou dores de cabeça, e foram orientados a abandonar o tratamento.

#### **4.4 Locais de Estudo**

O estudo foi realizado no HEMOCE, no Laboratório de hemoglobina e doenças genéticas hematológicas (LHDGH), no Laboratório de Toxicologia do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará e no Laboratório Central do Estado do Ceará (LACEN).

#### **4.5 Seleção da Amostra**

Os pacientes foram selecionados aleatoriamente baseando-se em critérios de inclusão e exclusão do estudo. A fase estacionária da doença foi estabelecida de acordo com os critérios de Ballas (2012) tais como ausência de crises dolorosas por quatro semanas consecutivas; nenhuma admissão hospitalar nos últimos 2-3 dias; histórico negativo de transfusão sanguínea durante os 4 meses anteriores; nenhuma intercorrência de infecção ou inflamação nas últimas 4 semanas; nenhum tratamento com medicamentos que possam afetar o hemograma (antibióticos, imunossupressores, entre outros) durante as últimas 3 semanas.

##### **Critérios de Inclusão:**

- Pacientes adultos com AF em uso HU (1000mg/dia).
- Diagnóstico de HbSS confirmada por PCR -RFLP.

##### **Critérios de Exclusão:**

- Pacientes não portadores de AF ou quando se recusarem a participar do estudo, não assinando o TCLE,
- Aqueles que tenham realizado terapêutica transfusional nos últimos três meses  
□ Pacientes em uso de quelante de ferro e de vitaminas antioxidantes.
- Pacientes tabagistas e etilistas, gestantes, portadores de diabetes mellitus e/ou com algum quadro de insuficiência renal ou hepática.

#### **4.6 Coleta**

Após assinatura do TCLE foram coletadas duas amostras de sangue venoso, uma em tubo com heparina, para as dosagens do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ); HU e dos parâmetros bioquímicos LDH,

creatinina, ureia, AST e ALT e das citocinas (IL-6, TGF-beta, IL-10 e IL-17); em tubo contendo anticoagulante EDTA para a realização do hemograma, HbF, contagem de reticulócitos, determinação da catalase(CAT) e polimorfismos BCL11A, sendo a coleta de sangue venoso realizada nos períodos de 0, 4, 8 e 12 semanas de uso concomitante de Larginina +HU.

#### **4.7 Testes Realizados:**

**4.7.1 Dosagem de HbF** (SOUZA *et al.*, 2003): A determinação da concentração de HbF foi realizada através de HPLC.

#### **4.7.2 Dosagem dos níveis plasmáticos de HU:**

##### **Químicos**

Hidroxiuréia (>98 %, 04/04/2013), metiluréia (97%, 04/04/2013)(padrão interno), diacetyl Monoxime ( $C_4H_7NO_2$ ), tiosemicarbazida ( $CH_5N_3S$ ) e cloreto férrico ( $FeCl_3$ ) foram comprados da SIGMA<sup>®</sup> (ST. LOUIS, MO, USA). Cloreto de sódio (NaCl) da LABSYNTH<sup>®</sup> (SP, Brasil), ácido sulfúrico da CROMATOATO PRODUTOS QUÍMICOS LTDA (SP, Brasil), ácido ortofosfórico da TEDIA<sup>®</sup> (RJ, Brasil), ácido tricloroacético e acetonitrila foram comprados da VETEC<sup>®</sup> (RJ, Brasil). Plasma padrão foi obtido do Hemocentro do Estado do Ceará, Brasil.

##### **Soluções**

A solução estoque de HU foi preparada em acetonitrila/água (1:1) na concentração de 10000  $\mu$ M, a qual foi diluída em acetonitrila/água (1:1) para obtenção de concentrações de 8000, 6000, 3200, 2000, 1000, 500 e 250  $\mu$ M. As soluções padrão foram armazenadas em geladeira, com estabilidade de 20 dias. A solução de metiluréia utilizada como padrão interno foi preparada na concentração de 15,5 mM.

A solução colorimétrica (A) foi preparada utilizando-se 0,2 g de tiosemicarbazida, 0,9 g de cloreto de sódio, 0,1 g de diacetyl monoxime em água destilada qsp 100 mL. A solução ácida (B) foi preparada com 6 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), 1 mL de ácido ortofosfórico, acrescentando-se 80 mL de água destilada, dissolvendo-se nesta solução 0,01 g de cloreto férrico e completando-se para 100 mL com água destilada.

### **Condições cromatográficas**

O equipamento de Ultra Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (UPLC) consiste de um sistema de bombeamento, com detector com arranjo de diodos (PDA) (ACCELA THERMO SCIENTIFIC<sup>®</sup>), sistema de aquisição de dados CHROMQUEST 5.0 (THERMO SCIENTIFIC<sup>®</sup>) e coluna analítica de fase reversa NUCLEOSIL C<sub>18</sub> de 5 µm de partícula (250\_4,6 mm) da PHENOMENEX<sup>®</sup> e pré-coluna C<sub>18</sub> (4x30mm). A fase móvel utilizada foi Acetonitrila/água (16,7/83,3) fluxo de 1 /min, comprimento de onda de 440 nm.

### **Preparação da Amostra**

Em um tudo de 10 mL a alíquotas de 400 µL do plasma dos pacientes tratados com HU foram adicionados 80 µL de metilurea, 15,5 mM (Padrão Interno) e 800 µL de ácido tricloroacético 20 % para precipitação das proteínas. Após misturam em vórtex (30 segundos) e centrifugação (3500 rpm por 10 minutos), 1000 µL do sobrenadante foi transferido a outro tubo, adicionando-se 1000 µL da solução A (colorimétrica) e 1000 µL da solução B (reagente ácido). A mistura foi aquecida em banho Maria (100°C) por 10 minutos e em seguida, refrigerada a 4°C por 10 minutos. 25 µL do produto desta reação foram submetidos à análise cromatográfica.

### **Curva de Calibração**

Para a construção da curva de calibração, realizada em triplicata, alíquotas de 400 µL de plasma branco humano (pessoas não tratadas com HU), foram enriquecidas com 100 µL de uma concentração adequada da solução de trabalho padrão de HU para a obtenção das concentrações: 50, 100, 200, 400, 740, 1200 e 1600 µM de HU em plasma. O padrão interno (80 µL, 15,5 mM) foi então adicionado a cada solução e, submetidas ao processo de preparação da amostra e análise cromatográfica especificada anteriormente.

As equações de regressão linear e o coeficiente de correlação foram obtidos dividindo-se as áreas dos picos da HU pela área do padrão interno (HU/PI), plotado em função das respectivas concentrações. Os critérios de aceitação das curvas de calibração incluíram coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,99, desvio menor ou igual a 20 % em relação a concentração nominal para o limite inferior de quantificação e desvio menor ou igual a 15 % em relação a concentração nominal para as outras concentrações das curvas de calibração.

### **Validação**

O processo de validação foi realizado entre julho e outubro de 2012, de acordo com a Resolução - RDC nº 27, de 17/05/2012, do Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

### **Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi definido como a menor concentração quantificada com precisão e exatidão igual ou inferior a 20 %. Foram avaliadas amostras de plasma humano enriquecidas com HU em concentrações tão baixas quanto 50 µM. As amostras foram analisadas em quintuplicata.

### **Linearidade**

A linearidade foi avaliada em concentrações crescentes àquelas empregadas na curva de calibração. A linearidade foi avaliada até a concentração de 1600 µM de HU em plasma. Foram determinadas as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação.

### **Seletividade**

A interferência dos componentes endógenos do plasma foi avaliada através da análise de alíquotas de seis diferentes plasmas obtidos de pessoas não tratadas com HU.

### **Precisão e exatidão**

Para a determinação da precisão e a exatidão foram utilizados controles de qualidade nas concentrações de 100, 740 e 1600 µM de HU em plasma.

Para a avaliação da precisão intra ensaios foram analisadas 05 alíquotas de cada controle em um mesmo dia, ou seja, através de uma única curva de calibração. Para a avaliação da precisão intercorrida foram analisadas alíquotas, em quintuplicata, controles de qualidade em três dias consecutivos. A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento).

A exatidão intra e inter ensaios também foram avaliadas utilizando os resultados experimentais obtidos na precisão. A exatidão foi expressa através do Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de  $\pm 15\%$  (quinze por cento) do valor nominal.



$$\text{EPR} = \frac{\text{Average concentration experimental} - \text{nominal value}}{\text{nominal value}} \times 100$$

### **Protocolo clínico e experimental**

Foram analisados os níveis plasmáticos de HU nos 16 pacientes envolvidos no estudo nos momentos M0, M4, M8 e M12), totalizando 64 plasmas analisados. No entanto encontramos níveis plasmáticos mensuráveis em apenas 22 plasmas, que correspondem a 15 pacientes em diferentes momentos, os demais plasmas apresentaram valores indeterminados, provavelmente devido aos níveis plasmáticos de HU serem menores que o limite de detecção de 50 µM.

A coleta do sangue venoso contendo anticoagulante heparina, não obedeceu a horários pré-estabelecidos de acordo com a farmacocinética da HU tendo em vista que a mesma é ingerida em jejum, e algumas coletas foram realizadas no período da tarde. As amostras de plasma para análise cromatográfica foram obtidas por centrifugação das amostras de sangue a 4000 rpm por 10 minutos e estocadas a -80° C até o tempo de análise. No entanto, a estabilidade da HU durante este período pode ser questionada.

A concentração plasmática de HU nos pacientes analisados foi calculada através das curvas de calibração.

### **4.7.3 Perfil Oxidativo:**

#### **4.7.3.1 Catalase (CAT):**

A atividade da catalase (CAT) nas hemácias foi determinada por método espectrofotométrico, monitorando a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm (DRAPER; HADLEY, 1990). Preparou-se as soluções 1 -TRIS-HCl (1M) (30,27g em 250mL de HCl 1M 6,055g em 50mL de HCl 1M); 2- EDTA 5mM ( 0,365g em 250mL de H<sub>2</sub>O, 0,07305g em 50mL de água destilada e 3- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM (100µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% em 100mL de água Mili-Q). Utilizou-se 250ml da solução 1+ 250ml da solução 2, ajustando o pH 8,0. Dos 100mL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM preparada, retirou-se 10mL. Aos 90mL restantes dessa solução (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM), adicionou-se 5mL do tampão TRIS-EDTA e 4mL de água Mili-Q. Em 990 µl do tampão TRIS-EDTA adicionou-se 10 µl do hemolisado EDTA. A absorbância foi lida a 240nm, a cada um minuto, por 2 min.

**4.7.3.2 Ensaio do NO<sub>2</sub>:** Após o período de incubação, a concentração de nitrito foi determinada segundo o método de GREEN, que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância de 560 nm. Para esta experiência 100  $\mu$ L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0.1% / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em 1% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100  $\mu$ L do plasma e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO<sub>2</sub> (variando de 0,75 à 100  $\mu$ M) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100  $\mu$ L do reativo de Griess a 100  $\mu$ L do plasma e a absorvância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm (GREEN *et al.*, 1982).

#### **4.7.4 Perfil Inflamatório:**

**4.7.4.1 Citocinas (IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-17):** As citocinas IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-17 foram dosadas por Elisa utilizando-se kits da BD- BIOSCIENCES, seguindo o seguinte protocolo:

1. Colocar 100  $\mu$ L/poço de anticorpo de captura em tampão de revestimento. Selar a placa e incubar durante a noite a 4 ° C.
2. Aspirar cada poço e lavar 5 vezes com 250 $\mu$ L/poço. Esperar 1 minuto durante cada passo de lavagem. Bater a placa sobre papel absorvente para remover qualquer tampão residual.
3. Colocar 200  $\mu$ L/poço do diluente de ensaio 1x. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Aspirar / lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.
5. Adicionar 100  $\mu$ L/poço do padrão aos poços apropriados. Executar duas diluições em série das normas de topo para fazer a curva padrão.
6. Adicionar 100  $\mu$ L/poço das amostras aos poços apropriados. Cobrir ou selar a placa e incubar à temperatura ambiente durante 2 horas (ou durante a noite a 4 ° C para a sensibilidade máxima).
7. Aspirar / lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.
8. Adicionar 100  $\mu$ l / poço de anticorpo de detecção. Selar a placa e incubar à temperatura ambiente durante 1 hora.
9. Aspirar / lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.

10. Adicionar 100  $\mu\text{L}$ /poço de avidina-HRP. Selar a placa e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
11. Aspirar e lavar como no passo 2. Repetir um total de 7 lavagens.
12. Adicionar 100  $\mu\text{L}$ /poço de solução de substrato a cada poço. Incubar placa à temperatura ambiente durante 15 minutos.
13. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de solução de parada em cada poço.
14. Realizar a leitura da placa em 450 nm.

#### 4.7.5 Análises moleculares

Primeiramente foi realizada a confirmação da HbSS e em seguida o estudo do polimorfismo no gene BCL11A. Os dois procedimentos foram realizados através da extração do DNA de leucócitos, seguido da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR-RFLP) e por qPCR.

**- Extração do DNA genômico:** O DNA foi isolado de leucócitos, a partir de amostras de sangue total, colhidas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Foram utilizados kits de extração da BIOPUR®.

Após a realização do protocolo de extração, todas as amostras de DNA extraído foram quantificadas no aparelho NANODROP, para posterior amplificação gênica. As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da utilização.

#### **- Confirmação da HbSS**

A confirmação da HbSS e a análise dos haplótipos da mutação  $\beta\text{S}$  foi realizada por meio da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase e polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (CLARK; THEIN, 2004).

A reação foi realizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . No eppendorf foram adicionados 11  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix; 0,25  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo P277; 0,25  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo P278; e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a  $60^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos e extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e 30 segundos; e mais um último ciclo

de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima *Dde I* (3,3 µL de água para injeção; 0,2 µL da enzima *Dde I*; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas (SAIKI *et al.*, 1985).

#### **- Estudo do polimorfismo no gene BCL11A**

Após quantificação em NANODROP (ND-1000; NANODROP TECHNOLOGIES INC., WILMINGTON, DE, EUA), alíquotas de DNA foram utilizadas como molde em reações de PCR quantitativa em tempo real. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (HIGUCHI *et al.*, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada. As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando-se o reagente VIC/FAM, *PCR Master Mix*® (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER CITY, CA, EUA), que além de conter todos os reagentes necessários para a PCR (dNTP's, MgCl<sub>2</sub>, tampão, *Taq Ampli-Gold*), contém o corante *SYBRGreen*, componente intercalante de dupla fita. Além disso, utilizaram-se também amostra de DNA e *primers* específicos para o gene analisado. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER CITY, CA, EUA) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95°C/10minutos, seguindo-se 40 ciclos: 92°C/15segundos – 60°C/1minuto.

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 SEQUENCE DETECTOR SYSTEM® (APPLIED BIOSYSTEMS) e os resultados foram apresentados pelo programa GENEAMP® 5700 SDS (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER CITY, CA, EUA) em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado ciclo de *threshold* ou Ct. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente menor é o Ct.

A caracterização dos polimorfismos no gene BCL11A foi realizado por PCR em tempo real no aparelho APPLIED BIOSYSTEMS de acordo com protocolo do kit da LIFE TECHNOLOGIES®. A análise dos polimorfismos no gene BCL11A foi realizada através dos SNPs rs11886868, rs 4671393 e rs 7557939 por PCR em tempo real (qPCR).

**GENE: BCL11A**

**SNP ID 7557939:** A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 7 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,5 µL do SNP 755; e 5 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 10 minutos; acrescida de 40 ciclos compreendendo desnaturação a 92°C por 15 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto. A análise foi realizada no software do termociclador 7500 REAL TIME PCR SYSTEM (APPLIED BIOSYSTEMS), na função para genotipagem.

**Localização do Cromossomo: Cr.2:** 60721347 - 60721347

**Polimorfismo: A/G, Substituição**

**Sequencia [VIC/FAM]:**

TACATCCTTGAGCTACACAGGCTAA[A/G]CAAGAGTGAGAGAGGGGTGATGCTGA

**SNP ID 4671393:** A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 7 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,5 µL do SNP 467; e 5 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 10 minutos; acrescida de 40 ciclos compreendendo desnaturação a 92°C por 15 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto. A análise foi realizada no software do termociclador 7500 REAL TIME PCR SYSTEM (APPLIED BIOSYSTEMS), na função para genotipagem.

**Localização do Cromossomo: Cr.2:** 60720951 - 60720951

**Polimorfismo: A/G, Substituição**

**Sequencia [VIC/FAM]:**

CCAGTGCTGTGGACAGCAAAGCTTC[A/G]GTGCAGGAAATTAAGATTCCCCCTG

**SNP ID 11886868:** A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 7 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,5 µL do SNP 118; e 5 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 10 minutos; acrescida de 40 ciclos compreendendo desnaturação a 92°C por 15 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto. A análise foi realizada no software do termociclador 7500 REAL TIME PCR SYSTEM (APPLIED BIOSYSTEMS), na função para genotipagem.

**Localização do Cromossomo: Cr.2: 60720246 - 60720246**

**Polimorfismo: C/T, Substituição**

**Sequencia [VIC/FAM]:**

TATCGTCTTTTGTGTTTAATTTCTT[C/T]CACAGAGCAGAATGATTCTGGGATT

#### **4.8 Descarte do material biológico:**

O descarte do material biológico foi realizado segundo a resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

#### **4.9 Análises Estatísticas**

O GraphPrism (versão 5.01) foi o programa utilizado para a realização da análise estatística. O teste de D'Agostino foi utilizado para a verificação da distribuição normal dos dados. As diferenças estatísticas entre os momentos de suplementação com Larginina foram observadas pelos testes Repeated Measures ANOVA- Tukey test as post hoc test or Friedman test – Dunn's test as post hoc test. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (média  $\pm$  EPM). O nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$  para todas as análises.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Análise dos Parâmetros Hematológicos, do Estresse Oxidativo e do Perfil Inflamatório.**

A tabela 1 apresenta os dados hematológicos, do estresse oxidativo e das citocinas dos pacientes com AF em uso da co-administração HU+L-Arginina nos momentos zero, quatro, oito e doze semanas de uso concomitante.

**Tabela 1-** Evolução dos parâmetros hematológicos e do estresse oxidativo e citocinas de pacientes com AF (n=16).

HU+L-arginina		N=16			
Parâmetros	M0	M4	M8	M12	p-valor
<i>Hematológicos</i>					
He (x10 <sup>12</sup> /L)	2,626 ±0,1486	2,669± 0,1320	2,717± 0,1268	2,732± 0,1203	p>0,05
Hb (g/dL)	9,063± 0,3276	9,365± 0,3767	9,313± 0,2775	9,380± 0,2485	p=0,5204
HbF (%) <sup>b</sup>	13,39 ±2,24 <sup>a</sup>	14,48 ±2,186	14,69 ±2,095	15,37 ±2,162 <sup>a</sup>	p=0,0114
VCM(fL)	99,06±3,372	99,17±2,963	99,43±2,944	93,19±6,96	p>0,05
Reticulócitos (/mm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>	173,1 ±25,80 <sup>a</sup>	220,4 ±18,89	231,8 ±25,89	6 276,1 ±20,53 <sup>a</sup>	p= 0,0027
Atividade da Catalase (U/ml)	337,7±27,41	314,3±23,41	287,0±34,05	282,6±38,5 5	p>0,05
Nitrito (µM) <sup>a</sup>	4,569±0,9692 <sub>ab</sub>	7,207±1,717 <sup>a</sup> <sub>c</sub>	11,10±1,822 <sup>b</sup>	13,29±3,12 8 <sup>a</sup>	p<0,0001
<i>Citocinas</i>					
IL-17 (pg/ml)	5,074±0,8120 <sub>a</sub>	5,498±0,8594	8,385±1,496	9,026±1,71 0 <sub>a</sub>	p=0,0075
IL-6 (pg/ml)	13,37±3,413	12,10±2,910	11,96±2,353	14,16±3,67 7	p>0,05
IL-10 (pg/ml)	6,612±1,589	6,123±1,432	5,962±1,429	4,361±1,61 9	p=0,0089
TGF-β (pg/ml)	3683±935,1	2693±570,5 <sup>a</sup>	3432±1257	5125±1337 <sup>a</sup>	p=0,0462

Os resultados foram expressos em média±erro padrão da média (EPM).

M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina;

M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina;

M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina;

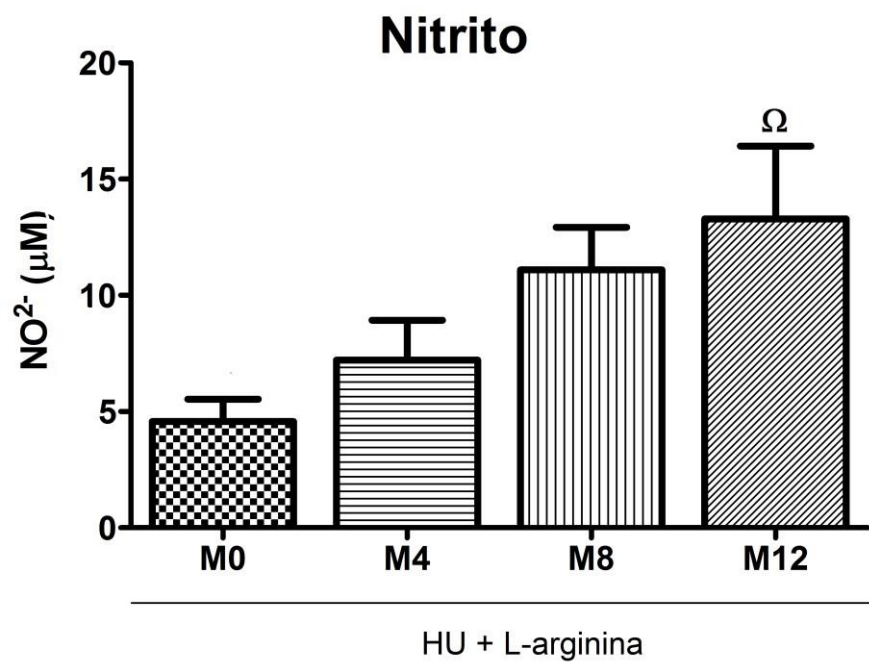
M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com Larginina;



<sup>a</sup>estatisticamente significativa com M12; <sup>b</sup> estatisticamente significativa com M8; <sup>c</sup> estatisticamente significativa com M4

Os resultados mostram que os pacientes tratados com HU+ suplementação de L-arginina apresentaram significativo aumento das concentrações de nitrito após 12 semanas comparadas ao momento zero ( $p < 0,05$ ) Figura 9.

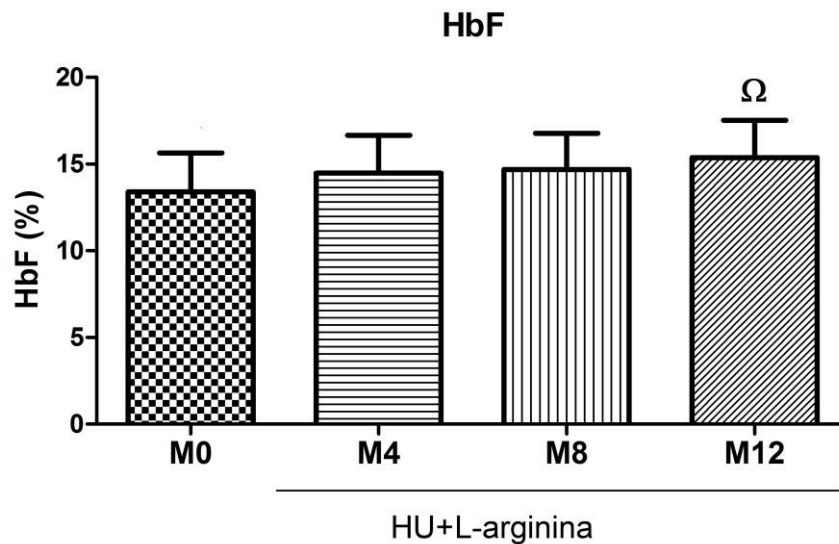
Figura 9 – Concentrações de Nitrito em pacientes com AF tratados com HU+L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina; Ω estatisticamente significativa

O uso da associação HU+ suplementação de L-arginina induziu significativo aumento das concentrações de HbF após 12 semanas comparadas ao momento zero ( $p < 0,05$ ) Figura 10.

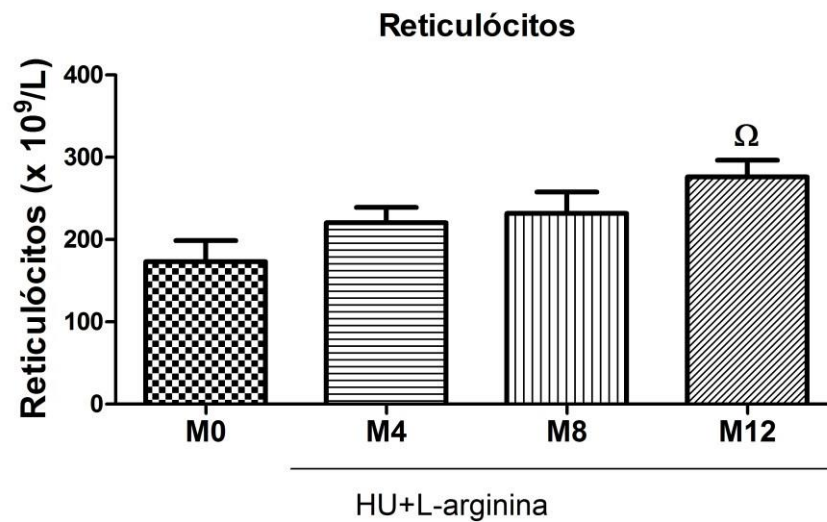
Figura 10 – Concentrações de HbF em pacientes com AF tratados com HU+L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina; Ω estatisticamente significativo

O uso da associação HU+ L-arginina induziu significativo aumento da contagem de reticulócitos após 12 semanas comparadas ao momento zero ( $p < 0,05$ ) Figura 11.

Figura 11 – Contagem de Reticulócitos em pacientes com AF tratados com HU+L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



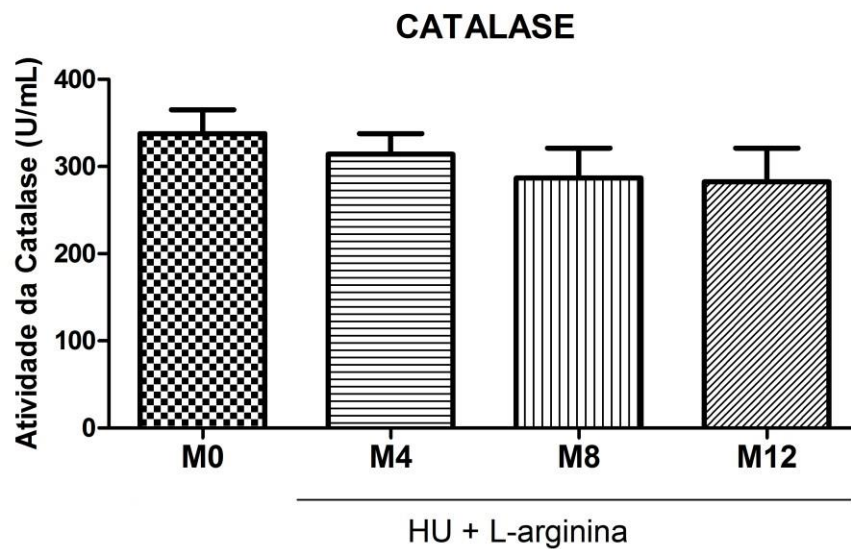
M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU

com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina;  $\Omega$  estatisticamente significativa

A associação HU+ suplementação de L-arginina não modificou a atividade da catalase.

Figura 12.

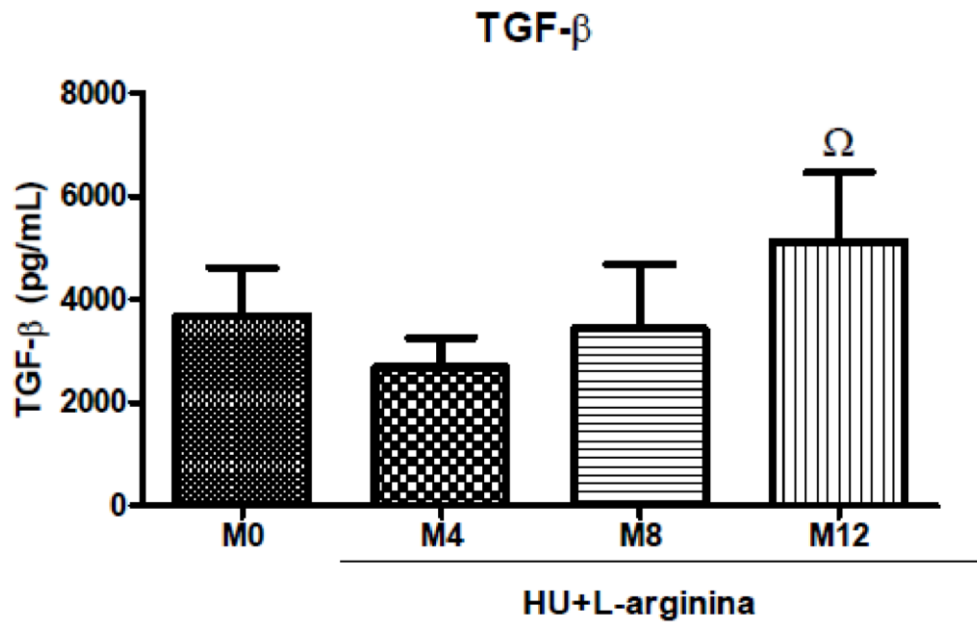
Figura 12 – Atividade da Catalase em pacientes com AF tratados com HU+L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

Houve aumento significativo das concentrações de TGF- $\beta$  após 12 semanas de uso da associação HU+L-arginina quando comparados a quatro semanas de uso da associação ( $p=0,0462$ ) (Figura 13).

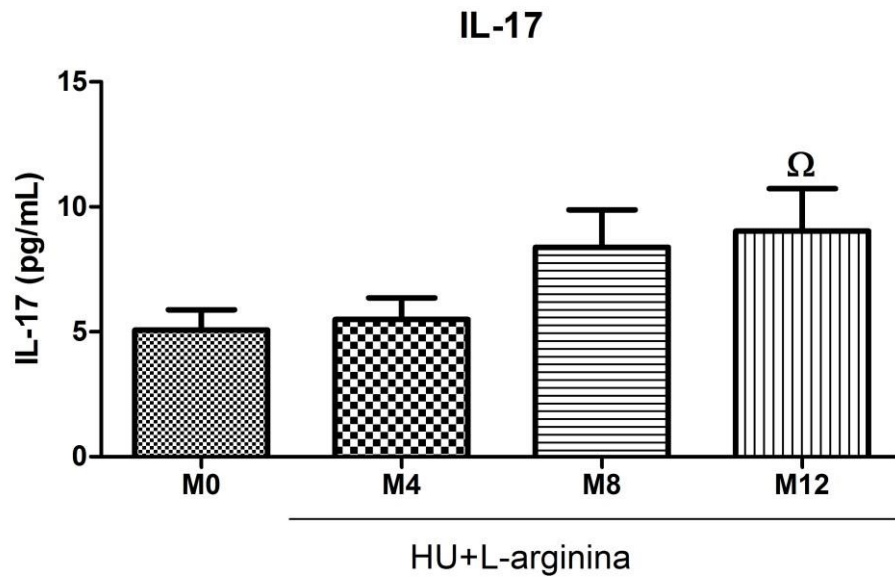
Figura 13 – Concentrações de TGF- $\beta$  em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina;  $\Omega$  estatisticamente significativa

A IL-17 apresentou um aumento significativo após 12 semanas de uso da associação HU+L-arginina quando comparados a momento zero ( $p=0,0075$ ) (Figura 14).

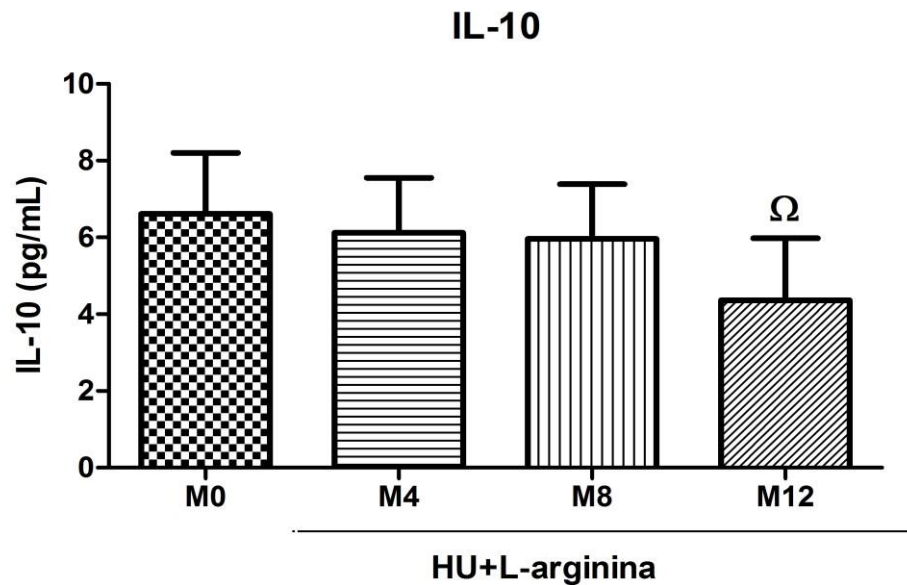
Figura 14 – Concentrações de IL- 17 em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina; Ω estatisticamente significante

A IL-10 apresentou uma redução significativa entre os momentos zero doze semanas de uso da associação (p= 0,0328) Figura 15.

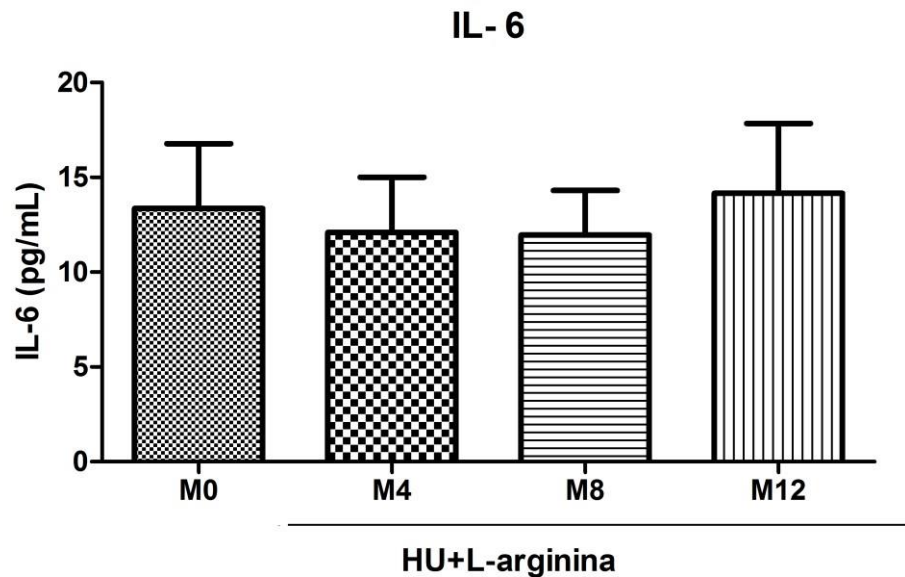
Figura 15 – Concentrações de IL-10 em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina; Ω estatisticamente significante

Para a IL-6, não houve diferença significativa quando comparamos entre os diferentes momentos de uso de HU+L-arginina (Figura 16)

Figura 16 – Concentrações de IL-6 em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

### Correlação entre TGF- $\beta$ , NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e HbF

A tabela 2 apresenta a correlação entre os concentrações séricos de TGF- $\beta$  com os concentrações de nitrito e HbF dos pacientes que faziam co-administração HU+L-Arginina nos momentos zero, quatro, oito e doze semanas de uso concomitante.

**Tabela 2** - Correlação entre TGF- $\beta$ , NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e HbF nos diferentes momentos de uso da associação HU+L-arginina

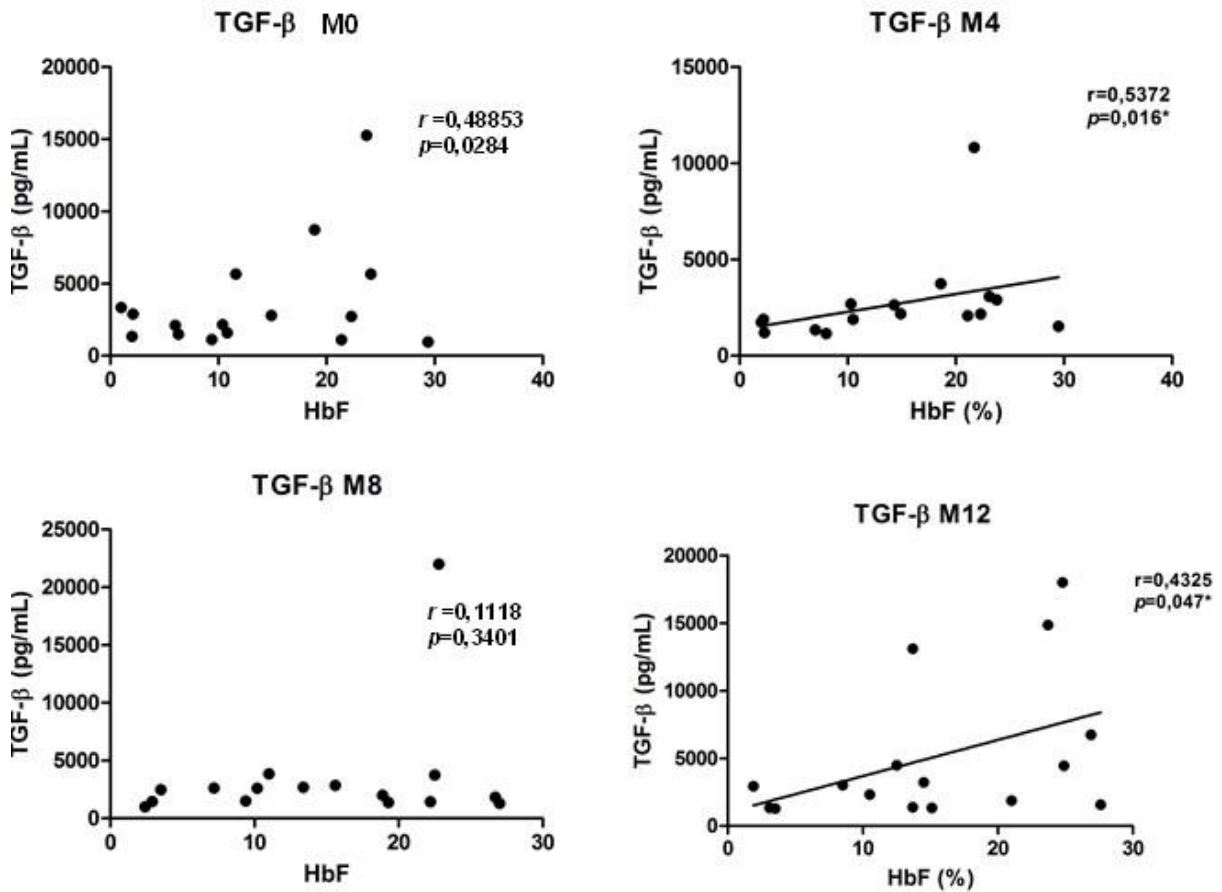
		TGF- $\beta$			
		M0	M4	M8	M12
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	p-valor	0,028*	0,410	0,467	0,471
	R	0,4853*	-0,0618	0,0220	-0,0192
HbF	p-valor	0,336	0,016*	0,340	0,047*
	R	0,1147	0,5372*	0,118	0,4325*

M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina; \*Coeficiente de correlação de Spearman (r) e valor de p.

– Concentrações de IL-  
-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.

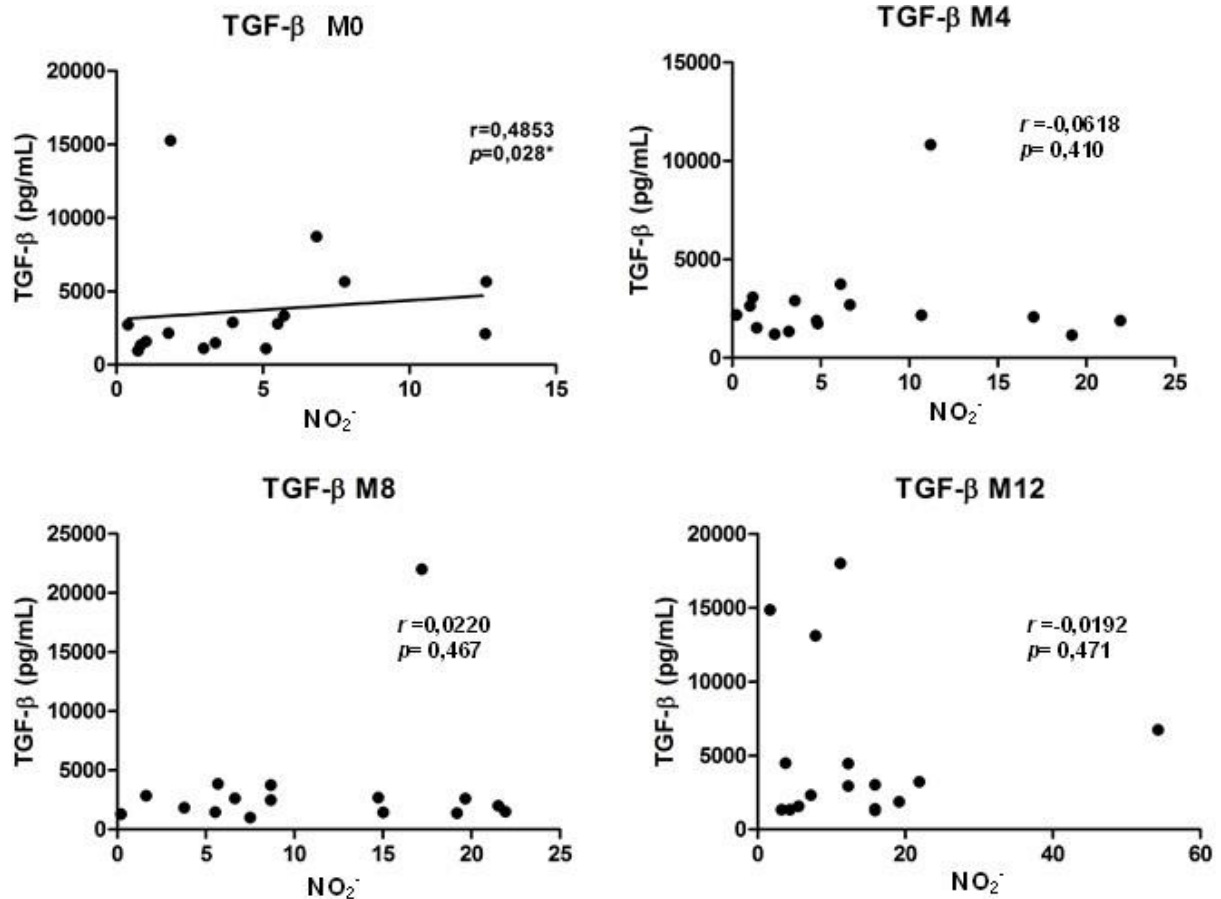


Figura 17- Correlação entre TGF- $\beta$  e HbF, nos diferentes momentos de uso da associação HU+Larginina



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina

Figura 18 - Correlação entre TGF- $\beta$  e  $\text{NO}_2^-$ , nos diferentes momentos de uso da associação HU+Larginina.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina

## 5.2 Padronização e Validação do método de Análise de Hidroxiuréia em Plasma

As Figuras 19 e 20 mostram respectivamente a análise cromatográfica de um plasma branco enriquecido com soluções de HU e metilureia (padrão interno) e plasma de paciente com AF em uso de HU 1000 mg/dia. Observou-se que o tempo de retenção da HU, urea e metilureia foram respectivamente de 6,763 min, 7,778 min e 11,472 min.

Figura 19 – Cromatograma de plasma branco enriquecido com Hidroxiureia 1200uM e Metilureia 15,5mM (padrão interno).

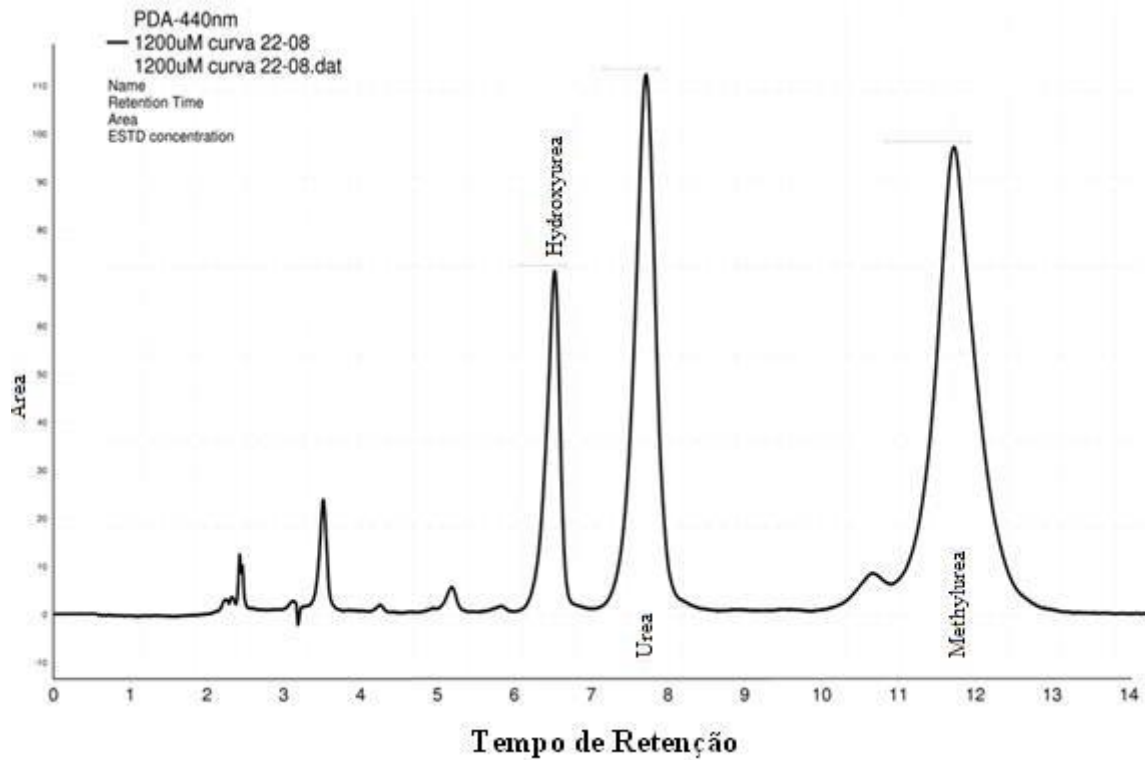
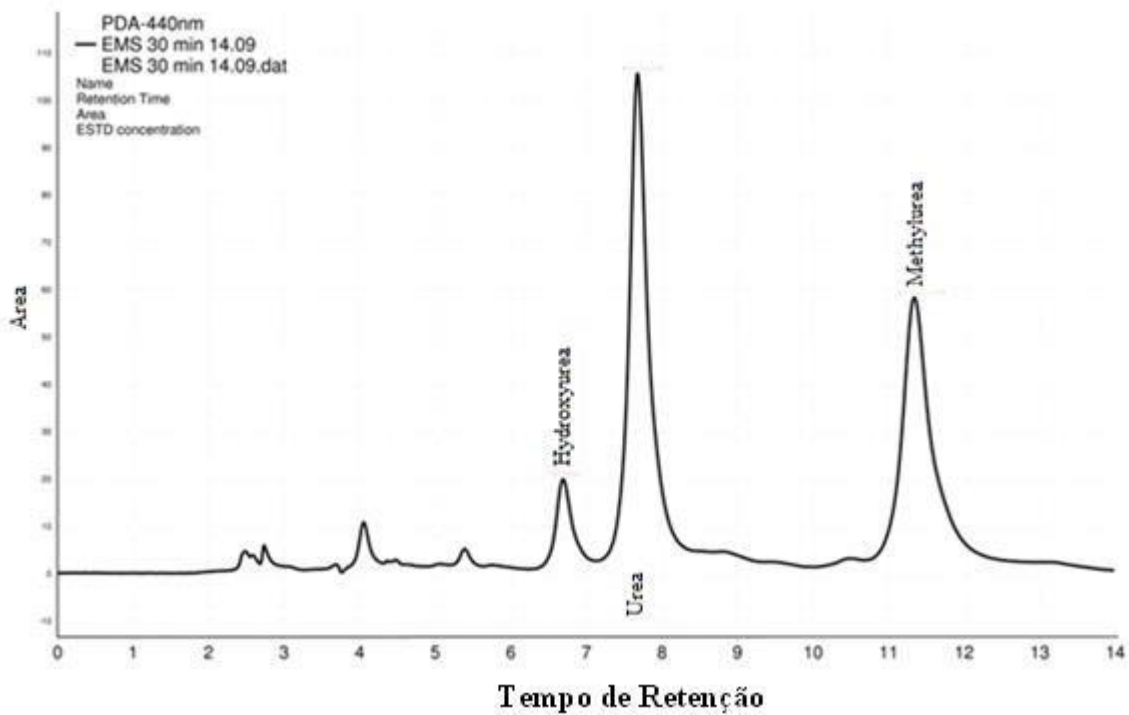


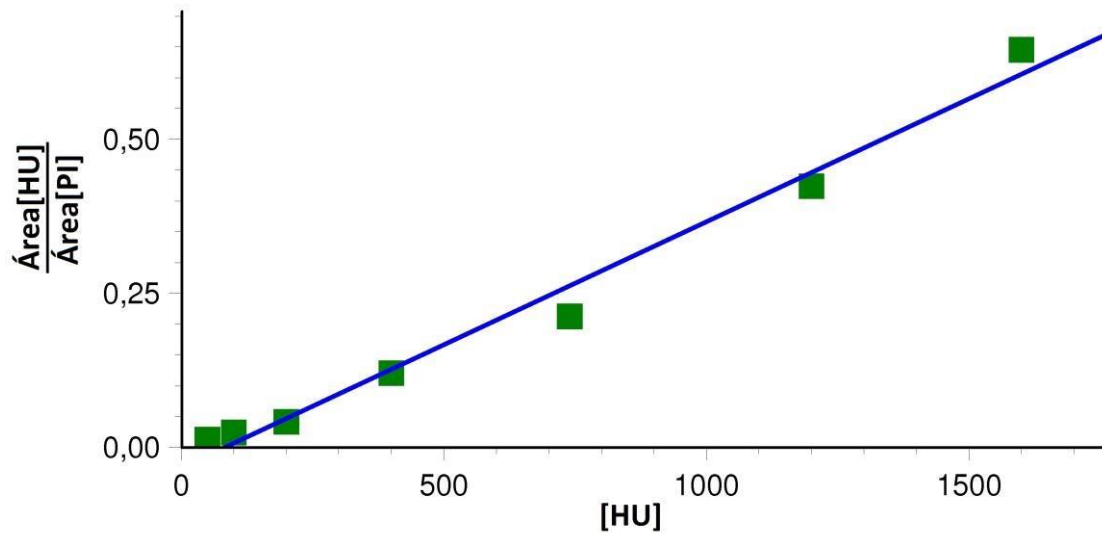
Figura 20 – Cromatograma de plasma de paciente com AF em terapia com Hidroxiurea 1000mg/dia enriquecido com Metilureia 15,5mM (padrão interno).



### Curva de Calibração

A Figura 21 mostra a curva de calibração no intervalo de 50-1600  $\mu$ M de HU em plasma humano. O coeficiente de correlação foi de 0,9908.

Figura 21 – Curva de calibração da HU no intervalo de 50-1600  $\mu\text{M}$  de HU em plasma humano.



### Validação do Método

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos na validação do método de análise da HU em plasma humano. O coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido indica a existência de relação linear entre a área e a concentração da HU. O método apresentou limite de quantificação, seletividade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação na análise da concentração de HU em pacientes tratados em regime de dose múltipla.

**Tabela 3 - Limites de confiança do método de análise da Hidroxiurea**

**Hidroxiureia**

<b>Linearidade (50-1600 µM)</b>	
Equação da reta	$y = 0,000288x - 0,002852$
R	0,990844
<b>Limite de Quantificação (50 µM)</b>	
Precisão (CV%, n=5)	13,45
Exatidão (EPR, n=5)	4,96
<b>Precisão intracorrída (CV%) n=5</b>	
100 µM	2,22
740 µM	2,52
1200 µM	4,52
<b>Precisão intercorrída (CV%) n=15</b>	
100 µM	6,39
740 µM	7,04
1200 µM	10,38
<b>Exatidão intracorrída (EPR %) n=5</b>	
100 µM	0,80
740 µM	-4,26
1200 µM	-5,94
<b>Exatidão intercorrída (EPR %) n=15</b>	
100 µM	-1,35
740 µM	-2,50
1200 µM	3,32

CV = coeficiente de variação [(SD/média)x 100];  
r=coeficiente de correlação linear.  
EPR= [(Cmédia experimental-Cadicionada)/Cadicionada]x100

### **Análise dos Pacientes**

Foram analisados as concentrações plasmáticas de HU nos 16 pacientes envolvidos no estudo (nos momentos M0, M4, M8 e M12), totalizando 64 plasmas analisados. No entanto encontramos concentrações plasmáticas mensuráveis em apenas 22 plasmas, que correspondem a 15 pacientes em diferentes momentos, os demais plasmas apresentaram valores indeterminados, provavelmente devido às concentrações plasmáticas de HU serem menores que o limite de detecção de 50 µM.

Foram 15 pacientes analisados (3 homens e 12 mulheres, idade variando entre 20 e 40 anos) com diagnóstico clínico e laboratorial de AF tratados com HU por mais de um ano, 1000 mg/dia (13

pacientes) e 1500mg/dia (2 pacientes), e as concentrações médias obtidas no plasma destes pacientes foram de 190,88  $\mu\text{M}$  e 302,71  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 4).

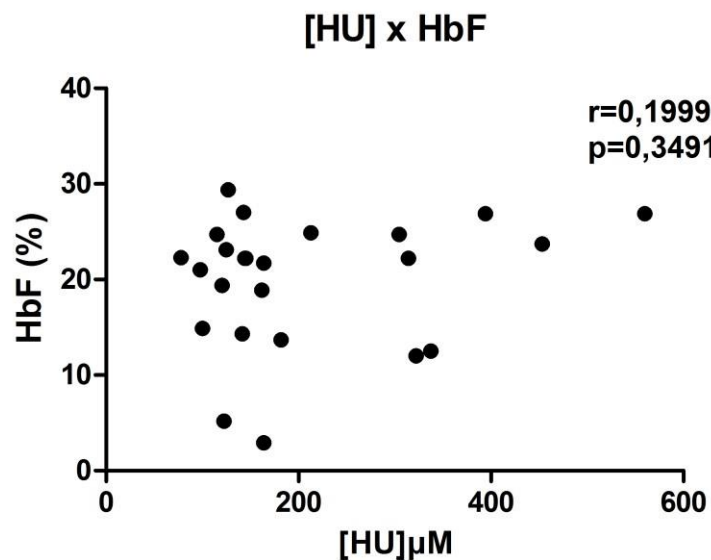
**Tabela 4** – Média das concentrações de HU de pacientes com AF.

Concentração ingerida (mg/dia)	Média das Concentrações ( $\mu\text{M}$ )
1000	190,88
1500	302,71

### Correlação da HU com HbF

A figura 22 apresenta a correlação entre os concentrações séricos de HU e os concentrações de HbF de 15 pacientes com AF em uso de HU+L-arginina. Não houve correlação entre as concentrações de HU e as concentrações de HbF nos pacientes que apresentaram concentrações plasmáticas superiores ao limite de detecção.

Figura 22 – Correlação das concentrações séricas de HU x concentrações de HbF em 15 pacientes com AF em uso de HU+L-arginina.



### 5.3 Análise dos Polimorfismos

Inicialmente realizamos a comparação dos genótipos de cada SNP do gene BCL11A com a média da HbF no momento basal. Em relação ao SNP rs11886868, embora alguns dos genótipos só possuam um paciente, o que prejudicou a análise, foi verificada uma tendência entre as diferenças entre os três genótipos, sendo que a diferença entre o genótipo (CC) e o (TT), foi a mais realçada, enquanto não houve diferença entre os genótipos (CC) e (CT) ( $p=0,4107$ ). Além disso observou-se que no genótipo CC nenhum indivíduo tem HbF < 5% enquanto o genótipo TT apresentou HbF < 5% (Tabela 5).

**Tabela 5** – Estatística descritiva relativa à concentração de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs11886868.

Genótipo	N	HbF	HbF<5	HbF≥5	Valor de p
<b>rs11886868</b>		<b><u>Momento Basal</u></b>			
CC	4	18,10 ± 2,784*	0	4	p = 0,4107
CT	10	14,88 ± 3,003	2	8	
TT	1	2,0 ± 0,0*	1	0	

N = n° de indivíduos

Quando comparou-se os genótipos do SNP rs4671393 com a HbF foi verificada uma tendência entre as médias da HbF entre os genótipos (AA) e (GG) e entre os genótipos (AG) e (GG), embora não tenha apresentado diferença estatística ( $p=0,0765$ ). Além disso, observouse que nos genótipos (AA) e (AG) todos os indivíduos apresentaram HbF ≥ 5% enquanto no genótipo (GG) 57,14% apresentaram HbF < 5% (Tabela 6).

**Tabela 6** – Estatística descritiva relativa a concentração de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs4671393.

Genótipo	N	HbF	HbF<5	HbF≥5	Valor de p
<b>rs4671393</b>		<b><u>Momento Basal</u></b>			
AA	1	18,9 ± 0,0*	0	1	p = 0,0765
AG	7	18,16 ± 2,700	0	7	
GG	7	11,03 ± 3,814*	4	3	

N = n° de indivíduos

Em relação aos genótipos do SNP rs7557939 verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as médias da HbF dos genótipos (AA) e (AG) e entre os genótipos (AA) e (GG) ( $p=0,0137$ ). Além disso, observou-se que no genótipo (AA) 75% dos

indivíduos apresentaram HbF<5% enquanto nos genótipo (AG) e (GG) todos os indivíduos apresentaram HbF  $\geq$  5% (Tabela 7).

**Tabela 7** – Estatística descritiva relativa a concentração de HbF associados a cada genótipo do polimorfismo rs7557939.

Genótipo	N	HbF	HbF<5	HbF $\geq$ 5	Valor de p
<b>rs7557939</b>		<b><u>Momento Basal</u></b>			
AA	4	7,200 $\pm$ 5,506*	3	1	p = 0,0137
AG	7	17,43 $\pm$ 2,814	0	7	
GG	4	18,10 $\pm$ 2,784*	0	4	

N = n° de indivíduos

Uma vez que se verificou uma tendência nas comparações múltiplas entre os genótipos quanto ao nível de HbF, analisou-se se os genótipos de cada polimorfismos, determinava a resposta a terapia associada HU +L-arginina através dos parâmetros HbF e NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nos diferentes momentos de uso da associação. Observou-se que em todos os SNPs (rs11886868; rs4671393; rs7557939) houve aumento da HbF quando comparamos o momento 12 em relação ao momento inicial, porém não significativo (Tabela 8, Tabela 9 e Tabela10).

Quando avaliamos a resposta a associação HU + L-arginina através das concentrações médias de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> verificou-se que em todos os genótipos dos SNPs houve aumento dos níveis de nitrito estatisticamente significativo. No polimorfismo rs 11886868 para o genótipo CC houve diferença entre o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no momento 8 em relação ao momento inicial (p=0,0271), quanto ao CT houve diferença entre o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no momento 12 em relação ao momento inicial ( p=0,0161) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Associação entre o valor de HbF e os genótipo do SNP rs11886868 no gene BCL11A nos diferentes momentos de uso da associação HU+L-arginina

Genótipo	N	HbF M0	HbF M4	HbF M8	HbF M12	Valor de p
<b>rs11886868</b>						
CC	3	18,90 $\pm$ 3,889	21,20 $\pm$ 3,653	22,20 $\pm$ 3,834	24,80 $\pm$ 4,117	0,0631 0,3707
CT	7	13,10 $\pm$ 4,013	13,86 $\pm$ 3,885	14,11 $\pm$ 3,756	14,27 $\pm$ 3,852	
TT	1	2	2.3	2.9	3.1	
<b>rs11886868</b>		<b>NO<sub>2</sub>- M0</b>	<b>NO<sub>2</sub>- M4</b>	<b>NO<sub>2</sub>- M8</b>	<b>NO<sub>2</sub>- M12</b>	
CC	3	3,486 $\pm$ 1,673 <sup>b</sup>	11,00 $\pm$ 3,540	12,64 $\pm$ 3,529 <sup>b</sup>	9,091 $\pm$ 2,672	<b>0,0271</b> <b>0,0161</b>
CT	7	4,650 $\pm$ 1,522 <sup>a</sup>	4,281 $\pm$ 0,9046 <sup>a</sup>	8,303 $\pm$ 2,557	11,08 $\pm$ 2,557 <sup>a</sup>	
TT	1	0,827	2,397	5,538	3,259	

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).



<sup>a</sup>estatisticamente significativa com M12 ; <sup>b</sup> estatisticamente significativa com M8; <sup>c</sup> estatisticamente significativa com M4; M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

Em relação ao polimorfismo rs4671303 verificou-se aumento estatisticamente significativa das concentrações de médias de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> para o genótipo GG entre o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no momento 12 em relação ao momento inicial (p=0,0387) (Tabela 9).

**Tabela 9** - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do SNP rs4671393 no gene BCL11A

Genótipo	N	HbF M0	HbF M4	HbF M8	HbF M12	Valor de p
<b>rs 4671393</b>						
AA	1	18,90	21,20	22,20	24,90	0,5676
AG	4	18,58 ± 4,750	19,00± 4,202	19,10± 3,580	20,18± 3,589	
GG	6	8,917±3,757	9,250±3,630	9,850±3,833	9,933±3,894	
<b>rs 4671393</b>		<b>NO<sub>2</sub>_ M0</b>	<b>NO<sub>2</sub>- M4</b>	<b>NO<sub>2</sub>_ M8</b>	<b>NO<sub>2</sub>- M12</b>	
AA	1	6,832	17,0257	15,024	12,283	0,1175
AG	4	1,343±0,2773	4,592±2,361	6,658±3,629	6,232±1,697	
GG	6	5,272±1,643 <sup>a</sup>	4,995±0,7248	9,987±2,466	11,81±2,224 <sup>a</sup>	
						<b>0,0387</b>

Os resultados foram expressos em média±erro padrão da média (EPM). <sup>a</sup>estatisticamente significativa com M12 ; <sup>b</sup> estatisticamente significativa com M8; <sup>c</sup> estatisticamente significativa com M4 ; ; M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

Para o polimorfismo rs7557939 verificou-se aumento estatisticamente significativa das concentrações médias de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> para o genótipo (AA) entre o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no momento 12 em relação ao momento inicial (p=0,0289) e para o genótipo GG houve aumento estatisticamente significativa entre o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> do momento 8 em relação momento inicial (p=0,0271) (Tabela 10).

**Tabela 10** - Estatística descritiva relativa aos níveis de HbF associados a cada genótipo do SNP rs7557939 no gene BCL11A

Genótipo	N	HbF M0	HbF M4	HbF M8	HbF M12	Valor de p
<b>rs 7557939</b>						
AA	3	1,700±0,3512	2,167±0,08819	2,933±0,3180	2,833±0,4807	0,1495
AG	5	17,72±3,887	18,56±3,514	18,58±3,484	18,90±3,514	0,6580
GG	3	17,67±3,889	17,80±3,653	18,67±3,834	20,73±4,117	0,0631
<b>rs 7557939</b>		<b>NO<sub>2</sub>_ M0</b>	<b>NO<sub>2</sub>- M4</b>	<b>NO<sub>2</sub>_ M8</b>	<b>NO<sub>2</sub>- M12</b>	<b>0,0289</b>

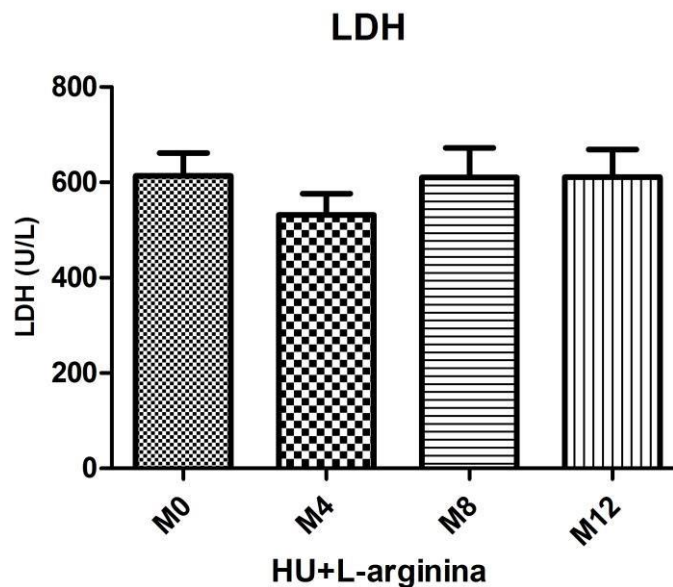
AA	3	3,506±1,432 <sup>a</sup>	4,717±1,307	7,243±0,9166	10,82±3,444 <sup>a</sup>	0,1661 <b>0,0271</b>
AG	5	4,572 ± 2,186	3,643 ± 1,119	8,386 ± 3,701	9,869 ± 2,584	
GG	3	3,486 ± 1,673 <sup>b</sup>	11,00 ± 3,540	12,64 ± 3,529 <sup>b</sup>	9,091 ± 2,672	

Os resultados foram expressos em média±erro padrão da média (EPM). <sup>a</sup>estatisticamente significativa com M12 ; <sup>b</sup> estatisticamente significativa com M8; <sup>c</sup> estatisticamente significativa com M4 ; ; M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

#### 5.4 Análise dos Parâmetros Renais, Hepáticos e Marcador de Hemólise

A figura 23 apresenta as concentrações do marcador de hemólise avaliado a lactato desidrogenase láctica (LDH) nos pacientes com AF em uso da co-administração HU+LArginina nos momentos zero, quatro, oito e doze semanas de uso concomitante. A associação não reduziu a hemólise nestes pacientes.

Figura 23 – Concentrações de LDH em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.

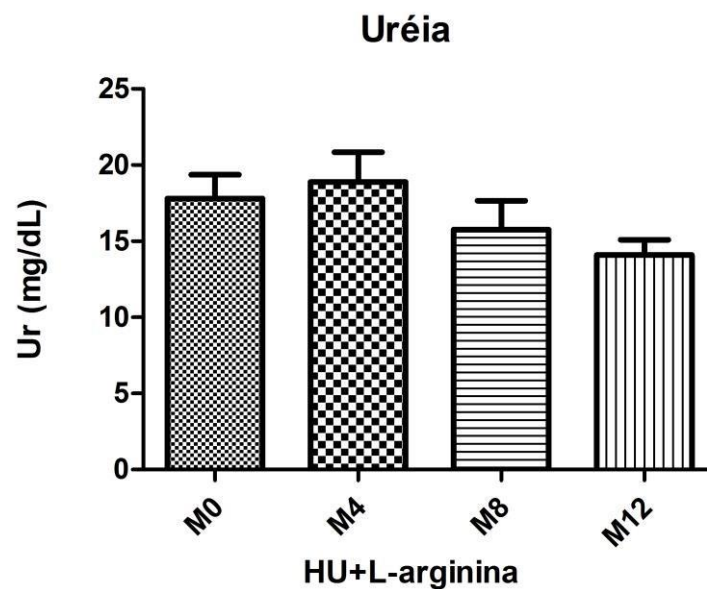


M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

As figura 24 e 25 apresentam as concentrações dos marcadores renais, uréia (Ur ) e creatinina (Cr) nos pacientes com AF em uso da co-administração HU+L-Arginina nos

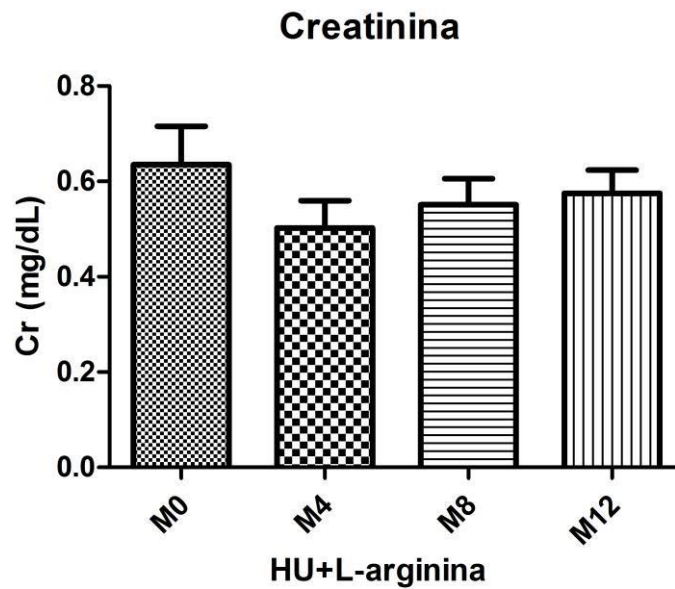
momentos zero, quatro, oito e doze semanas de uso concomitante. A associação não alterou a função renal nestes pacientes.

Figura 24 – Concentrações de Uréia em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

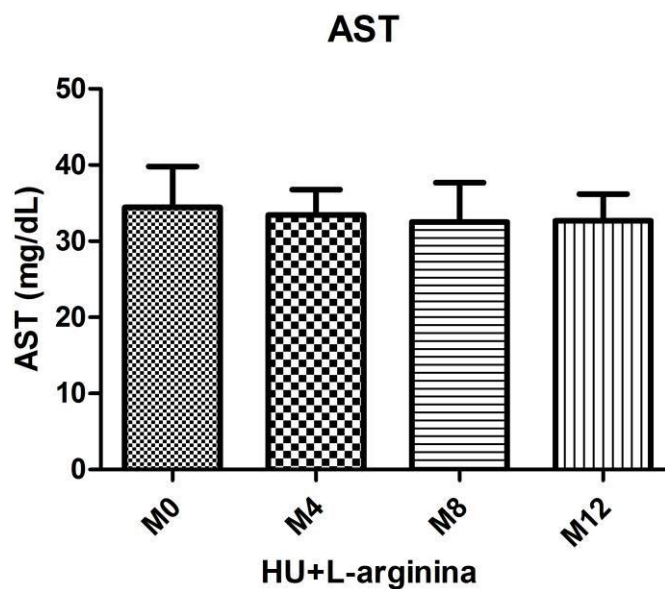
Figura 25 – Concentrações de Creatinina em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

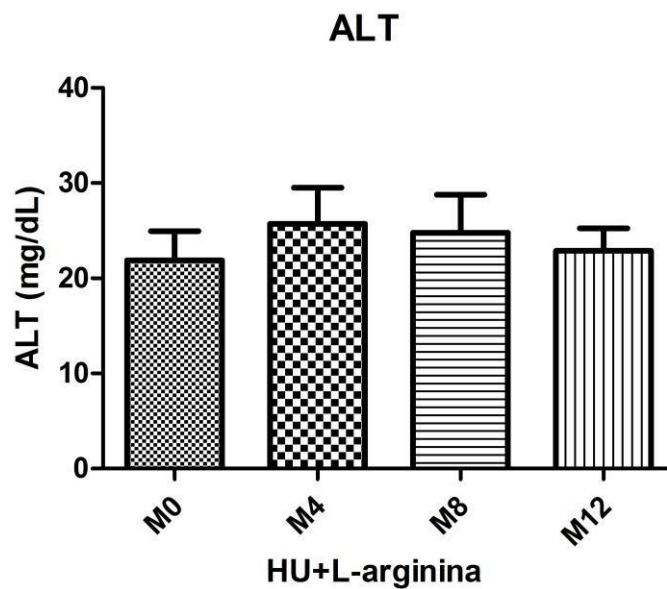
As figura 26 e 27 apresentam as concentrações dos marcadores hepáticos, AST e ALT nos pacientes com AF em uso da co-administração HU+L-Arginina nos momentos zero, quatro, oito e doze semanas de uso concomitante. A associação não alterou a função hepático nestes pacientes.

Figura 26 – Concentrações de AST em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



AST- aspartato aminotransferase; M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

Figura 27 – Concentrações de ALT em pacientes com AF tratados com HU com suplementação de L-arginina por 0, 4, 8 e 12 semanas.



ALT- alanina aminotransferase; M0 – Pacientes com AF tratados com HU com 0 semanas de suplementação com L-arginina; M4– Pacientes com AF tratados com HU com 4 semanas de suplementação com L-arginina; M8– Pacientes com AF tratados com HU com 8 semanas de suplementação com L-arginina; M12– Pacientes com AF tratados com HU com 12 semanas de suplementação com L-arginina.

## 5.5 Eventos Adversos

Um total de três eventos adversos foram relatados. Não foram observados eventos adversos graves relacionados com a L-arginina, embora todos os eventos relatados ocasionaram a interrupção do fármaco em estudo. Os pacientes relataram náuseas, urticárias ou dores de cabeça durante o uso do fármaco em estudo, sendo orientados a interromper o uso do fármaco e retirados do ensaio devido aos eventos adversos, possivelmente relacionados ao fármaco em estudo. Não observamos aumento clínico relevante das transaminases hepáticas e dos parâmetros renais. Em geral a arginina foi bem tolerada, pois os eventos adversos apresentados já são previstas na literatura (RERIANI *et al.*, 2010).

## 6 DISCUSSÃO

Nos propomos a avaliar o efeito da L-arginina como um fármaco coadjuvante ao tratamento com a HU, sugerindo um novo protocolo terapêutico para AF, visando o aprimoramento da terapia com a HU, em busca da dose terapêutica ideal que apresente menos efeitos carcinogênicos com uso contínuo.

No presente estudo verificou-se aumento significativo dos níveis de nitrito, HbF e reticulócitos, quando comparamos os mesmos pacientes em relação a diferentes momentos de uso da associação HU+L-arginina, o que demonstra que a suplementação com a L-arginina promove um aumento da biodisponibilidade deste substrato com melhora da resposta ao tratamento com a HU.

O aumento nos níveis de Nitrito e de HbF nos pacientes com 12 semanas de uso de HU+L-arginina em relação ao momento inicial demonstra que a associação induz a uma melhor resposta terapêutica a HU e confirma que a ação da HU envolve uma via dependente de NO

provocando um maior consumo de L-arginina, substrato que está reduzido nos pacientes com AF e que limita a resposta a HU. Nossos resultados corroboram com a literatura, que demonstram *in vitro* que a indução de HbF em células progenitoras ocorre através da NOS (óxido nítrico sintetase) e da GCs (guanilato ciclase solúvel) (COKIC *et al.*, 2008) e de estudo em camundongos transgênicos com anemia falciforme que há depleção crônica dos níveis de arginina, e quando tratados com L-arginina ocorre aumento dos níveis de NO (DASPUGTA *et al.*, 2006). Outros estudos demonstram que a suplementação oral de L-arginina na presença ou não de crises vaso-oclusivas leva ao aumento da concentração plasmática de óxido nítrico em pacientes com AF (MORRIS *et al.*, 2003; MORRIS *et al.*, 2013; SULIVAN *et al.*, 2010;).

Quanto aos reticulócitos houve um aumento nos pacientes em uso HU+L-arginina com 12 semanas em relação ao momento inicial, demonstrando que a arginina atua estimulando a eritropoese. Baliga *et al.* (2010), avaliou o efeito da associação da HU+L-arginina na síntese de hemoglobina fetal pela unidade formadora de colônia eritróide (BFU-E), demonstrando síntese ótima de HbF e mínima citotoxicidade induzida por HU+L-arginina com doses de 0, 15, 25, 100 uM de HU e 0, 25, 50 e 100 uM de Arginina. Nossos resultados corroboram com o de Baliga *et al.* (2010) sugerindo que a indução da síntese de HbF é dependente da ação do NO, o qual ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) e produz cGMP, aumentando a expressão de cadeias globínicas gama sobre as células progenitoras eritróides.

A terapia com HU em pacientes com AF tem comprovada eficácia clínica e laboratorial. Administrada em concentrações de 15 a 25 mg/kg/dia, pode induzir a um aumento de 10 a 40% da HbF. No entanto, a variabilidade da resposta terapêutica é elevada, podendo estar associada a fatores farmacogenéticos que levam a características fenotípicas de metabolizadores rápidos ou lentos. Diante desta variação, se busca o uso terapêutico seguro, evitando a cito e genotoxicidade da droga, através de um esquema terapêutico padrão baseado na farmacocinética da HU e buscando-se o ajuste de doses, através da monitorização terapêutica (STEINBERG *et al.*, 2010).

Com o intuito de estabelecer um esquema terapêutico padrão baseado na farmacocinética da HU em pacientes com AF, foi necessário o desenvolvimento e validação de um método para quantificação da HU em plasma humano. Este método foi desenvolvido baseado nos métodos de Manouilov *et al.* (1998) e Bachir *et al.* (2007). Foram realizadas modificações no preparo da amostra, com menor volume de plasma necessário e para a reação colorimétrica não foram utilizados kits comerciais, além de ter sido utilizado a UPLC com detector diiodo (UV) que é um método que apresenta uma melhor resolução dos cromatogramas



analisados. Estas alterações culminaram em uma maior sensibilidade do método, apresentando um menor limite de quantificação e uma redução do tempo de análise, sendo realizada a validação do mesmo.

Desta forma, desenvolvemos um método preciso e exato que pode ser utilizado para determinação quantitativa das concentrações plasmáticas de HU para monitoramento terapêutico de pacientes com AF, através de UPLC com detector diiodo (UV). Foi utilizada coluna analítica de fase reversa (NUCLEOSIL C<sub>18</sub>), fase móvel constituída de acetonitrila/água (16,7/83,3), fluxo de 1 mL/min e comprimento de onda de 440 nm.

Observou-se que o tempo de retenção da HU, ureia e metilureia foram respectivamente de 6,7; 7,7 e 11,4 minutos. No processo de validação foram estabelecidos parâmetros como: limite de quantificação, curva de calibração, linearidade, precisão e exatidão intra e interensaios, de acordo com o estabelecido na Resolução 27, de 17/05/2012, do Ministério da Saúde do Brasil - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A curva de calibração com intervalo de concentrações de 50 a 1600 µM de HU em plasma foi selecionada a partir das concentrações terapêuticas observadas com o uso de dose de 15mg/kg/dia a 30mg/kg/dia de HU. Para a determinação da precisão e a exatidão foram utilizados controles de qualidade nas concentrações de 100, 740 e 1200 µM de HU em plasma, utilizando como padrão interno a metilureia. A linearidade foi avaliada no intervalo de 50 a 1600 µM de HU em plasma, obtendo-se coeficiente de correlação de 0,99. O método apresentou limite de quantificação, seletividade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação na análise da concentração de HU, em pacientes tratados com regime de dose múltipla. Esses resultados demonstram que o método apresenta alta correlação de linearidade podendo ser utilizado para monitoração terapêutica da HU nos pacientes com AF.

Nós quantificamos as concentrações plasmáticas de HU em 16 pacientes com AF em uso da associação HU+L-arginina nos momentos M0, M4, M8 e M12, totalizando 64 plasmas analisados. No entanto encontramos níveis plasmáticos mensuráveis em 22 plasmas, que corresponde a 15 pacientes em diferentes momentos, os demais apresentaram valores indeterminados, provavelmente devido apresentarem concentrações plasmáticas de HU menores que o limite de detecção de 50 µM. Não houve correlação entre as concentrações plasmáticas de HU com a da HbF. As concentrações plasmáticas médias obtidas com 2,5 horas após a ingestão da HU nas doses de 1000mg ou 1500mg por dia foram respectivamente de 190,88 e 302,71µM, compatíveis com a farmacocinética da HU, cuja Concentração máxima (C<sub>max</sub>) é de 793,75µM para uma dose de 2000mg/dia com tempo máximo (T<sub>max</sub>) de

1,22horas. Entretanto, deve-se ressaltar que existem diferenças fenotípicas de metabolização do fármaco, onde nos metabolizadores rápidos a Cmax é obtida em média com 15 a 30min após ingestão, enquanto nos metabolizadores lentos a Cmax é obtida em média de 60 a 120min. O que pode justificar os valores indeterminados nos demais plasmas, tendo em vista que algumas coletas foram realizadas no período da tarde, enquanto a HU é ingerida em jejum, mostrando que para a quantificação da mesma, a coleta do plasma deve obedecer a horários pré-estabelecidos de acordo com a farmacocinética, pois no presente estudo observamos que a HU se decompõe mesmo armazenada a -80°C. Portanto, para monitorização terapêutica dos pacientes tratados com HU, o ideal é que a coleta seja realizada com no máximo 1,5 horas após a ingestão do fármaco.

Não houve correlação entre os níveis plasmáticos de HU e as concentrações de HbF nos pacientes que apresentaram níveis de HU superiores ao limite de detecção, provavelmente este resultado possa ser explicado pelo elevado número de plasmas com valores indeterminados do fármaco.

O estado inflamatório crônico que ocorre nos pacientes com AF é decorrente de diversos fatores que se interligam e se retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente (ZAGO; PINTO, 2007). Os mecanismos de indução da produção de mediadores inflamatórios por células e conseqüentemente o efeito dessas moléculas na resposta inflamatória são pouco compreendidos na AF (LANARO *et al.*, 2009). A função das citocinas nos processos vaso-oclusivos tem sido objetivo de vários estudos, uma vez que estas constituem importante via de ativação das células endoteliais facilitando a adesão de leucócitos, hemácias e possivelmente plaquetas (CROIZAT, 1994; GRAIDO-GONZALES *et al.*, 1998; MAKIS *et al.*, 2000; PATHARE *et al.*, 2003; LANARO *et al.*, 2009).

O aumento dos níveis plasmáticos de TGF- $\beta$  nos pacientes em uso HU+L-arginina com 12 semanas em relação a 4 semanas, demonstra que a arginina tem ação antiinflamatória, estimulando gradualmente a produção de TGF- $\beta$ , uma citocina regulatória, que age como regulador negativo da hematopoese. Quando associada à elevada concentração de HbF, atua inibindo a produção do fator da *stem cell* (SCF) e reprimindo a expressão de c-kit sob progenitores eritróides, moderando a resposta eritropoiética. Entretanto em pacientes com forma mais grave da doença atua estimulando uma resposta eritropoiética intensa (CROIZAT; NAGEL, 1999). Nossos resultados estão de acordo com a explicação proposta por Croizat e Nagel (1999) uma vez que houve uma correlação direta entre as concentrações de TGF- $\beta$  e as de HbF e NO $_2^-$ . O TGF- $\beta$  induz efeito diferencial na proliferação de progenitores eritróides,

associado à reativação da expressão de cadeias globínicas  $\gamma$ , através da indução da NOS levando a uma maior produção de NO pelas células endoteliais (BÖHMER, 2003; TAI *et al.*, 2004).

Quanto a IL-17 também ocorreu um aumento significativo nos pacientes em uso HU+L-arginina com 12 semanas em relação ao momento inicial, corroborando com Kurebayashi *et al.* (2013) que afirmam que por ser uma citocina de natureza regulatória a TGF- $\beta$  é indispensável para a diferenciação das células Th17. Entretanto apenas podemos afirmar que a arginina ativou a função imunorreguladora na AF.

Estudos no locus da  $\beta$  globina humana demonstram que a ausência de BCL11A, induz a um silenciamento dos genes da  $\gamma$  globina humana (LETTRE *et al.*, 2008; GREEN, BARRAL, 2011). Avaliamos a comparação dos genótipos de cada polimorfismo com as concentrações de HbF. Verificou-se que no polimorfismo rs11886868, o genótipo CC, os níveis de HbF são consideravelmente superiores ao genótipo heterozigótico CT e comparativamente a quando este está ausente, genótipo TT. Verificou-se os níveis de HbF é proporcional ao número de alelos menos frequentes (C), observou-se que no genótipo CC nenhum indivíduo possuía HbF < 5% e que o indivíduo com genótipo TT possuía HbF < 5%. Corroborando com trabalhos anteriores que demonstram que o alelo C está fortemente associado a expressão de HbF, e que o alelo T age como um alelo repressor da expressão da HbF. As variantes intrônicas dos SNPs no gene BCL11A está associado com maior ou menor produção de HbF. Desta forma os SNPs do gene BCL11 regulam a expressão de HbF modificando a globina através de uma mutação estrutural que afeta a cinética de crescimento e diferenciação dos glóbulos vermelhos (LETTRE *et al.*, 2008).

Quanto ao polimorfismo rs4671393, observou-se que os indivíduos homozigóticos para o alelo menos frequente (AA) todos eles apresentaram HbF  $\geq$  5%, enquanto que os homozigóticos para o alelo mais frequente (GG) na sua maioria possuía HbF < 5%. Em relação ao polimorfismo rs7557939 observou-se que o alelo menos frequente é o alelo G, onde todos os indivíduos homozigóticos (GG) apresentaram HbF  $\geq$  5%, enquanto que os homozigóticos para o alelo mais frequente (AA) na sua maioria possuía HbF < 5%. A presença do alelo menos frequente influencia no aumento de HbF, pois a sua presença tem como consequência a redução da expressão do gene *BCL11A*, o que leva a uma diminuição da síntese do fator repressor BCL11A e, conseqüentemente, a uma menor repressão e subsequente um aumento da expressão dos genes G $\gamma$ - e A $\gamma$ -globina que codificam as cadeias  $\gamma$ -globina constituintes da HbF (LETTRE *et al.*, 2008; GREEN; BARRAL, 2011).

Para analisar a resposta terapêutica a HU+L-arginina de acordo com fatores genéticos, analisou-se os parâmetros HbF e  $\text{NO}_2^-$ , encontrou-se uma tendência para o aumento da HbF quando comparados ao momento inicial para todos os genótipos analisados. Porém este aumento não foi estatisticamente significativo. Entretanto, verificou-se que em todos os genótipos dos SNPs houve aumento das concentrações de  $\text{NO}_2^-$  estatisticamente significativo. O que corrobora com Xu *et al.*, (2011) que afirma o gene BCL11A no cromossomo 2 atua como uma barreira para a reativação de HbF por agentes indutores, sendo o fator genético determinante na resposta terapêutica.

Nossos resultados demonstram que a suplementação de arginina leva a uma melhor resposta ao tratamento com HU, sendo um importante fármaco a ser inserido no protocolo terapêutico do tratamento da AF como fármaco coadjuvante.

## 7 CONCLUSÃO

- ✓ A suplementação com L-arginina promoveu aumento das concentrações de HbF e da contagem de reticulócitos; Porém não modificou o perfil bioquímico através das dosagens de uréia, creatinina, aminotransferase alanina sérica (ALT), Aminotransferase aspartato sérica (AST) e lactato desidrogenase (LDH);
- ✓ A suplementação com L-arginina promoveu aumento das concentrações séricas de  $\text{NO}_2^-$ , porém não influenciou na atividade da catalase;
- ✓ Encontramos concentrações médias obtidas no plasma de pacientes com AF em uso de HU, nas doses de 1000 mg/dia e 1500mg/dia de 190,88  $\mu\text{M}$  e de 302,71  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Não encontramos correlação entre as concentrações séricas de HU com as concentrações da HbF;

- ✓ A associação HU+L-arginina induziu aumento das concentrações de TGF- $\beta$  e IL-17, e induziu a uma redução das concentrações de IL-10. Porém não houve alteração nas concentrações de IL-6
- ✓ Encontramos uma correlação positiva entre as concentrações séricas de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e HbF com as concentrações séricas de TGF- $\beta$ ;
- ✓ A associação HU+L-arginina induziu ao aumento de HbF e NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nos genótipos avaliados nos três SNPs do gene BCL11A. Porém a associação induziu a um aumento mais pronunciado nas concentrações de óxido nítrico do que de HbF. Demonstrando que o fator genético atua como determinante na resposta terapêutica.
  
- ✓ Em suma nossos resultados demonstram que a suplementação de arginina promove uma resposta acentuada ao tratamento com HU nos parâmetros hematológicos e inflamatórios analisados. Sendo a variabilidade da resposta a esta associação dependente da influência dos SNPs do gene BCL11A sobre a expressão da gama globina.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Como aumento nos níveis celulares de NO, com consequente sinalização na via do GMPc pode ser importante tanto para a produção de HbF em células eritróides como para inibir a adesão de leucócitos, administrar L-arginina como droga coadjuvante a HU pode representar um novo protocolo terapêutico para o tratamento da AF, reduzindo a dose terapêutica da HU, com possível redução dos seus efeitos citotóxicos com uso prolongado e potencializando a sua ação através do sinergismo das duas drogas.

## REFERÊNCIAS

AGIL, A.; SADRZADEH, S. M. H. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. **Redox Report**, v. 5, n.1, p. 29-34, 2000.

ALIYU Z. Y.; TUMBLIN, A. R.; KATO, G. J. Current therapy of sickle cell disease. **Haematologica**, v. 90, p. 7-12, 2005.

ALMEIDA, C. B.; TRAINA, F.; LANARO, C.; CANALLI, A. A.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F.; CONRAN, N. High expression of the cGMP-specific phosphodiesterase, PDE9A, in sickle cell disease (SCD) and the effects of its inhibition in erythroid cells and SCD neutrophils. **Br J Haematol**, v. 142, n. 5, p. 836-844, 2008.

ALMEIDA, C. B.; SCHEIERMANN, C.; JANG, J. E.; PROPHETE, C.; COSTA, F.F.; CONRAN, N.; FRENETTE, P. S. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**, v. 120, n. 14, p. 2879–2888, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306**, de 07 de dezembro de 2004. Brasília, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisas envolvendo seres humanos. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 466**, de 12 de dezembro de 2012. Brasília, 2012.

ASLAN, M.; CANATAN, D. Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 11, p. 1535-1544, 2008.

ASLAN, M.; BRUCE, A. F. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radical Biol. Med.**, v. 43, p. 1469-1483, 2007.

BACHIR, D.; HULLIN, A.; HUET E.; ANOOSHA, H.; NZOUAKOU, R.; EL MADJELINE, M.; ASTIER, A.; GALACTEROS, F. Plasma and urine hydroxyurea levels might be useful in the management of adult sickle cell disease. **Hemoglobin**, v. 31, n.4, p. 417-425, 2007.

BALIGA, B. S.; HAYNES, J. R.; J., OBIAKO, B.; MISHRA, N. Combined effects of arginine and hydroxyurea on BFU-E derived colony growth and HbF synthesis in erythroid progenitors isolated from sickle cell blood. **Cellular and molecular biology**, v. 156, n. 8, p.1290–1298; 2010.

BANDEIRA, F. M. G. C.; BEZERRA, M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; GOMES, Y. M.; ARAÚJO A. S.; ABATH, F. G. C. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.

BARBUI, T. The leukemia controversy in myeloproliferative disorders: is it a natural progression of disease, a secondary sequela of therapy, or a combination of both? **Semin. Hematol.**, v. 41, p. 15-17, 2004.

BYRD, D.C.; PITTS, S.R.; ALEXANDER, C.K. Hydroxyurea in two pregnant women with sickle cell anemia. **Pharmacotherapy**, v. 19, p. 1459-1462, 1999.

BOHMER, R. M. Reactivation of Fetal Hemoglobin in Adult Stem Cell Erythropoiesis by Transforming Growth Factor-  $\beta$ . **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v. 12, p. 499-504, 2003.

BRAZIL. National Health Surveillance Agency: Resolution No. 27, dated May 17, 2012. Treatise of the minimum requirements for the validation of bioanalytical methods used in studies with the purpose of registration and post-registration of medicines. **Union official journal**, May 22, 2012.

BRITTAIN, J. E.; PARISE, L.V. Cytokines and plasma factors in sickle cell disease. **Curr Opin Hematol**, v.14, p. 438-443, 2007.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune Responses by l-arginine Metabolism. **Nature reviews | Immunology**, v.5, p. 641-654, 2005.

CANALLI, A. A.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 605-609, 2008.

CANCADO, R. D.; LOBO, C.; ÂNGULO, I. L.; ARAÚJO, P. I. C.; JESUS, J. A. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 31, n. 5, p. 361-366, 2009.

CHAVES, M. A. F. Ação **Antioxidante das vitaminas C e E no processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de Hemoglobina S**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CHERNEY, D. Z. I.; SCHOLEY, J. W.; ZHOU, J.; ZIMPELMANN, J.; KENNEDY, C.; BURNS, K. D.; LAI, V.; MILLER, J. A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the renal hemodynamic response to L-arginine Renal hemodynamic function and NO synthase polymorphisms. **Kidney International**, v. 75, p. 327-332, 2009.

CLARK, B. E.; THEIN, S. L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 26, n. 3, p. 159-176, 2004.

COKIC, V. P.; ANDRIC, S. A.; STOJIKOVIC, S. S.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1117-1123, 2008.

CONRAN, N.; ORESCO-SANTOS C.; ACOSTA, H.C.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br. J. Haematol.**, v.124, p.547-554, 2004.

CONRAN, N.; COSTA, F. F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 1824–1838, 2009.

COVAS, D. T.; DE LUCENA, ANGULO I.; VIANNA, BONINI PALMA P.; ZAGO, M. A. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, n.3, p.273-280, 2004.

COX, SHARON E.; MAKANI, J.; KOMBA, ALBERT N. Global arginine bioavailability in Tanzanian sickle cell anaemia patients at steady-state: A nested case control study of deaths versus survivors. **British Journal Of Haematology**, v. 155, p. 522-524, 2011.

CROIZAT, H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br J Haematol.**, v. 87, n. 3, p. 592-597, 1994.



- CROIZAT, H.; NAGEL, R. L. Circulating Cytokines Response and the Level of Erythropoiesis in Sickle Cell Anemia. **American Journal of Hematology**, v. 60, p. 105-115, 1999.
- DAVIES, S. C.; GILMORE, A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood Rev.**, v. 17, p. 99-109, 2003.
- DHANANJAY, K.; KAUL, X. D. L.; XIAOQUIN, Z.; LI, M.; CARLETON, J. C. H.; NAGEL, R. L. Inhibition of sickle red cell adhesion and vasoocclusion in the microcirculation by antioxidants. **Am. J. Physiol. Heart Cir. Physiol.**, v. 291, p. 167-175, 2006.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.
- FIGUEIREDO, M. S. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 215-217, 2007.
- FISHER, D. A.; SMITH, J. F.; PILLAR, J. S.; STDENIS, S. H.; CHENG, J. B. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 15559-15564, 1998.
- FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.
- GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **Br. J. Anaesth.**, v. 93, n. 1, p. 105-113, 2004.
- GALARNEAU, G.; PALMER, C. D.; SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H.; HIRSCHHORN, J. N.; LETTRE, G. Fine-Mapping at Three Loci Known to Affect Fetal Hemoglobin Levels Explains Additional Genetic Variation. **Nature Genetics**, v. 42, p. 1049-1051, 2010.
- GLADWIN, M. T.; SHELHAMER, J. H.; OGNIBENE, F. P.; PEASE-FYE, M. E.; NICHOLS, J. S.; LINK, B.; DAKSESH, B. P.; MARCIN, A. J.; LEWIS, K. P.; SCHECHTER, A. N.; RODGERS, G. P. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 116, n. 2, p. 436-444, 2002.
- GLOVER, R.; IVY, E.; ORRINGER, E. et al. Detection of nitrosyl hemoglobin in venous blood in the treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, p. 1006-1010, 1999.
- GONÇALVES, M. S.; et al. (CPqGM-FIOCRUZ/FARMÁCIA-UFBA). Anemia falciforme: fluxograma para diagnóstico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA PATOLOGIA CLINICA/MEDICINA LABORATORIAL, 41. **Anais...**Salvador-BA, setembro 2007.
- GRAIDO-GONZALES, E.; DOHERTY, J. C.; BERGREEN, E.W.; ORGAN, G.; TELFER, M.; MCMILLEN, M. A. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E<sub>2</sub> levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2551-2555, 1998.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREEN, N. S.; BARRAL, S. Genetic Modifiers of HbF and Response to Hydroxyurea in Sickle Cell Disease. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 56, p. 177–181, 2011.

HANFT, V. N.; FRUCHTMAN, S. R.; PICKENS, C. V.; ROSSE, W. F.; HOWARD, T. A.; WARE, R. E. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood.**, v.95, n.11, p. 3589-3593, 2000.

HEBBEL, R. P. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 11, p. 2561-2564, 1997.

HIGUCHI, R. C.; FOCKLER, *et al.* Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

HUANG, J.; KIM-SHAPIRO, D. B.; KING, S. B. Catalase-Mediated Nitric Oxide Formation from Hydroxyurea. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 3495-3501, 2004.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WEI, L. H.; BAUER, P. M.; WU, G.; SOLDATO, P. Role of the arginine–nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 4202–4208, 2001.

JAIN, S.; GLADWIN, M. T. Arginine Metabolism and Nitric Oxide Bioavailability in Sickle Cell Disease. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 32, n. 7, p. 247-248, 2010

JIANG, J.; JORDAN, S. J.; BARR, D. P.; GUNTHER, M. R.; MAEDA, H.; MASON, R. P. In vivo Production of Nitric Oxide in Rats after Administration of Hydroxyurea. **Molecular Pharmacology**, v. 52, p. 1081-1086, 1997.

KATO, G. J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R. F.; LITTLE, J. A.; TAYLOR VI, J.; MORRIS, C. R.; NICHOLS, J. S.; WANG, X.; POLJAKOVIC M.; MORRIS Jr, S. M.; GLADWIN, M. T. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279-2285, 2006.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood**, v. 21, n.1, p.37-47, 2007.

KEIKHAEI, B.; MOHSENI, A. R.; NOROUZIRAD, R.; ALINEJADI, M.; GHANBARI, S.; SHIRAVI, F; SOLGI, G. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **European Cytokine Network**, v. 24, n. 1, p. 45-52, 2013.

KUREBAYASHI, Y., NAGAI, S., IKEJIRI, AI., KOYASU, S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. **Genes to Cells**, v. 18, p. 247–265, 2013.

KUTLAR, A.; ATAGA, K.; REID, M. *et al.* A phase 1/2 trial of HQK-1001, an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **Am. J. Hematol.**, v. 87, n. 11, p. 1017-1021, 2012.

- LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; ALBUQUERQUE, D. M.; SAAD, S. T.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J Leukoc. Biol.**, v. 85, n. 2, p. 235-242, 2009.
- LITTLE, J. A.; HAUSER, K. P.; MARTYR, S. E.; HARRIS, A.; MARIC, I.; MORRIS, C. R.; SUH, J. H.; TAYLOR, J.; CASTRO, O.; MACHADO, R.; KATO, G.; GLADWIN, M. T. Hematologic, biochemical, and cardiopulmonary effects of L-arginine supplementation or phosphodiesterase 5 inhibition in patients with sickle cell disease who are on hydroxyurea therapy. **Eur. J. Haematol.**, v. 82, p. 315-321, 2009.
- LETTRE, G.; SANKARAN, V. G.; BEZERRA, M. A. C.; ARAÚJO, A. S.; UDA M. *et al.*, DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, n. 33, p. 11869–11874, 2008.
- LOU, TZU-FANG.; SINGH, M.; MACKIE, A. *et al.* Hydroxyurea Generates Nitric Oxide in Human Erythroid Cells: Mechanisms for  $\gamma$ -Globin gene activation. **Experimental Biology And Medicine**, v. 234, p. 1374-1382, 2009.
- LOPEZ, B. L.; KRESHAK A. A.; MORRIS C. R.; DAVIS-MOON, L.; BALLAS, S. K.; MA, X. L. L-arginine levels are diminished in adult acute vaso-occlusive sickle cell crisis in the emergency department. **Br. J. Haematol.**, v. 120, p. 532-534, 2003.
- LUGNIER, C.; KERAUIS, T.; ECKLY-MICHEL, A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. **J Physiol Pharmacol.**, v. 50, n. 4, p. 639-652, 1999.
- MAKIS, A. C.; HATZIMICHAEL, E. C.; BOURANTAS, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann Hematol.**, v. 79, n. 8, p. 407-413, 2000.
- MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L. L.; GRIEBELER, I. H.; SANTIN, A. P.; BRANDÃO, V. D. M.; WAGNER, S. CASTRO, S. M.; PERALBA, M. C. R.; BENFATO M. S. Blood Antioxidant Parameters Sickle Cell Anemia Patients Steady State. **J. Nat. Med. Assoc.**, v. 100, n. 8, p. 897-902, 2008.
- MANOUILOV, K. K.; MCGUIRE, T.R.; GWILT, P.R. Colorimetric determination of hydroxyurea in human serum using high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, v. 708, p. 321-324, 1998.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, v. 2013, n.1, p. 362-369, 2013.
- MEILER, S. E.; WADE, M.; KUTLAR, F. *et al.* Pomalidomide augments fetal hemoglobin production without the myelosuppressive effects of hydroxyurea in transgenic sickle cell mice. **Blood.**, v. 118, n. 4, p. 1109-1112, 2011.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: wich , how and why. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 9, p. 2146-2152, 1997.

MILLER, S. T.; SLEEPER, L. A.; PEGELOW, C. H.; ENOS, L. E.; WANG, W. C.; WEINER, S. J. *et al.* Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 83-89, 2000.

MORRIS, C. R. *et al.* Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v.111, p.498-500, 2000.

MORRIS, C. R.; VICHINSKY, E. P.; WARMERDAM, J. V. *et al.* Hydroxyurea and Arginine Therapy: Impact on Nitric Oxide Production in Sickle Cell Disease. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology.**, v. 25, p. 629-633, 2003.

MORRIS, C. R.; KATO, G. J.; POLJAKOVIC; M. *et al.* Dysregulated Arginine Metabolism, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension, and Mortality in Sickle Cell Disease. **American Medical Association**, v. 294, n. 1, p. 81-90, 2005.

MORRIS, C. R.; GLADWIN, M. T.; KATO, G. J. Nitric Oxide and Arginine Dysregulation: A Novel Pathway to Pulmonary Hypertension in Hemolytic Disorders. **Curr. Mol. Med.**, v. 7, n. 7, p. 620-632, 2008.

MORRIS, C. R.; KUYPERS, F. A.; LAVRISHA, L.; ANSARI, M.; SWEETERS, N.; STEWART, M.; GILDENGORIN, G.; NEUMAYR, L.; VICHINSKY, E. P. A randomized, placebo-control trial of arginine therapy for the treatment of children with sickle cell disease hospitalized with vaso-occlusive pain episodes. **Haematologica**, v. 98, n. 9, p. 1375-1382, 2013.

NAGEL, R. L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Quart. J. Biol. Med.**, v. 2, p. 53-62, 1984.

NAHAVANDI, M.; PERLIN, E.; KASSIM, O. *et al.* Upregulation of TNF-alpha by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. **Blood.**, v. 96, n. 1, p. 44, 2000.

NAJEAN, Y.; RAIN, J.D. Treatment of polycythemia vera: the use of hydroxyurea and pipobroman in 292 patients under the age of 65 years. **Blood.**, v. 90, p. 3370–3377, 1997.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.

NAOUM, P.C. Prevalência e Controle da Hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 2, p. 142-148, 2000.

NUR, E.; VERWIJS, M.; WAART, D. R.; SCHNOG, J. J. B.; OTTEN, H. M.; BRANDJES, D. P.; BIEMOND, B. J.; ELFERINK, R. P. J. O. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1812, p. 1412–1417, 2011.

PATHARE, A.; AL KIND.; DAAR, S.; DENNISON, D. Cytokine in Sickle Cell Disease. **Hematology**, v. 8, n. 5, p. 329-337, 2003.

- PINHEIRO, L. S.; GONÇALVES, R. P.; TOMÉ, C. A. S.; ALCÂNTARA, A. E. E.; MARQUES, A. R. C.; SILVA, M. M. Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 28, n. 2, p. 122-125, 2006.
- PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D. J.; ROSSE, W. F.; MILNER, P. F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M. H.; KLUG, P. P. Mortality in sickle cell disease: Life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 1639-1644, 1994.
- PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, n. 13, p. 1362-1369, 2008.
- QUINN, C. T.; SHULL, E. P.; AHMED, N.; LEE, N. J. ; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R.; Prognostic significance of early vaso-occlusive complications in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 109, p. 40-45, 2007.
- RERIANI, M.; RAICHILIN, E.; PRASAD, A.; MATHEW, V.; PUMPER, G. M.; NELSON, R. E.; LENNON, R.; RIHAL, C.; LERMAN, L. O.; LERMAN A. Long Term Administration of Endothelin Receptor Antagonist Improves Coronary Endothelial Function in Patients with Early Atherosclerosis. **Circulation**, v. 122, n. 10, p. 958-966, 2010.
- ROTHER, P. R.; BELL, L.; HILLMEN, P.; GLADWIN, M. T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**, v. 293, n. 13, p. 1653-1662, 2005.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 4732, p. 1350-1354, 1985.
- SCAVELLA, A.; LEIVA, L.; MONJURE, H. *et al.* Effect of L-Arginine supplementation on Immune Responsiveness in Patients with Sickle Cell Disease. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 55, p. 318-323, 2010.
- SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T.; Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.
- SOUZA, W. C.; TORRES, F. R.; SALVADOR, A. R. *et al.* Avaliação de Hb A2 e HbF em doadores de sangue de região malarígena da Amazônia Oriental brasileira por HPLC. **Rev. Bras. Hematol. e Hemoter.**, v. 25, n. 4, p. 263-266, 2003.
- STEINBERG, M. H.; ADEWOYE, A. H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 13, p. 131-136, 2006.
- STEINBERG, M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends Pharmacol. Scienc.**, v. 27, n. 4, p. 204-210, 2006.
- STEINBERG, M. H.; MCCARTHY, W. F.; CASTRO, O.; BALLAS, S. K.; ARMSTRONG, F. D.; SMITH, W.; ATAGA, K.; SWERDLOW, P.; KUTLAR, A.; DeCASTRO, L.;

WACLARWIN, M. A. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. **Am. J. Hematol.**, v.85, p.403-408, 2010.

STROUSE, J. J.; LANZKORN, S.; BEACH, M. C. et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: A systematic review for efficacy and toxicity in children. **Pediatrics**, v. 122, p. 1332–1342, 2008.

SULLIVAN, K. J.; KISSOON, N.; SANDLER, E.; GAUGER, C.; FROYEN, M.; DUCKWORTH, L.; BROWN, M.; MURPHY, S. Effect of Oral Arginine Supplementation on Exhaled Nitric Oxide Concentration in Sickle Cell Anemia and Acute Chest Syndrome. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 32, p. 249-258, 2010.

THASSILA, N. P.; VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B. A. V.; SEIXAS, M. O.; BARBOSA, C. G.; ADORNO, E. V.; GONÇALVES, M. S. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 612; 2013.

TAI, S. C.; ROBB, G. B.; ARSDEN, P. A. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. **Arterioscler Thromb Vasc. Biol.**, p. 405-412; 2004.

THEIN, S. L.; MENZEL, S.; LATHROP, M.; GARNER, C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 2, p. 216–223, 2009.

VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B. A.; ZANETTE, A. M.; REIS, M. G.; BARRALNETTO, M.; GONCALVES, M. S. Arginase levels and their association with Th17-related cy- tokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sV- CAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Annals of Hematology**, v. 89, p. 877-882, 2010.

WALTERS, M. C.; NENHUIS, A.W.; VICHINSKY, E. Novel therapeutic approaches in sickle cell disease. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 10-34, 2002.

WOOD, K. C.; GRANGER, D. N. Sickle cell disease: Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 34, p. 926-932, 2007.

WOOD, K. C.; HSU, L. L.; GLADWIN, M. T. Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. **Free Rad. Biol. Méd.**, v. 44, p. 1506-1528, 2008.

WU, G.; BAZER, F. W.; DAVIS, T. A.; KIM, S. W.; LI, P.; RHOADS, J. M.; SATEERFIELD, M. C.; SMITH, S. B.; SPENCER, T. E.; YIN, Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids.**, v.37, p. 153-168, 2009.

XU, J.; PENG, C.; SANKARAN, V. C.; SHAO, Z.; ESRICK, E. B.; CHONG, B. G.; *et al.* Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 993-996, 2011.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

## ANEXO A

---

## Artigo Publicado

bjh correspondence

## L-arginine as an adjuvant drug in the treatment of sickle cell anaemia.

Sickle cell disease (SCD) is an inherited disorder of haemoglobin synthesis that is determined by homozygosity of haemoglobin S (HbSS) and characterized by recurring episodes of vaso-occlusion, chronic inflammatory state, chronic haemolysis and progressive vasculopathy with resultant imbalance in the signalling mediated by nitric oxide (NO) (Sullivan *et al*, 2010).

NO is a powerful vasodilator that acts by preventing the adhesion of leucocytes to the endothelium, inhibiting the expression of adhesion molecules and acting as an anti-inflammatory substance (Kato *et al* 2007). In sickle cell anaemia (SCA), arginase – an enzyme present inside red blood cells, is released during haemolysis, catalysing the hydrolysis of L-arginine, the substrate for the production of NO in ornithine and urea, reducing the bioavailability of NO (Kato *et al*, 2007). The reduction of L-arginine also occurs following the increased consumption of NO as a result of the increase in reactive oxygen species (ROS), generated by the presence of free haemoglobin, ischaemic injury of recurrent reperfusion, pro-inflammatory state, and the high autoxidation of haemoglobin S (HbS) (Kato *et al*, 2007).

Hydroxycarbamide (HC; also known as hydroxyurea) is a cytotoxic, mutagenic, recombogenic and antineoplastic agent. It has been used to treat SCA by increasing the synthesis of HbF and total haemoglobin and reducing haemolysis (-Morris *et al*, 2008). HC also acts to reduce the expression of adhesion molecules, with anti-inflammatory and anti-aggregating properties, contributing to the decrease of vaso-occlusive episodes and reducing the need for blood transfusions, the frequency of hospitalizations, and mortality rate (-Morris *et al*, 2008). HC has also been attributed to affect NO metabolism, increasing production thereof via the cGMP cycle and consequently increasing HbF (Morris *et al*, 2003). HC therapy increases utilization of the arginine substrate, for the production of NO, by the activity of NOS (Nahavandi *et al*, 2000).

L-arginine, a semi-essential amino acid, is a substrate for the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enzyme for the production of NO, and is reduced in SCA patients, thereby limiting the effectiveness of HC (Sullivan *et al*, 2010). The reduced overall bioavailability of arginine, measured by low plasma levels of L-arginine or L-ornithine, or L-ornithine and L-citrulline, is associated with increased mortality in SCA patients (Morris *et al*, 2005). The reduction of arginine levels in patients with SCA was demonstrated to be

associated with endothelial damage, multiple organ injury, increased haemolysis and pulmonary hypertension, contributing to high mortality of these patients (Morris *et al*, 2008).

The present study aimed to evaluate a therapeutic proposal for treating SCA, including supplementation with L-arginine as an adjuvant drug for treatment with HC.

This was a randomized clinical trial that included 21 adult patients (9 men and 12 women, aged 20–40 years) with a clinical and laboratory diagnosis of SCD, confirmed by molecular biology, undergoing treatment with HC for more than one year at a referral university hospital in Fortaleza, Ceará, Brazil. After informed consent, the selected patients were randomly divided into Group I (Control group: HC only therapy,  $n = 09$ ) and Group II (Study group; therapy with HC + L-arginine,  $n = 12$ ), matched for age and sex. The patients selected for Group II were prescribed Reforgan® (L-Arginine 250 mg), with a dose of one pill daily for 90 d, as a supplement to Hydréia® (HC, dosage ranged from 500 to 1500 mg/day).

Group II patients (HC + L-arginine) showed a significant increase in nitrite levels, HbF and reticulocytes, when compared to both baseline values and the Group I (HC only) at the various time points tested, demonstrating that supplementation with L-arginine increased the bioavailability of this substrate, leading to a better response to treatment with HC, as seen in Fig 1 (Table 1).

The increase in the levels of nitrite and HbF in patients after 12 weeks of use of HC + L-arginine, in relation to the baseline, demonstrates that such association induces a better therapeutic response to HC and confirms that the action of HC involves an NO-dependent pathway causing increased consumption of L-arginine, which is reduced in SCA patients and limits their response to HC. Our results support those of previous studies, which demonstrated that the *in vitro* induction of HF in progenitor cells occurs via NOS and soluble guanylate cyclase (Strouse *et al*, 2008), that there is chronic depletion of arginine levels in knockout sickle cell mice, and when treated with L-arginine, there is an increase in NO levels (Dasgupta *et al*, 2006).

Patients using HC + L-arginine also showed an increase in reticulocyte counts at 12 weeks compared to the baseline, indicating that the arginine acts by stimulating erythropoiesis. Baliga *et al* (2010) evaluated the effect of the association of HC + L-arginine on the synthesis of fetal haemoglobin by erythroid colony-forming units, demonstrating excellent



## Correspondence

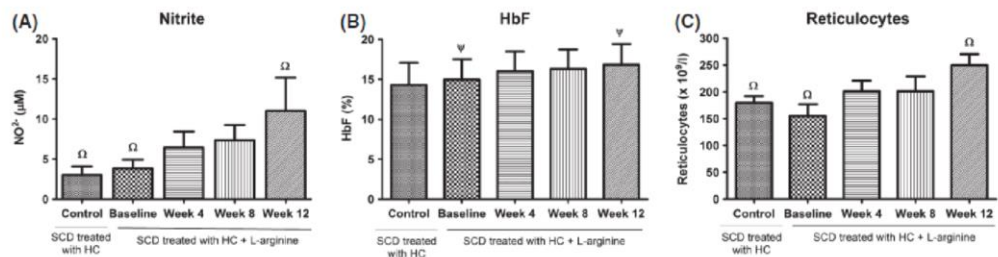


Fig 1. (A) Nitrite levels in sickle cell patients (SCD) treated with hydroxycarbamide (HC), with or without supplementation of L-arginine for 0, 4, 8 and 12 weeks. (B) HbF levels in SCD patients treated with HC with or without supplementation of L-arginine for 0, 4, 8 and 12 weeks. (C) Reticulocyte count in SCD patients treated with HC, with or without supplementation of L-arginine for 0, 4, 8 and 12 weeks.

Table I. Evolution of haematological and oxidative stress parameters in SCA patients ( $n = 23$ ).

Parameters	Group I (HC only) N = 9	Group II (HC + L-arginine) N = 12				P-value
		Baseline	Week 4	Week 8	Week 12	
<b>Oxidative stress</b>						
Nitrite ( $\mu\text{mol}$ ) <sup>a</sup>	3.0 ± 1.05†	3.8 ± 1.07†	6.4 ± 1.99	7.3 ± 1.9	11.0 ± 4.16†	0.0365
<b>Haematological</b>						
Red blood cells ( $\times 10^{12}/\text{l}$ ) <sup>b</sup>	2.5 ± 0.14	2.6 ± 0.14	2.6 ± 0.13	2.7 ± 0.12	2.7 ± 0.12	0.3597
Haemoglobin (g/l) <sup>b</sup>	91 ± 3.7	92 ± 4.1	96 ± 4.6	94 ± 3.4	95 ± 3.3	0.4730
Haematocrit (%) <sup>b</sup>	26.5 ± 1.14	26.4 ± 1.11	27.2 ± 1.19	27.6 ± 1.00	27.5 ± 0.75	0.2167
MCV (fl) <sup>b</sup>	103.0 ± 3.12	102.4 ± 3.75	102.7 ± 3.08	102.8 ± 3.18	102.0 ± 3.65	0.9446
White blood cells ( $\times 10^9/\text{l}$ ) <sup>b</sup>	8.1 ± 0.67	8.0 ± 0.70	9.3 ± 0.87	2.4 ± 0.71	8.4 ± 0.49	0.2755
Neutrophils ( $\times 10^9/\text{l}$ ) <sup>b</sup>	3.9 ± 0.48	4.1 ± 0.66	4.5 ± 0.69	3.9 ± 0.44	3.7 ± 0.36	0.6848
Platelets ( $\times 10^9/\text{l}$ ) <sup>b</sup>	340.7 ± 32.2	336.6 ± 22.72	339.7 ± 24.39	346.1 ± 20.85	345.3 ± 23.29	0.9661
HbF (%) <sup>b</sup>	14.9 ± 2.54	14.9 ± 2.54†	16.0 ± 2.46	16.3 ± 2.45	16.8 ± 2.59†	0.0375
Reticulocytes ( $\times 10^9/\text{l}$ ) <sup>b</sup>	179.7 ± 12.2†	155.2 ± 21.73†	201.1 ± 19.86	201.2 ± 27.64	249.6 ± 20.91‡	0.0165

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM).

<sup>a</sup>Friedman test.

<sup>b</sup>ANOVA Repeated Measures test. \* $P < 0.05$ .

†Statistically significant difference between Group II at Week 12 compared with baseline (where the patient had not started Arginine therapy) and Group I.

‡Statistically significant difference between Week 12 and baseline.

Bold values indicate statistical significance.

synthesis of HbF and minimal cytotoxicity induced by HC + L-arginine at doses of (0, 15, 25, 100  $\mu\text{mol}$ ) of HC and (0, 25, 50 and 100  $\mu\text{mol}$ ) of Arginine. Our results agree with those of Baliga *et al* (2010), suggesting that the induction of HbF synthesis is dependent upon the action of NO on the erythroid progenitor cells.

Our results demonstrate that arginine supplementation leads to a better response to treatment with HC, and is an important adjuvant drug that should be included in the therapeutic protocol of treatment of SCA.

### Acknowledgements

This work was supported by National Council of Technological and Scientific Development (CNPq).

Darcielle Bruna Dias Elias<sup>1</sup>  
 Maritza Cavalcante Barbosa<sup>2</sup>  
 Lilianne Brito da Silva Rocha<sup>1</sup>  
 Luana Letícia Alves Dutra<sup>3</sup>  
 Herivaldo Ferreira da Silva<sup>4</sup>  
 Alice Maria Costa Martins<sup>3</sup>  
 Romélia Pinheiro Gonçalves<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Development and Technological Innovation of Medicines, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>2</sup>Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil and <sup>4</sup>Blood Centre of the State of Ceará, Fortaleza, Brazil  
 E-mail: darcielle.bruna@gmail.com

## References

- Baliga B.S., Haynes, Jr, J., Obiako, B. & Mishra, N. (2010) Combined effects of arginine and hydroxyurea on BFU-E derived colony growth and HbF synthesis in erythroid progenitors isolated from sickle cell blood. *Cellular and molecular biology*, Jun 156(Suppl:OL1290-8), 1290-1298.
- Cokic, V.P., Andric, S.A., Stojilkovic, S.S., Noguchi, C.T. & Schechter, A.N. (2008) Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. *Blood*, **111**(3), 1117-1123.
- Dasgupta, T., Hebbel, R.P. & Kaul, D.K. (2006) Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic Biol Med*, **41**, 1771-1780.
- Kato, G.J., Gladwin, M.T. & Steinberg, M.H. (2007) Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood*, **21**, 37-47.
- Morris, C.R., Vichinsky, E.P., Warmerdam, J.V., Machado, L., Kepka-Lenhardt, D., Morris, Jr, S.M. & Kuypers, F.A. (2003) Hydroxyurea and Arginine Therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, **25**, 629-633.
- Morris, C.R., Kato, G.J., Poljakovic, M., Wang, X., Blackwelder, W.C., Sachdev, V., Hazen, S.L., Vichinsky, E.P., Morris, Jr, S.M. & Gladwin, M.T. (2005) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *The Journal of the American Medical Association*, **294**, 81-90.
- Morris, C.R., Gladwin, M.T. & Kato, G.J. (2008) Nitric oxide and arginine dysregulation: a novel pathway to pulmonary hypertension in hemolytic disorders. *Current Molecular Medicine*, **7**, 620-632.
- Nahavandi, M., Perlin, E., Kassim, O., Wyche, M.Q., Castro, O. & Tavakkoli, F. (2000) Upregulation of TNF-alpha by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. *Blood*, **96**(suppl.1), 44.
- Strouse, J.J., Lanzkorn, S., Beach, M.C., Haywood, C., Park, H., Witkop, C., Wilson, R.F., Bass, E.B., & Segal, J.B. (2008) Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. *Pediatrics*, **122**, 1332-1342.
- Sullivan, K.J., Kissoon, N., Sandler, E., Gauger, C., Froyen, M., Duckworth, L., Brown, M. & Murphy, S. (2010) Effect of oral arginine supplementation on exhaled nitric oxide concentration in sickle cell anemia and acute chest syndrome. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, **32**, 249-258.

**ANEXO B****Artigo Aceito**

---

**Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (BJPS)****Standardization method for measurement of Hydroxyurea by ultra high efficiency liquid chromatography in plasma of patients with sickle cell disease****Darcielle Bruna Dias Elias<sup>1\*</sup>, Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho<sup>2</sup>, Janete Eliza de Sá Soares<sup>2</sup>, Romélia Pinheiro Gonçalves<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, <sup>2</sup> Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil*

**\*Correspondence:**

Darcielle Bruna Dias Elias

Street: Conrado Cabral nº 384 Ap 203-Monte Castelo

Zip Code: 60.325-440 –Fortaleza – Ceará, Brazil

Phone: 55- (85) 3366-8264; 55- (85) 8681-3292

e-mail: [darcielle.bruna@gmail.com](mailto:darcielle.bruna@gmail.com)

Sickle cell anemia (SCA) is a recessively inherited disease characterized by chronic hemolytic anemia, chronic inflammation and acute episodes of hemolysis. Hydroxyurea (HU) is widely used to increase the levels of fetal hemoglobin (HbF). The objective is to standardize and validate a method for quantification of HU in human plasma using Ultra High Efficiency Liquid Chromatography (UPLC) in order to determine levels of HU in adult patients with SCA, treated with HU. Was used analytical reverse phase column (Nucleosil C18), mobile phase consisting of acetonitrile/water (16.7/83.3). The retention time of hydroxyurea, urea and methylurea were respectively 6.7, 7.7 and 11.4 minutes. In the validation process parameters were set as: limit of quantification, calibration curve, linearity, precision and accuracy intra and inter assays. To determine the precision and accuracy of quality controls were used at concentrations of 100,

740 and 1600mM of HU in plasma using as internal standard the methylurea. Linearity was assessed in the range 50-1600mM HU plasma, obtaining a correlation coefficient of 0.99. The method was considered accurate and precise and can be performed with the purpose of quantitative determination of HU for therapeutic monitoring of patients with SCA treated with HU.

**Uniterms:** Sickle cell anemia. Hydroxyurea. Therapeutic monitoring

## INTRODUCTION

Hydroxyurea (HU), a structural analogue of urea, inhibits the activity of ribonucleotide reductase. It has been used clinically since the 1960s, primarily in the treatment of Chronic Myeloid Leukemia, acting as a cytotoxic, mutagenic, and recombinogenic antineoplastic agent with specificity to the S phase of the cell cycle (preventing cell division) and with specific action on ribonucleotide reductase (interfering with the conversion of ribonucleotides to deoxyribonucleotides) (Bachir *et al.*, 2007; Ballas, 2012). Since 1998, HU became part of the therapeutic program for patients with sickle cell anemia (SCA), and was the first drug with proven clinical efficacy in the treatment of this disease. HU is commercially available (Hydréia®) as a 500 mg tablet and the prescribed dosage ranges from 15- 25mg/kg /day. Response to HU treatment is variable, since the therapeutic response is associated with the clinical severity of the factors modulating SCA, including the concentration of fetal hemoglobin (HbF) in groups with haplotype beta globin, co-association with alpha-thalassemia, and the presence of polymorphisms for XmnI, BCL11A, and HBS1L-MYB (Cokic *et al.*, 2008). Moreover, the variability of the response may be associated with variations in drug metabolism (Cançado *et al.*, 2009).

The efficacy of HU treatment for SCA is generally attributed to its ability to enhance HbF, reducing the intraerythrocytic polymerization of HbS in conditions of deoxygenation. However, HU also promotes a reduction in the number of neutrophils, reduced expression of erythrocyte adhesion molecules, and increased synthesis and bioavailability of nitric oxide by

the activation of guanylyl cyclase and subsequent increase in cyclic GMP (Friedrich *et al.*, 2008; Gladwin *et al.*, 2002).

Besides increasing the concentration of HbF, these mechanisms confer benefits such as reduced hemolysis, decreased adhesion of erythrocytes, leukocytes, and platelets to the vascular endothelium, and vasodilatation, contributing to a reduction in vaso-occlusive and inflammatory complications (Lette *et al.*, 2008).

Despite its proven clinical efficacy, many aspects of the role of HU in patients with SCA remain unclear, such as optimal therapeutic dose, mechanism of drug action, the intense variability in therapeutic response, and cytotoxicity and genotoxicity. The carcinogenic potential of HU is not well established; some studies associate HU with an increased risk of leukemia in patients with myeloproliferative disorders (Manouilov *et al.*, 1998; Silva, Shimauti, 2006).

In order to establish a standard treatment regimen based on the pharmacokinetics of HU in patients with SCA, it is necessary to develop and validate a method for the quantification of HU in human plasma. This method was developed based on the methods described by Manouilov *et al.*, 1998 and Bachir *et al.*, 2007. We performed modifications in the sample preparation, using a smaller volume of plasma. For the colorimetric reaction, no commercial kits were used, while a Ultra High Performance Liquid Chromatography with diode detector (UV) was employed as it affords a higher resolution of the chromatograms analyzed. These modifications resulted in a method with increased sensitivity, lower quantification limit, and reduced time of analysis; nevertheless, its validation is necessary (Manouilov *et al.*, 1998; Bachir *et al.*, 2007.).

## **METHODS**

### **Chemicals**

Hydroxyurea (>98%; 04/04/2013), methylurea (97%; 04/04/2013) (internal standart), diacetyl Monoxime (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>), tiosemicarbazide (CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub>S) and ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>) were purchased from SIGMA<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA). Sodium chloride (NaCl) from LABSYNTH<sup>®</sup> (SP, Brazil), Sulfuric acid from Cromato Produtos Químicos Ltda (SP, Brazil), orthophosphoric acid from TEDIA<sup>®</sup> (RJ, Brazil), trichloroacetic acid and acetonitrile were purchased from

VETEC<sup>®</sup> (RJ, Brazil). Plasma standards were obtained from Hemocenter the State of Ceará, Brazil.

### **Solutions**

A stock solution of hydroxyurea was prepared in acetonitrile/water (1:1) at a concentration of 10,000  $\mu\text{M}$ , which was dissolved in acetonitrile/water (1:1) to obtain concentrations of 8000, 6000, 3200, 2000, 1000, 500, and 250  $\mu\text{M}$ . The standard solutions were stored in a 4°C, and were stable for 20 days. The methylurea solution used as internal standard was prepared at a concentration of 15.5 mM.

The colorimetric solution (A) was prepared by combining 0.2 g thiosemicarbazide, 0.9 g sodium chloride, and 0.1 g diacetyl monoxime in distilled water qsp 100 mL. The acid solution (B) was prepared by adding 6 mL sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) and 1 mL phosphoric acid to 80 mL of distilled water, dissolving 0.01 g ferric chloride in this solution, and filling to 100 mL with distilled water.

### **Chromatographic conditions**

The equipment Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC) consists of a pumping system with diode array detector (PDA) (Accela<sup>®</sup> Thermo Scientific) and data acquisition system ChromQuest 5.0 (Thermo Scientific<sup>®</sup>). Compounds were separated by reverse-phase chromatography on analytical column NUCLEOSIL C18, 250\_4.6 column (5 $\mu\text{m}$  particle size) from Phenomenex<sup>®</sup> and pre-column C18 (4x30mm). The mobile phase used was acetonitrile / water (16.7 / 83.3) flow of 1mL / min, wavelength 440nm.

### **Sample Preparation**

In a 10 mL tube, 400  $\mu\text{L}$  aliquots of plasma from patients treated with hydroxyurea were combined with 80  $\mu\text{L}$  of 15.5 mM methylurea (internal standard) and 800  $\mu\text{L}$  of 20% trichloroacetic acid to precipitate proteins. After vortexing (30 s) and centrifugation (3500 rpm for 10 min), 1000  $\mu\text{L}$  of supernatant was transferred to another tube, and 1000  $\mu\text{L}$  of solution A (colorimetric) and 1000  $\mu\text{L}$  of solution B (acid reagent) were added. The mixture was heated in a water bath to 100 °C for 10 min and then cooled to 4 °C for 10 min. A 25  $\mu\text{L}$  sample of the reaction product was subjected to chromatographic analysis.

### **Calibration curve**

To construct the calibration curve (performed in triplicate), 400  $\mu\text{L}$  aliquots of human plasma blanks (those not treated with hydroxyurea) were enriched with 100  $\mu\text{L}$  of an appropriate concentration of the working standard solution to obtain hydroxyurea concentrations of 50, 100, 200, 400, 740, 1200, and 1600  $\mu\text{M}$  in plasma; these concentrations were chosen based on the expected plasma levels of HU and comprised seven data points, including the quantification limit. The internal standard (80  $\mu\text{L}$ , 15.5 mM) was then added to each solution, which was then subjected to the process of sample preparation and chromatographic analysis as described above.

The linear regression equations and correlation coefficients were obtained by dividing the peak area of hydroxyurea by the area of the internal standard (hydroxyurea/PI), plotted as a function of their concentrations. The acceptance criteria for calibration curves included a linear correlation coefficient greater than or equal to 0.99, a deviation less than or equal to 20% compared to the nominal concentration for the lower limit of quantification, and a standard deviation less than or equal to 15% over nominal concentration for the other concentrations of the calibration curves.

### **Validation**

The validation process was performed in October 2012 in accordance with Resolution RDC no 27 of 17/05/2012, the Ministry of Health – National Health Surveillance Agency, which is also in accordance with the Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2013 (FDA).

### **Limit of quantification**

The limit of quantification was defined as the lowest concentration quantified with precision and accuracy with relative standard deviation (RSD) and coefficient of variation (CV) below 20%. Samples of human plasma were enriched with hydroxyurea to yield concentrations as low as 50  $\mu\text{M}$ . The samples were analyzed in quintuplicate.

### **Linearity**

Linearity was assessed at the concentrations used in the calibration curve, by gradually increasing the concentration to 1600  $\mu\text{M}$  hydroxyurea in plasma. We then determined the linear regression equations and correlation coefficients.

### **Selectivity**

The interference from endogenous components of plasma was assessed by the analysis of plasma aliquots obtained from six different individuals who were not treated with hydroxyurea.

### **Precision and accuracy**

To determine precision and accuracy, quality controls were used at concentrations of 100, 740, and 1600  $\mu\text{M}$  of hydroxyurea in plasma.

To evaluate precision within assays, 5 aliquots were analyzed for each control on a single day, or across a single calibration curve. To evaluate the precision between assays, aliquots were analyzed in quintuplicate, with quality controls on three consecutive days. Precision was expressed as coefficient of variation (CV%), assuming no values above 15% (fifteen percent).

Accuracy within and between assays was also evaluated using the experimental results from the precision evaluations. The accuracy was expressed through the Relative Standard Error (EPR), not including values outside the range of  $\pm 15\%$  (fifteen percent) of the nominal value.

$$\text{EPR} = \frac{\text{Average concentration experimental} - \text{nominal value}}{\text{nominal value}} \times 100$$

### **Clinical and Experimental Protocol**

We analyzed 22 adult patients (5 men and 17 women, aged between 20 and 40 years) with clinical and laboratory diagnoses of SCA, confirmed by molecular biology, with a baseline



treatment with hydroxyurea for over a year, accompanied at the outpatient clinic of a university hospital in Fortaleza, Ceará, Brazil. Baseline determination was based on the criteria described by Ballas (2012): absence of painful episodes and/or concurrent illnesses such as infections or inflammation in the four weeks preceding the study; no hospital admissions in the 2-3 days prior to study; and absence of blood transfusion in the four months preceding the study. The exclusion criteria included an absence of molecular diagnosis of SCA, pregnancy, presence of renal or liver failure, or smoking (Ballas, 2012).

Informed consent was obtained from all patients (or from the responsible person) prior to enrollment into the study, and the study protocol was submitted to and approved by the Ceará Federal University Ethics Committee under protocol N° 110.10.10.

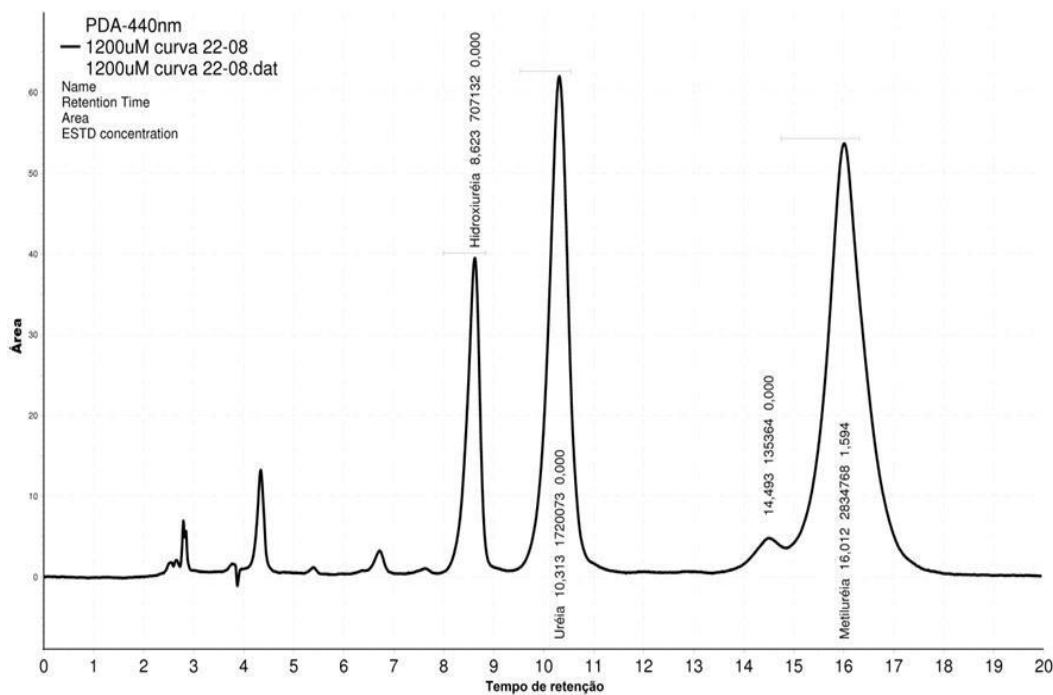
Venous blood was collected in containers containing the anticoagulant heparin, 2.5 h after drug intake. Plasma samples for chromatographic analysis were obtained by centrifugation of the blood samples at 4000 rpm for 10 min and were stored at -80 °C until the time of analysis.

Plasma concentrations of hydroxyurea in the patients tested was calculated using the calibration curves.

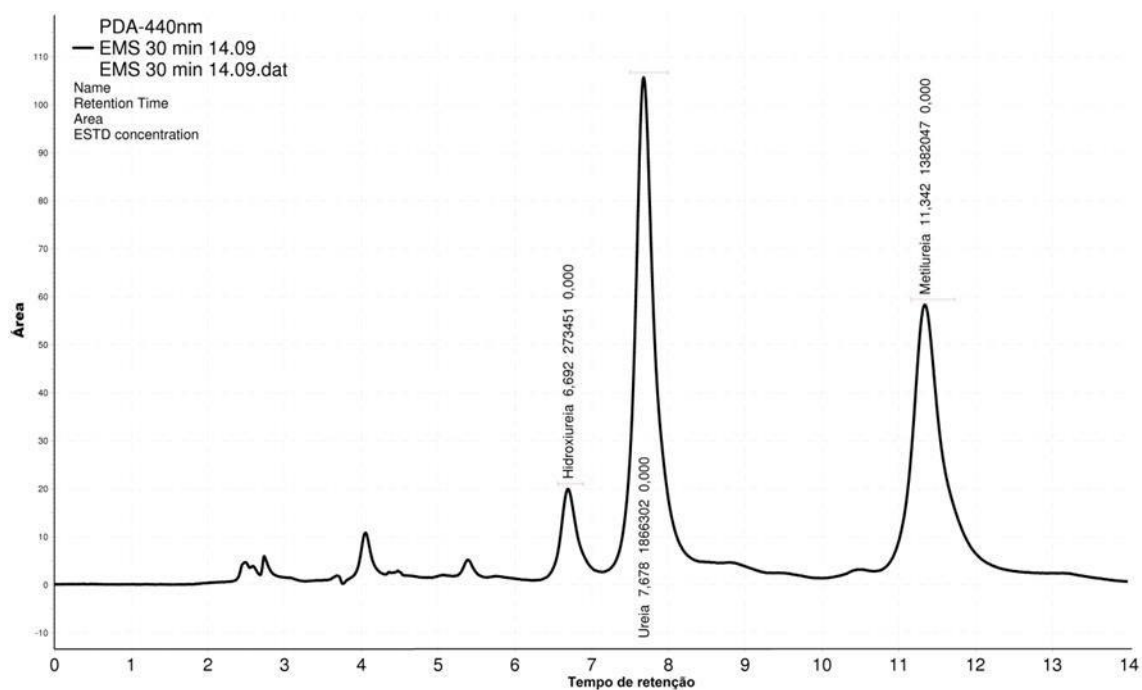
## **RESULTS**

### **Analysis of Hydroxyurea in plasma**

Figures 1 and 2 show the chromatographic analysis of a plasma blank enriched with solutions of hydroxyurea and methylurea (internal standard) and plasma from a patient with sickle cell disease being treated with hydroxyurea (1000 mg/day), respectively. It was observed that the retention times of hydroxyurea, urea, and methylurea were 6.763 min, 7.778 min, and 11.472 min, respectively.



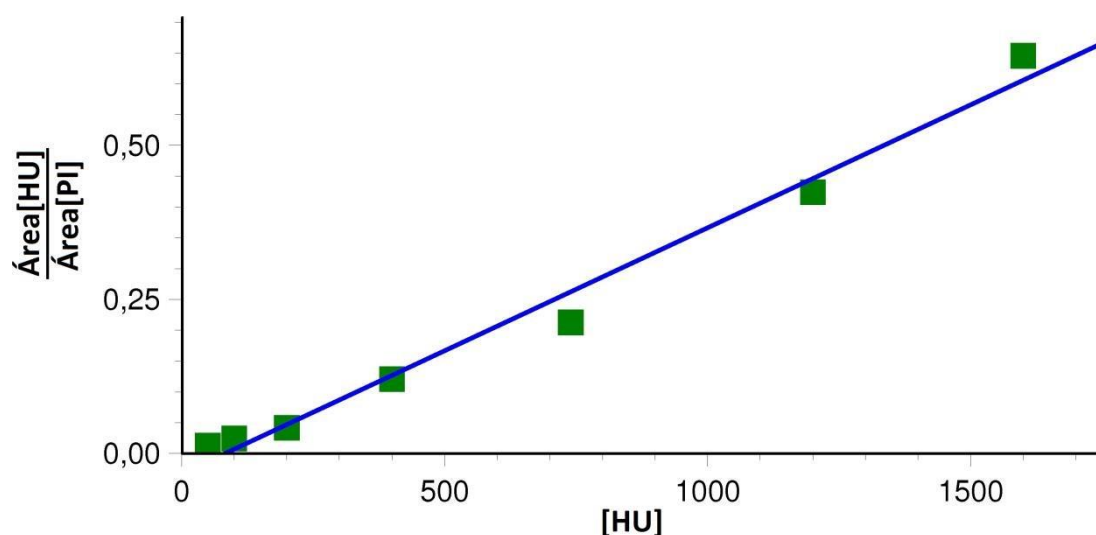
**FIGURE 1** - Chromatogram of plasma enriched with 1200  $\mu$ M hydroxyurea and 15.5 mM methylurea (internal standard).



**FIGURE 2** - Chromatogram of plasma from patients undergoing SCA therapy with hydroxyurea 1000 mg/day enriched with 15.5 mM methylurea (internal standard).

## Calibration Curve

The Figure 3 shows the calibration curve in the range of 50-1600mM of hydroxyurea in human plasma. The correlation coefficient was 0.9908.



**FIGURE 3** - Calibration curve of HU in the range of 50-1600  $\mu$ M hydroxyurea in human plasma.

## Validation of method

Table 1 shows the results of the validation of the analytical method of hydroxyurea in human plasma. The calculated correlation coefficient ( $r$ ) indicates a linear relationship between the area and the concentration of hydroxyurea. The method presents a limit of quantification, selectivity, precision, and accuracy compatible with an application for the analysis of hydroxyurea concentration in patients treated with a multiple dose regimen.

**TABLE 1** - Confidence limits for the method of analysis of Hydroxyurea

<b>Hydroxyurea</b>	
<b>Linearity (50-1600 <math>\mu</math>M)</b>	
Line Equation	$y = 0.00029x - 0.00285$
R	0.99084

<b>Limit of Quantification (50 µM)</b>	
Precision (CV%, n = 5)	13.45
Accuracy (EPR, n = 5)	4.96
<b>Precision within assays</b>	
(CV%) n = 5	
100 µM	2.22
740 µM	2.52
1200 µM	4.52
<b>Precision between assays</b>	
(CV%) n = 15	
100 µM	6.39
740 µM	7.04
1200 µM	10.38
<b>Accuracy within assays</b>	
(EPR%) n = 5	
100 µM	0.80
740 µM	-4.26
1200 µM	-5.94
<b>Accuracy between assays</b>	
(EPR%) n = 15	
100 µM	-1.35
740 µM	-2.50
1200 µM	3.32

CV = Coefficient of variation [(SD/média)x 100]; r= linear correlation coefficient.  
EPR= [(Coverage experimental-C added )/C added ]x100

### Analysis of patients

We analyzed 22 adult patients (5 men and 17 women, aged between 20 and 40 years) with clinical and laboratory diagnoses of SCA treated with hydroxyurea for over one year, at doses of 500 mg/day (1 patient), 1000 mg/day (18 patients), and 1500 mg/day (3 patients), and the average HU concentrations in plasma collected from these dosage groups were 98.31 µM, 190.88 µM, and 302.71 µM, respectively.

**TABLE 2** - Average concentrations of HU in patients with SCA

<b>Treatment dose (mg/day)</b>	<b>Average Concentration (µM) ±SD</b>
500	98,31±SD
1000	190,88±SD

1500

302,71±SD

## DISCUSSION

Hydroxyurea therapy in patients with sickle cell anemia (SCA) has a proven clinical and laboratory efficacy. Administered in concentrations of 15 to 25 mg/kg/day, it can induce an increase of 10 to 40% of HbF. However, the variability in therapeutic response is high and may be associated with pharmacogenetic factors that lead to phenotypic characteristics of fast or slow metabolizers. Given this variation, the search for a safe therapeutic use that avoids the cyto- and genotoxicity of the drug through a standard regimen based on therapeutic monitoring is essential (Steinberg *et al.*, 2010; Veale *et al.*, 1988). Thus, the quantification method of hydroxyurea in human plasma by UHPLC with diode detector (UV) was developed in order to follow up patients treated with this drug. It was developed from the methods of Manouilov *et al.* (1998) and Bachir *et al.* (2007) and is based on the formation of a color reaction between hydroxyurea and solutions A (thiosemicarbazide + sodium chloride + diacetyl monoxime) and B (sulfuric acid + phosphoric acid + ferric chloride) (Manoilov *et al.*, 1998; Bachir *et al.*, 2007).

In developing the method, the choice of the best wavelength was done via a "scan" of between 300 and 600nm, identifying the wavelength of 440nm as the highest absorption. To choose the best mobile phase adjustments were made in the proportions of acetonitrile / water and the analysis time obtained was of 13min, a reduction of 50% compared to the method of Bachir *et al.* (2007), using 16.7% acetonitrile (Bachir *et al.*, 2007).

For treatment of plasma sample was initially carried out precipitation of proteins (clean-up) using trichloroacetic acid in place of perchloric acid used for Bachir *et al.* and Manouilov *et al.*, reducing interferences by endogenous substances. After this step, the colorimetric reaction was carried out (Manoilov *et al.*, 1998; Bachir *et al.*, 2007).

The specificity of the method was assured when it was observed that the retention times of hydroxyurea, urea, and methylurea were 6.763 min, 7.778 min, and 11.472 min, respectively, with no interference to methylurea (internal standard) or urea from endogenous substances at high concentrations in plasma. The calibration curve in the concentration range of 50-1600 µM hydroxyurea in plasma was selected from therapeutic concentrations observed in the dosages of 15mg/kg/day to 30 mg/kg/day of hydroxyurea.

The method was deemed precise and accurate, using quality controls at low,

middle, and high concentrations of 100  $\mu\text{M}$ , 740  $\mu\text{M}$ , and 1200  $\mu\text{M}$ , respectively, presenting a quantification limit, selectivity, precision, and accuracy compatible with application in the analysis of hydroxyurea in patients treated with a multiple dose regimen. Moreover, the method was considered to be linear, since the obtained correlation coefficient was greater than 0.99.

We note that, in the validation process, hydroxyurea, methylurea standard solution, and solutions A and B used in colorimetric reaction all showed a stability of greater than 20 days. The color reaction product was unstable after 5 h of reaction, with a decrease in absorbance, and plasma samples containing hydroxyurea are unstable for a period longer than six months even when stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

The mean concentrations obtained 2.5 h after ingestion of hydroxyurea in doses of 500 mg, 1000 mg, and 1500 mg per day were 98.31, 190.88, and 302.71  $\mu\text{M}$ , respectively, compatible with the pharmacokinetics of the drug, whose maximum concentration ( $C_{\text{max}}$ ) is 793.75  $\mu\text{M}$  for a dose of 2000 mg/day with maximum time ( $T_{\text{max}}$ ) of 1.22 h (Ware *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 1998). However, it should be noted that there are phenotypic differences in drug metabolism; in rapid metabolizers,  $C_{\text{max}}$  is achieved 15 to 30 min after ingestion, whereas in poor metabolizers  $C_{\text{max}}$  is achieved 60 to 120 min after ingestion (Ware *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 1998). Therefore, for therapeutic monitoring of patients treated with HU, the ideal collection time would be 30 min and 1.5 h after drug intake.

The results of this study demonstrate that the method presents highly linear correlation and can be used for quantitative determination of hydroxyurea for therapeutic monitoring in patients with sickle cell anemia.

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this study was provided by the National Council of Technological and Scientific Development - (CNPq - Brazil).

## REFERENCES

BACHIR D.; HULLIN A.; HUET E.; ANOOSHA, H.; NZOUAKOU, R.; EL MADJELINE, M.; ASTIER, A.; GALACTEROS, F. Plasma and urine hydroxyurea levels might be useful in the management of adult sickle cell disease. *Hemoglobin*. v. 31, n.4, p. 417-425, 2007.

BALLAS, S.K. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. *Am J Hematol.* v.87, n.3, p.338, 2012.

BRAZIL. National Health Surveillance Agency: Resolution No. 27, dated May 17, 2012. Treatise of the minimum requirements for the validation of bioanalytical methods used in studies with the purpose of registration and post-registration of medicines. Union official journal, May 22, 2012.

COKIC, V.P.; ANDRIC, S.A.; STOJIKOVIC, S.S.; NOGUCHI, C.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. *Blood.* v.111, n. 3, p.1117-1123, 2008.

CANÇADO, R.D.; LOBO, C.; ÂNGULO, I.L.; ARAÚJO, P.I.C.; JESUS, J.A. Protocolos clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* v.31, n.5, p. 361-366, 2009.

FRIEDRISCH, J.R.; PRA, D.; MALUF, S.W.; BITTAR, C. M.; MERGENER, M.; POLLO, T.; KAYSER, M.; SILVA, M.A.L.; HENRIQUES, J.A.P.; SILLA, L.M.R. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea, *Mutat Res.*v.649, p.213-220, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, MD; US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.

GLADWIN, M.T.; SHELHAMER, J.H.; OGNIBENE, F.P.; PEASE-FYE, M.E.; NICHOLS, J.S.; LINK, B.; PATEL, D.B.; JANKOWSKI, M.A.; PANNELL, L.K.; SCHECHTER, A.N.; RODGERS, G.P. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Brit J Haematol.* v.116, n.2, p. 436-444, 2002.

LETTRE G.; SANKARAN, V.G.; BEZERRA, M.A.; ARAÚJO, A.S.; UDA, M.; SANNA, S.; CAO, A.; SCHLESSINGER, D.; COSTA, F.F.; HIRSCHHORN, J.N.; ORKIN, S.H. DNA Polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta globin loci associate with fetal

hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.105, n.33, p.11869-11874, 2008.

MANOUILOV, K.K.; MCGUIRE, T.R.; GWILT, P.R. Colorimetric determination of hydroxyurea in human serum using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. v.708, p.321-324, 1998.

SILVA, M.C.; SHIMAUTI, E.L.T. Eficácia e toxicidade da hidroxiureia em crianças com anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter*. v.28, n.2, p.144-14, 2006.

STEINBERG, M.H.; MCCARTHY, W.F.; CASTRO, O.; BALLAS, S.K.; ARMSTRONG, F.D.; SMITH, W.; ATAGA, K.; SWERDLOW, P.; KUTLAR, A.; DeCASTRO, L.; WACLARWIN, M.A. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. *Am J Hematol*. v.85, p.403-408, 2010.

VEALE, D.; CANTWELL, B.M.J.; KERR N.; UPFOLD, A.; HARRIS, A.L. Phase I study of hydroxyurea in lung cancer. *Cancer Chemoth Pharm*. v.21, p.53-56, 1988.

WARE, R.E.; DESPOTOVIC, J.M.; MORTIER, N.A.; FLANAGAN, J.M.; HE, J.; SMELTZER, M.P.; KIMBE, A.C.; AYGUN, B.; WU, S.; HOWARD, T.; SPARREBOOM, A. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics of hydroxyurea treatment for children with sickle cell anemia. *Blood*. v.118, n.3, p. 4985-4991, 2011.

RODRIGUEZ, G.I.; KUHN, J.G.; WEISS, G.R.; HILSENBECK, S.G.; ECKARDT, J.R.; THURMAN, A.; RINALDI, D.A.; HODGES, S.; VON HOFF., D.D.; ROWINSKY, E.K. A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. *Blood*. v.91, n.5, p. 1533-1541, 1998.

Received for publication on 30<sup>th</sup> September 2013

Accepted for publication on

**APÊNDICE A - TCLE**

---





**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E**  
**ENFERMAGEM (FFOE)**

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA  
PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Prezado paciente,

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada: **“EFICÁCIA DA L-ARGINA COMO DROGA COADJUVANTE NO TRATAMENTO DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”**, que tem como objetivo principal avaliar o impacto da associação da Hidroxiuréia com uma vitamina, a arginina, na produção de óxido nítrico, um vasodilatador em pacientes com anemia falciforme. Além de correlacionar a variabilidade da resposta ao medicamento Hidroxiuréia com a presença dos fatores genéticos nos pacientes com AF acompanhados no ambulatório do HUWC do Ceará. A relevância da pesquisa é que esta substância vasodilatadora, o óxido nítrico, estaria envolvida nas crises vaso-oclusivas destes pacientes, uma vez aumentando o aminoácido arginina, substrato para formação do óxido nítrico, melhoraria a resposta ao medicamento hidroxiuréia, aumentando a produção do óxido nítrico e melhorando a qualidade de vida dos pacientes com anemia falciforme.

Para o desenvolvimento deste estudo será necessário um grupo de portadores de anemia falciforme. É necessário que os participantes deste estudo com anemia falciforme colem uma amostra de sangue (10 ml) que será realizado por profissional habilitado e com todas as técnicas adequadas.

A coleta de sangue será realizada no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará - HEMOCE, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo; em dias em que os pacientes já estarão, ali, realizando outros exames, por conta do seu acompanhamento médico. Caso seja necessária a vinda do paciente, exclusivamente, para a participação em nossa pesquisa, os pesquisadores se responsabilizarão por seu transporte até o local da coleta.

Os riscos associados ao estudo são apenas os da coleta de sangue, podendo haver o aparecimento de um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue no local da coleta. Lembrando que todo material utilizado é descartável e estéril, e os profissionais envolvidos são capacitados para tal função.

Os benefícios envolvidos são o de poder realizar um estudo que possibilite uma melhoria no prognóstico da anemia falciforme, como propiciar a elaboração de novos fármacos que possam minimizar as morbidades e a mortalidade na doença.

Convido o(a) Sr(a) a participar da pesquisa, em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Ms. Darcielle Bruna Dias Elias, que reside na rua Miguel Gonçalves, 66, Apto 202, bairro Montese, Fortaleza, CE, fone: (0xx85)-33668264; (0xx85)- 32920416. Para informações quanto aos aspectos éticos da pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídeo, situado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1290, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE ou através do telefone (0xx85) 3366 8589. Para tanto, necessitamos que o Senhor (a) autorize a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da

pesquisa, não ficará exposto(a) a nenhum risco, podendo desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com o pesquisador.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado (a) do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, assim como dos desconfortos previstos e benefícios esperados. Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifesto, por vontade própria, livre e consciente, o propósito de participar do presente estudo.

O (a) profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do participante da pesquisa

---

Assinatura de quem obteve o termo

Comitê de Ética em Pesquisa  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Cód CEP: 110.10.10



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE  
FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: [cephuwc@huwc.ufc.br](mailto:cephuwc@huwc.ufc.br)

Protocolo nº: 110.10.10

Pesquisador(a) Responsável: Darcielle Bruna Dias Elias

Departamento / Serviço:

Título do Projeto: **“Hidroxiuréia associado a L-arginina: o impacto dos polimorfismos BCL11A e HBS1L-MYB, da resposta imune e do estresse oxidativo na anemia falciforme”**.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou o projeto de pesquisa supracitado e, em tendo sido atendidas as pendências, baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 06/12/11).

Fortaleza, 06 de dezembro de 2010.

Dra. Maria de Fátima de Souza  
Coordenadora do CEP - HUWC