



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

AMANDA DE MENEZES MOTA

**EFEITO DA L-ARGININA E DO BAY 73-6691 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE
TNF- α , IL-8 E ÓXIDO NÍTRICO EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

FORTALEZA

2016

AMANDA DE MENEZES MOTA

EFEITO DA L-ARGININA E DO BAY 73-6691 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TNF-
 α , IL-8 E ÓXIDO NÍTRICO EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dra Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M871e Mota, Amanda de Menezes.
EFEITO DA L-ARGININA E DO BAY 73-6691 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TNF- α , IL-8 E ÓXIDO NÍTRICO EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME / Amanda de Menezes Mota. – 2016.
84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes .

1. Anemia falciforme. 2. Neutrófilos. 3. Citocinas. 4. Óxido nítrico. I. Título.

CDD 571.9

AMANDA DE MENEZES MOTA

EFEITO DA L-ARGININA E DO BAY 73-6691 SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TNF-
 α , IL-8 E ÓXIDO NÍTRICO EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.
Área de concentração: Patologia

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Jânia Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por realizar tantas maravilhas em minha vida, por ser minha luz e fortaleza, me sustentando nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, pelos exemplos de vida, força, amor, dedicação e honestidade. Agradeço pelo amor incondicional, apoio e por sonharem comigo a realização desta etapa.

Aos meus irmãos, Vanessa e Marcos Felipe, por estarem comigo sempre, apoiando e torcendo para que eu alcance meus objetivos.

Ao meu namorado, Alberto Filho, por todo seu amor, carinho, apoio e companheirismo.

A todos os meus amigos e familiares pelo carinho e torcida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, pela paciência, pelos valiosos ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

Às professoras Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes, Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal e Dra. Maria Jânia Teixeira pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos todos do Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) pela amizade, colaboração e momentos agradáveis.

À Maritza, pela paciência, pelo apoio moral e intelectual e por ter contribuído tanto para este trabalho.

E a todos aqueles, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia causada por uma mutação pontual no gene da β -globina caracterizada por eventos vaso-oclusivos e um estado inflamatório crônico. Estudos tem demonstrado novas opções de tratamento na AF, com a finalidade de potencializar a ação da Hidroxiuréia (HU) e com isso promover a diminuição da dosagem sem comprometer a concentração da hemoglobina fetal (HbF), bem como o uso de substâncias que possam agir no mecanismo inflamatório. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da L-arginina e do BAY 73-6691 sobre as concentrações de TNF- α , IL-8 e óxido nítrico em neutrófilos de pacientes com AF. Participaram do estudo 50 pacientes com diagnóstico molecular de AF, atendidos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza-Ceará e 30 indivíduos saudáveis como grupo controle. Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o uso de HU: SSHU (30 pacientes em uso de HU) e SS (20 pacientes sem uso de HU). Os neutrófilos dos pacientes foram extraídos do sangue total por diferença de gradiente de densidade e tratados com L-arginina e BAY 73-6691 isoladamente nas concentrações 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e com a associação L-arginina e BAY 73-6691 na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Um grupo de neutrófilos não tratados foi utilizado para comparação (HbSS). A citotoxicidade foi avaliada através da atividade de LDH e ensaio do MTT. Os níveis de TNF- α e IL-8 foram determinados por ELISA, e os níveis de NO, por ensaio colorimétrico. Foi observado que a L-arginina e o BAY 73-6691 isolados causaram toxicidade em neutrófilos de ambos os grupos apenas na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a associação não apresentou efeitos citotóxicos na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Tanto a L-arginina e o BAY 73-6691 isolados como a associação (L-arginina +BAY 73-6691) foram capazes de reduzir significativamente os níveis dos marcadores inflamatórios TNF- α e IL-8 e de elevar os níveis de NO em neutrófilos de pacientes do grupo SS, em relação ao grupo de neutrófilos não tratados (HbSS). Os resultados do estudo mostraram que a L-arginina e o BAY 73-6691 são potenciais alternativas terapêuticas para a AF por serem capazes de aumentar a biodisponibilidade do NO e reduzir o processo inflamatório em neutrófilos de pacientes com AF não tratados com HU.

Palavras-chave: Anemia falciforme, Neutrófilos, Citocinas, Óxido nítrico.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hemoglobinopathy caused by a point mutation in the β -globin gene characterized by vaso-occlusive events and a chronic inflammatory state. Studies have demonstrated new treatment options in SCA in order to potentiate the action of Hydroxyurea (HU) and thereby promote decreased dosage without compromising fetal hemoglobin concentration, as well as the use of substances that may act in the inflammatory mechanism. The present study aimed to assess the effect of L-arginine and BAY 73-6691 on TNF- α concentration, IL-8 and nitric oxide in neutrophils from patients with sickle cell anemia. The study included 50 patients with a molecular diagnosis of SCA, treated at the hematology clinic at the University Hospital Walter Cantídio in Fortaleza, Ceará, and 30 healthy individuals as a control group. The patients were divided into two groups, according to the use of HU: SCAHU (30 patients treated with HU) and SCASS (20 patients not treated with HU). Neutrophils from patients were extracted from whole blood by density gradient difference and treated with L-arginine and BAY 73-6691 alone in the concentrations 0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and L-arginine and BAY 73-6691 association at a concentration of 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$. A group of untreated cells was used for comparison. Cytotoxicity was assessed by the LDH activity and MTT assay. TNF- α and IL-8 were determined by ELISA and NO levels by colorimetric assay. It has been observed that L-arginine and BAY 73-6691 isolated neutrophils caused toxicity in both groups only at the concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ while the combination had no cytotoxic effects. L-arginine and BAY 73-6691 isolated and the combination were able to reduce levels of inflammatory markers TNF- α and IL-8 and to increase NO levels significantly in the SS group neutrophils in relation to the group untreated cells. The results of the study showed that L-arginine and BAY 73-6691 are potential therapeutic alternatives for SCA to be able to increase the bioavailability of NO and reducing the inflammatory process in neutrophils from patients with SCA not treated with HU.

Keywords: Sickle cell anemia, Neutrophils, Cytokines, Nitric Oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme	19
Figura 2: Redução da biodisponibilidade do óxido nítrico na anemia falciforme.....	21
Figura 3: Papel dos neutrófilos na vaso-oclusão.	23
Figura 4: Efeitos benéficos da hidroxiuréia.....	27
Figura 5: Estrutura química da L-arginina	29
Figura 6: Estrutura química do BAY 73-6691	32
Figura 7: Efeito da L-arginina sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20), avaliado pela atividade de LDH.....	42
Figura 8: Efeito da L-arginina sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20), avaliada pelo ensaio MTT.	43
Figura 9: Efeito do BAY 73-6691 sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20), avaliado pela atividade de LDH.....	44
Figura 10: Efeito do BAY 73-6691 sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20), avaliada pelo ensaio MTT.	45
Figura 11: Efeito da associação L-arginina 10 µg/mL e BAY 73-6691 10 µg/mL sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20), avaliado pela atividade de LDH.	46
Figura 12: Efeito da associação L-arginina 10 µg/mL e BAY 73-6691 10 µg/mL sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20), avaliado pelo ensaio do MTT.	47
Figura 13: Efeito da L-arginina sobre níveis de TNF-α em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).....	48
Figura 14: Efeito do BAY 73-6691 sobre níveis de TNF-α em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).....	49
Figura 15: Efeito da associação L-arginina 10µg/mL e BAY 73-6691 10µg/mL sobre níveis de TNF-α em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).	50
Figura 16: Efeito da L-arginina sobre os níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).....	51
Figura 17: Efeito do BAY 73-6691 sobre os níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).....	52
Figura 18: Efeito da associação L-arginina 10µg/mL e BAY 73-6691 10µg/mL sobre níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).	53
Figura 19: Efeito da L-arginina sobre os níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).....	54
Figura 20: Efeito do BAY 73-6691 sobre os níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).....	55
Figura 21: Efeito da associação L-arginina 10µg/mL e BAY 73-6691 10µg/mL sobre níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas e hematológicas dos pacientes com AF não tratados (n=20) e tratados com HU (n=30) e do grupo controle (n=30).	41
Tabela 2: Valores de média \pm erro padrão da média (E.P.M) dos resultados do estudo.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilil ciclase
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AF	Anemia falciforme
AMPc	Monofosfato de adenosina ciclina
ANOVA	Análise de variância <i>one way</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
CE	Ceará
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CVO	Crises vaso-oclusivas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FvW	Fator de von Willebrand
FT	Fator tecidual
GCS	Guanilato ciclase solúvel
GLU	Ácido glutâmico
GMPC	Monofosfato de guanosina cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
HbNO	Nitrosilhemoglobina
HbS	Hemoglobina S
HbSA	Heterozigose da HbS
HbSS	Homozigose para HbS
HBSS	Grupo de células não tratadas
HBSS	Solução balanceada de Hank's
HU	Hidroxiuréia
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídeo
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular - 1
IL-1 β	Interleucina-1 β

IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LHGDH	Laboratório de pesquisa em hemoglobinopatias e genética das doenças hematológicas
MAC-1	Antígeno macrofágico-1
NF-κB	Fator nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PDE	Fosfodiesterase
PDE9A	Fosfodiesterase 9A
PCR	Proteína C reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SS	Grupo de pacientes sem uso de HU
SSHU	Grupo de pacientes em uso de HU
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAL	Valina
VCAM-1	Molécula de adesão vascular e celular
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
O ²	Oxigênio
ONOO-	Peroxinitrito
dL	Decilitro
fL	Fentolitro
g	Gramma
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
pg	Picograma
μ g	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Anemia Falciforme	15
1.2 Fisiopatologia da AF.....	16
1.3 Manifestações clínicas.....	17
1.4 Vasculopatia na AF	18
1.4.1 Metabolismo do óxido nítrico	20
1.5 Inflamação na AF.....	21
1.5.1 Citocinas	23
1.7 Tratamento da AF	25
1.7.1 Hidroxiuréia	25
1.7.2 L-Arginina.....	28
1.7.3 Inibidores de Fosfodiesterases	30
1.8 Justificativa.....	33
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. METODOLOGIA.....	35
3.1 Aspectos éticos	35
3.2 Desenho do estudo.....	35
3.3 Casuística.....	35
3.4 Seleção da amostra	36
3.4.1. Critérios de inclusão	36
3.4.2. Critérios de exclusão:.....	36
3.5 Coleta das amostras	36
3.6. Reagentes.....	37
3.7. Métodos	37
3.7.1 Isolamento de polimorfonucleares	37
3.7.2 Tratamento dos neutrófilos com L-arginina e BAY 73-6691	37
3.7.3 Ensaios de citotoxicidade	38
3.7.4 Determinação do TNF- α	39
3.7.5 Determinação da IL-8	39

3.7.6 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO).....	40
3.8 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Características clínico-laboratoriais dos indivíduos em estudo.....	41
4.2 Avaliação da citotoxicidade da L-arginina em neutrófilos de pacientes com AF.....	42
4.2.1 Atividade de lactato desidrogenase (LDH)	42
4.2.2 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	43
4.3 Avaliação da citotoxicidade do BAY 73-6691 em neutrófilos de pacientes com AF	44
4.4 Avaliação da citotoxicidade da associação L-arginina e BAY 73-6691 em neutrófilos de pacientes com AF	46
4.5 Determinação dos níveis de TNF- α	47
4.6 Determinação dos níveis de IL-8.....	50
4.7 Determinação dos níveis de NO	53
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO.....	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A- PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	77
APÊNDICE A - TERMO DE DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	81
APÊNDICE B.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anemia Falciforme

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária causada por uma mutação pontual no gene da β -globina. Essa mutação leva à substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina, gerando uma molécula anormal de hemoglobina, denominada hemoglobina S (HbS), que em baixas tensões de oxigênio, sofre polimerização, causando deformação dos eritrócitos (ZAGO; PINTO, 2007; CANÇADO *et al.*, 2009; ADEKILE, 2013). Os indivíduos com AF apresentam a HbS em homozigose (HbSS) e os indivíduos com heterozigose para HbS (traço falciforme-HbAS) não apresentam sintomatologia clínica significativa (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000).

A AF é uma das anemias hemolíticas mais comuns do mundo (McGANN, 2016). A frequência da alteração do gene da HbS chega a 25% da população de algumas regiões africanas e, conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Banco Mundial, estima-se que na África nasçam cerca de 270 mil crianças por ano com algum tipo de hemoglobinopatia associada à presença da hemoglobina S (BRASIL, 2009; PIEL, 2013).

A AF originou-se na África e foi trazida pelos escravos para as Américas durante o período da escravatura. A maioria dos negros trazidos da África através do comércio transatlântico de escravos foram distribuídos entre os EUA, Brasil e Caribe (HUTTLE *et al.*, 2015). Assim, cerca de 3,6 milhões de negros africanos foram trazidos ao Brasil, causando miscigenação racial e disseminação da HbS no país, favorecendo a continuidade dessa anemia que é apontada pela literatura científica brasileira como grave problema de saúde pública (BRASIL, 2002; JESUS, 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, esta variação do gene da hemoglobina pode ser encontrada em frequências de 2% a 6% nas regiões do país, aumentando para 6% a 10% na população afrodescendente brasileira. No Nordeste do Brasil, a prevalência da alteração é de 3%, chegando a 5,5% no estado da Bahia (BRASIL, 2001). Segundo Pinheiro *et al.* (2006) em Fortaleza, Ceará, a prevalência é de 4,1% de HbS sendo 3,8% de recém-nascidos HbAS e 0,2% HbSS. Estimativas recentes sugerem que 2 a 3 milhões de americanos e 1 a 2 milhões de brasileiros são portadores do traço falciforme (HUTTLE *et al.*, 2015) e que no Brasil, cerca de 25 mil a 50 mil pessoas têm AF (SAÚDE, 2014).

1.2 Fisiopatologia da AF

A mutação no gene da hemoglobina compreende a base da fisiopatologia da anemia falciforme. Uma única substituição de nucleotídeo no 6º códon do gene da globina β leva a uma substituição de aminoácidos (Glu \rightarrow Val) que é responsável pela formação do tetrâmero anormal HbS (STEINBERG *et al.*, 2008; REES; WILLIAMS; GLADWIN; 2010;).

O aminoácido ácido glutâmico tem sua cadeia lateral carregada negativamente, enquanto que a valina é classificada como um aminoácido sem cargas, ou neutro. Essa troca de aminoácidos que envolve a saída de um com carga negativa (ácido glutâmico) e a entrada de outro sem carga elétrica ou neutro (valina) resulta na perda de cargas negativas da HbS em relação à HbA, fato que causa a mobilidade eletroforética mais lenta da HbS (NAOUM, 2000; IQBAL, 2013; YOSMANOVICH *et al.*, 2016).

A HbS, quando desoxigenada, 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, e assim, torna-se menos solúvel e agrega-se em longos polímeros. Os polímeros derivam do alinhamento de moléculas de HbS unidas por ligações não covalentes, que são denominadas polimerização, agregação ou gelificação (KUYPERS, 2014; GHATGE *et al.*, 2016;).

A formação dos polímeros causa deformação e diminuição da flexibilidade, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou drepanócito, ocasionando encurtamento da vida média dessas células na circulação, o que favorece a ocorrência de eventos de vaso-oclusão, episódios de dor e lesão de vários órgãos, resultando em diminuição da qualidade de vida e aumento da taxa de mortalidade (KATO; PINTO, 2007; STEINBERG *et al.*, 2008).

O grau de polimerização dos eritrócitos sob desoxigenação está intimamente relacionado com o grau da doença. A polimerização da desoxi-hemoglobina S depende de numerosas variáveis, como concentração de oxigênio, pH, concentração intracelular de HbS e HbF, temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais e anormais (KUYPERS, 2014; VIGIL; HOWARD, 2015).

O fenômeno de falcização pode ser revertido quando níveis elevados de oxigênio são novamente atingidos, no entanto, falcizações sucessivas alteram permanentemente a estrutura da membrana do eritrócito, proporcionando a formação de células irreversivelmente falcizadas (STEINBERG *et al.*, 2008). Nessas células, são observadas alterações moleculares, dentre as quais o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e de membrana e a

exposição de proteínas transmembrana, em especial a fosfatidilserina, de dentro para fora da célula. (FRENETTE; ATWEH, 2007; KATO; PINTO, 2007; BARABINO; PLATT; KAUL, 2010; CYTLAK *et al.*, 2013).

Essas modificações moleculares tem como consequência fenômenos que favorecem a hemólise e a vaso-oclusão (FERONE; FRANK, 2004), como enrijecimento da membrana da hemácia, geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumento do estresse oxidativo (CHIRICO *et al.*, 2016), redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), dano no endotélio (HOPPE, 2014), hipercoagulabilidade (NOUBOUOSSIE; KEY; ATAGA, 2015), aumento da expressão de moléculas de adesão de células sanguíneas e endoteliais, além de um processo inflamatório crônico (HEBBEL *et al.*, 2009).

1.3 Manifestações clínicas

A vaso-oclusão representa o evento fisiopatológico determinante da AF (NOVELLI; GLADWIN, 2016). A obstrução de vasos sanguíneos pode ocasionar respostas inflamatórias, isquemia ou infarto em vários tecidos levando à lesão progressiva de diversos órgãos, tais como ossos, baço, pulmões, rins, dentre outros (MADIGAN; MALIK, 2006; ZAGO; PINTO, 2007; HEBBEL, 2014).

Dentre os eventos clínicos da AF podemos citar: crises dolorosas (SMITH *et al.*, 2008), síndrome torácica aguda (STA), complicações cardíacas (MAIOLI *et al.*, 2016), elevada suscetibilidade às infecções bacterianas (MORRISSEY *et al.*, 2015), priapismo (SERJEANT; HAMBLETON, 2015), úlceras de perna (NGUYEN *et al.*, 2016), insuficiência renal crônica (SHARPE; THEIN, 2014), osteonecrose (GATIN *et al.*, 2016) e acidente vascular cerebral (AVC) (LAWRENCE; WEBB, 2016).

A gravidade das manifestações clínicas nos pacientes com AF é variável. A heterogeneidade fenotípica da doença é influenciada por fatores intrínsecos, tais como: a coexistência de alfa-talassemia, os níveis de hemoglobina fetal (HbF), o tipo de haplótipo associado ao gene da hemoglobina S (HbS) e ainda, por fatores extrínsecos ou ambientais como as condições socioeconômicas e o acesso à assistência médica (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; KATO; PINTO, 2007; FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010; DOMINGOS *et al.*, 2014; TEWARI *et al.*, 2015).

A HbF é o principal modulador da doença, pois dilui a concentração de HbS circulante, inibindo sua polimerização, e, conseqüentemente, diminui as crises vaso-oclusivas e manifestações clínicas. Desse modo, elevadas concentrações de HbF reduzem a gravidade

da doença, favorecendo o aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes (FIGUEIREDO, 2007; AKINSHEYE *et al.*, 2011; ANTWI-BOASIAGO, 2015; HABARA; STEINBERG, 2016).

Existem cinco haplótipos diferentes associados a HbS: Senegal, Benin, Bantu, Camarões e Árabe-indiano, sendo os haplótipos Senegal e Árabe-indiano associados com altos níveis de HbF e Benin e Bantu com menores níveis de HbF (ADEKILE, 2013; BITOUNGUI *et al.*, 2015). No Brasil e no Ceará, há a predominância dos haplótipos Bantu e Benin, os quais são relacionados com as formas mais graves da doença (SILVA, GONÇALVES, 2009).

1.4 Vasculopatia na AF

A hemólise desempenha um papel iniciador no processo vaso-oclusivo, uma vez que pode induzir inflamação, disfunção endotelial e aumento estresse oxidativo. Durante a hemólise crônica dos eritrócitos falciformes, há liberação de Hb livre e arginase, enzima que desagrada o substrato L-arginina usado para a produção de NO, um gás vasodilatador produzido pelas células endoteliais. A depleção de substrato e o sequestro de NO causam redução local desta substância e vasoconstrição (KATO; PINTO 2007; KATO *et al.*, 2009; MORRIS, 2014).

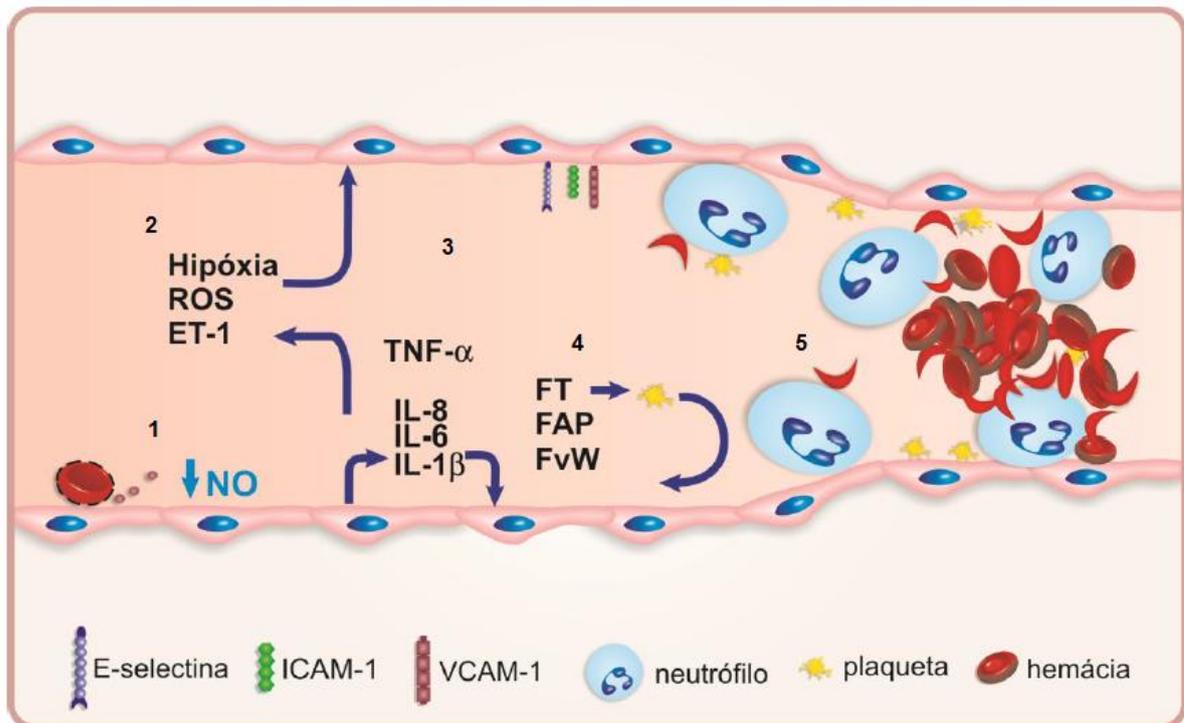
A vasoconstrição retarda o fluxo sanguíneo, propicia o processo de falcização, aumenta a ativação plaquetária e a expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais, prejudicando a integridade do endotélio vascular e promovendo a adesão de hemácias e leucócitos (CONRAN; COSTA, 2009; HEBBEL; OSAROGIAGBON; KAUL, 2009; DOMINICAL *et al.*, 2014; POTOKA; GLADWIN, 2014).

A presença de mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e proteína C reativa (PCR) causam ativação endotelial (BANDEIRA *et al.*, 2014). A Hb livre danifica e também ativa as células endoteliais, as quais liberam endotelina-1 (ET-1), um peptídeo pró-inflamatório e potente vasoconstritor de grandes e pequenas artérias e veias. Além da ação vasoconstritora, esse peptídeo aumenta expressão de moléculas de adesão como VCAM-1 e ICAM-1 e estimula leucócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos (ZAGO; PINTO, 2007; HEBBEL, 2009; LANARO *et al.*, 2009).

O endotélio ativado também promove ativação da via de sinalização do fator de transcrição nuclear NF- κ B, conduzindo à regulação positiva da expressão de moléculas de

adesão de superfície e à produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e leucotrienos, fatores vasoconstritores e pró-coagulantes, tais como o fator de von Willebrand (FvW), fator de ativação de plaquetas (PAF) e o fator tecidual (TF) (CONRAN; FRANCO-PENTEADO; CONRAN; COSTA, 2009; COSTA, 2009; PROENÇA-FERREIRA *et al.*, 2014)

Figura 1: Vaso-oclusão na anemia falciforme



Fonte: Adaptado de Costa *et al.*, 2013.

(1) O contato direto das hemácias SS e a presença de hemólise intravascular levam à ativação das células endoteliais; a presença do heme livre na circulação causa dano no vaso e consome o NO. (2) A presença de espécies reativas de oxigênio (ROS), a hipóxia e os vasoconstritores como ET-1 também contribuem para a ativação das células endoteliais. (3) Após sua ativação, as células endoteliais aumentam a expressão das moléculas de adesão (como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) na superfície do vaso e também há liberação de citocinas como o IL-8, IL-6, IL-1β e TNF-α, contribuindo para a inflamação vascular e a ativação das células sanguíneas. (4) O estado de hipercoagulabilidade leva a níveis aumentados de Fator Tecidual (FT), Fator ativador de plaquetas (FAP), Fator de Von Willebrand (FvW) e ativação plaquetária. A ativação do endotélio também conta com a presença das plaquetas ativadas no vaso sanguíneo e a sua adesão à parede vascular. (5) Os leucócitos e as hemácias aderem à parede vascular devido à sua ativação e expressão de moléculas de adesão e, além disso, pode haver interações heterotípicas entre leucócitos aderidos e hemácias. A vasoconstrição elevada e a obstrução física do vaso ocasionam uma redução no fluxo sanguíneo com conseqüente hipóxia e falcização das hemácias, dificultando a passagem de sangue, ocasionando a vaso-oclusão.

Além disso, os leucócitos promovem agregação de outras células sanguíneas, aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão e dano tecidual que exacerba ainda mais o processo inflamatório local (CONRAN; COSTA, 2009). Assim, todos esses eventos citados agem como moduladores do fenômeno obstrutivo vascular característico da doença (Figura 1).

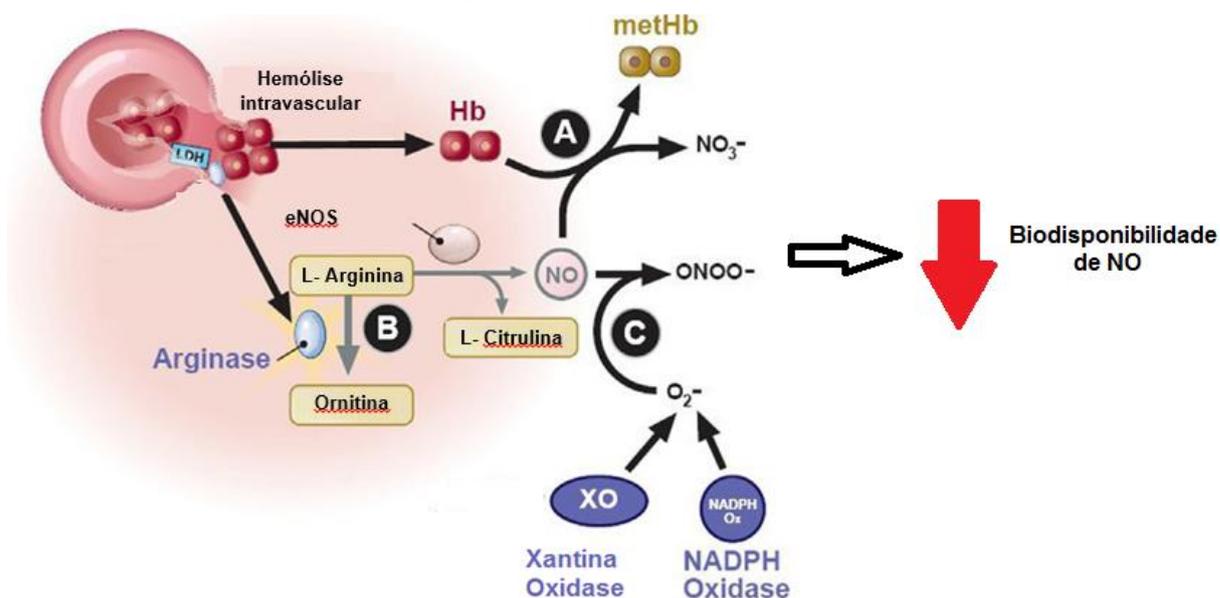
1.4.1 Metabolismo do óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um potente vasodilatador fisiológico essencial para homeostase vascular. O NO é sintetizado por células endoteliais a partir do seu substrato L-arginina, o qual é convertido em citrulina e NO pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (MAITRE *et al.*, 2015). O NO se difunde através da membrana celular para se ligar à enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), a qual é responsável por converter o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). A produção de GMPc ativa a quinase dependente de GMPc, inibindo a vasoconstrição devido à redução dos níveis intracelulares de cálcio livre. Dessa forma, o óxido nítrico atua impedindo a adesão dos leucócitos ao endotélio, inibindo a expressão de moléculas de adesão, atuando como uma substância anti-inflamatória (MORRIS, 2008; GLAWDIN *et al.*, 2011; MORRIS, 2014).

Os pacientes com AF apresentam uma redução da biodisponibilidade do NO. Existem três principais mecanismos que justificam essa depleção dos níveis de NO: a reação da hemoglobina livre com o NO disponível, a liberação de arginase e reação de radicais superóxido (O_2^-) com o NO. (WOOD; GLADWIN, 2008; AKINSHEYE; KLINGS, 2010; KATO, 2015).

Durante a hemólise intravascular há liberação de hemoglobina, a qual reage com o NO disponível, formando metahemoglobina e nitrato inativo. Além disso, durante o processo de hemólise também ocorre a liberação de arginase. O substrato L-arginina para a produção de NO pode ser degradado em ornitina pela enzima arginase. Desse modo, a L-arginina é transformada em ornitina, em vez de citrulina e NO, diminuindo assim, a disponibilidade do substrato para a produção de NO (REITER; WANG; TANUS-SANTOS, 2002; MOZAR *et al.*, 2016). Outro fator que contribui para redução do NO é a reação de radicais superóxido (O_2^-) com o NO disponível, formando espécies reativas de oxigênio com elevada capacidade oxidante, como o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Figura 2) (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). Assim, a diminuição do NO facilita a vasoconstrição, aumenta a ativação plaquetária, e a adesão endotelial e leucocitária levando ao processo vaso-oclusivo, além de estar relacionada com hipertensão pulmonar, AVC e nefropatia (MORRIS, 2007; MAITRE *et al.*, 2015).

Figura 2: Redução da biodisponibilidade do óxido nítrico na anemia falciforme.



Fonte: Adaptado de KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007.

Hemólise intravascular reduz a biodisponibilidade de NO na AF. O NO é produzido pela eNOS através do substrato L-arginina. A hemólise intravascular libera hemoglobina e arginase. A hemoglobina livre reage com o NO disponível, gerando metahemoglobina e nitrato inativo (A). A arginase transforma a L-arginina em ornitina, consumindo o substrato para a produção de NO (B). Além disso, os radicais O₂⁻ reagem com NO, formando radicais ONOO⁻ (C).

Além disso, o NO tem um papel importante na expressão de VCAM-1/ICAM-1 nas células endoteliais, mas o mecanismo pelo qual o NO altera a atividade e expressão das integrinas e outras moléculas de adesão ainda não está totalmente esclarecido (KAHN *et al.*, 2013; KATO, 2015).

1.5 Inflamação na AF

A AF também é caracterizada por um estado inflamatório crônico de origem multifatorial, que envolve células endoteliais, eritrócitos, leucócitos e plaquetas através do aumento das interações entre célula-célula e célula-endotélio (KATO; PINTO, 2007). Os leucócitos desempenham um papel importante no processo inflamatório e vaso-oclusivo, pois são células grandes (12-15µm), rígidas e seu recrutamento para o endotélio microvascular reduz o fluxo sanguíneo nestes vasos. Além disso, a produção contínua de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios pelo endotélio perpetuam o estado inflamatório crônico (DOMINICAL *et al.*, 2016).

Os pacientes com AF que apresentam manifestações clínicas mais graves tendem a ter contagem de leucócitos elevada. A leucocitose se correlaciona positivamente com óbito precoce, acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos e síndrome torácica aguda em pacientes falciformes. Isto implica que a contagem elevada de leucócitos, principalmente neutrófilos, é um importante fator de risco para AF, enquanto que a redução na contagem de neutrófilos pode trazer benefícios aos pacientes (OKPALA, 2004; CONRAN *et al.*, 2007; WALI *et al.*, 2012).

Nos pacientes com AF, os eritrócitos falciformes causam dano à parede vascular e o endotélio ativado pode aumentar a expressão de moléculas de adesão em sua superfície, com consequente recrutamento de neutrófilos para a microcirculação (ZHANG *et al.*, 2016). Em seguida, os neutrófilos expressam uma variedade de moléculas de adesão na sua superfície, facilitando a migração transendotelial e a interação com hemácias falciformes. As L-selectinas, proteínas transmembranares presentes na superfície dos leucócitos, interagem através da PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), com as moléculas P e E-selectinas, expressas pelas células endoteliais e ativadas por fatores, tais como EROs, TNF- α e outras citocinas, e intermedeiam a ligação e rolamento do neutrófilo na camada endotelial celular. A adesão da célula é intermediada, principalmente, pela integrina MAC-1 (antígeno macrofágico-1), que se liga ao endotélio pelas moléculas de adesão como a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (HIDALGO *et al.*, 2009; POLANOWSKA-GRABOWSKA *et al.*, 2010; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Dessa forma, os neutrófilos aderentes interagem com as hemácias falciformes circulantes, levando a obstrução transitória ou prolongada do fluxo de sangue. A obstrução do fluxo sanguíneo aumenta o tempo de trânsito dos glóbulos vermelhos, produzindo isquemia, aumentando o afoçamento as hemácias, e promovendo o recrutamento de mais neutrófilos e interações heterotípicas (Figura 3) (DOMINICAL *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

Portanto, o processo vaso-oclusivo e a lesão endotelial resultam em aumento da expressão de moléculas de adesão para neutrófilos, induzindo quimiotaxia, migração transendotelial e interações adesivas com hemácias, com outros leucócitos, plaquetas e células do endotélio vascular, levando a uma ativação pancelular que resulta na liberação de mais citocinas e quimiocinas próinflamatórias, perpetuando um ciclo vicioso de repetida ativação e adesão celular, com produção de moléculas inflamatórias e oxidantes que proporcionam um desequilíbrio do balanço oxidativo e um estado inflamatório crônico (CONRAN *et al.*, 2009; MANWANI; FRENETTE, 2013).

aderência das hemácias em foice ao endotélio através de diferentes mecanismos, tais como a indução da expressão da molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1), fibronectina, produção de quimiocinas e a expressão de integrinas em eritrócitos falciformes, contribuindo para a vaso-oclusão (PATHARE *et al.*, 2003).

O TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa) é sintetizado principalmente por macrófagos ativados e exerce efeitos pró-inflamatórios por induzir no endotélio a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos, monócitos e linfócitos, bem como por estimular as células endoteliais a secretarem quimiocinas, induzindo quimiotaxia e o recrutamento de mais leucócitos para o foco inflamatório (CAVALCANTE *et al.*, 2016). Esta citocina também estimula a produção de radicais livres, e a síntese de outros mediadores inflamatórios como IL-1 e IL-6 (BILATE, 2007).

A interleucina-8 (IL-8) é produzida principalmente por células endoteliais em regiões de injúria e leucócitos ativados, a partir de estímulos, como elevadas concentrações plasmáticas de TNF- α . Atua aumentando a afinidade de moléculas de superfície dos leucócitos a receptores endoteliais, o recrutamento de neutrófilos e apresenta importante papel na ativação e desgranulação de neutrófilos. Na AF, a IL-8 promove o aumento na aderência das hemácias falciformes ao endotélio vascular via ativação de integrinas e através do aumento da fibronectina endotelial (MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000; CAJADO *et al.*, 2011; KEIKHAEI *et al.*, 2013).

A IL-6 é sintetizada principalmente por fagócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos em resposta a outras citocinas, como IL-1 e TNF- α . Na imunidade inata, a IL-6 estimula a síntese de mediadores da fase aguda da inflamação nos hepatócitos e, portanto, está envolvida na resposta inflamatória aguda. Participa também da resposta imune mediada por células, uma vez que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-17) e inibe a ação das células T reguladoras. Tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (BILATE, 2007; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000). Estudos têm comprovado um aumento da IL-6 em pacientes com AF em relação ao grupo de indivíduos saudáveis (THASSILA *et al.*, 2013).

Outro mediador pró-inflamatório é a IL-17, uma citocina produzida pelos Th17, que inicia uma resposta inflamatória induzindo as células-alvo a produzirem fatores pró-inflamatórios tais como interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e matriz metaloproteinase (MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009). O plasma de pacientes com AF contém níveis elevados de TNF- α , IL-6, IL-1, IL-17, e IL-8 e redução de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (CAVALCANTE *et al.*, 2016; OWUSU-ANSAH *et al.*, 2016). Dessa maneira, as

citocinas parecem ser um dos principais fatores que contribuem na patogênese do fenômeno da vaso-oclusão na AF (PATHARE *et al.*, 2003; KEIKHAEI *et al.*, 2013),

1.7 Tratamento da AF

Não há nenhum medicamento específico para o tratamento da AF. Os medicamentos disponíveis aos pacientes são utilizados apenas como estratégias para aliviar os sintomas da doença e/ou para tentar evitar complicações mais graves. A maioria das terapias oferecidas para os pacientes são de suporte e incluem transfusão sanguínea, uso de antimicrobianos, ácido fólico, vitaminas, antioxidantes e analgésicos (CHOU; FASANO, 2016; ZAGO, 2002; BRAGA, 2007).

As opções terapêuticas utilizadas no tratamento da AF são hidroxiuréia (HU) e o transplante de células tronco hematopoiéticas, o qual é o único tratamento considerado curativo, entretanto, quando dispõe de um doador compatível, é considerado de alto risco ao paciente por apresentar grande índice de complicações e mortalidade (SILVA; SHIMAUTI, 2006; SHETH; BHATIA, 2015; MORIN *et al.*, 2016).

Contudo, com as novas descobertas a cerca da fisiopatologia da doença, estudos buscam novas propostas terapêuticas, com a finalidade de reduzir os processos de inflamação, estresse oxidativo, aumentar a disponibilidade de óxido nítrico, para amenizar os episódios de vaso-oclusão e de hemólise (ARCHER; GALACTEROS; BRUGNARA, 2015).

1.7.1 Hidroxiuréia

A hidroxiuréia (HU) é um medicamento que tem sido alvo de interesse científico há mais de 100 anos. A HU é utilizada no tratamento de várias doenças mieloproliferativas e neoplásicas (MAMEZ *et al.*, 2016). A fácil administração, a baixa toxicidade e os múltiplos benefícios de ordem clínica, garantem à HU um lugar de destaque em vários esquemas terapêuticos nas doenças hematológicas (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

A constatação de que valores aumentados de HbF previnem várias complicações da AF estimulou o interesse na identificação de agentes farmacológicos capazes de induzir a expressão de HbF (PACK-MABIEN; IMRAN, 2013; PACE *et al.*, 2015). A HU foi identificada como um potente indutor HbF e posteriormente foi descoberta como uma opção viável de tratamento eficaz para a AF (PELIZARO *et al.*, 2012).

Em 1999 o tratamento com HU foi liberado pela agência norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*) para o uso em pacientes com AF (AGRAWAL *et al.*, 2013). No Brasil, o protocolo de tratamento com HU foi introduzido em 2002 e, até o momento presente, constitui o avanço mais importante no tratamento de pacientes com AF (CANÇADO *et al.*, 2009).

O único medicamento que, efetivamente, tem forte impacto na melhora da qualidade de vida dos pacientes com AF é a HU, uma vez que previne complicações clínicas, diminui fenômenos de falcização e de hemólise, reduz o número de CVOs e necessidade de transfusão, número de hospitalizações, tempo de internação e ocorrência de STA, além de atenuar o processo inflamatório e reduzir o número de óbitos (CANÇADO *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2014; KEIKHAEI; YOUSEFI; BAHADORAM, 2015; WANG, 2016).

A HU é um agente citotóxico, recombinogênico e antineoplásico. Sua ação decorre da inibição a ribonucleotídeo-redutase, uma enzima que converte os ribonucleotídeos para desoxiribonucleotídeos que são necessários para a síntese de DNA (McGANN; WARE; 2015). Ao inibir a ribonucleotídeo-redutase, ocorre o bloqueio da síntese de DNA, retendo as células na fase S e interrompendo o ciclo celular nas fases S e G2. Entretanto, os mecanismos pelos quais a HU aumenta a produção de HbF ainda não estão totalmente elucidados (PULE *et al.*, 2015).

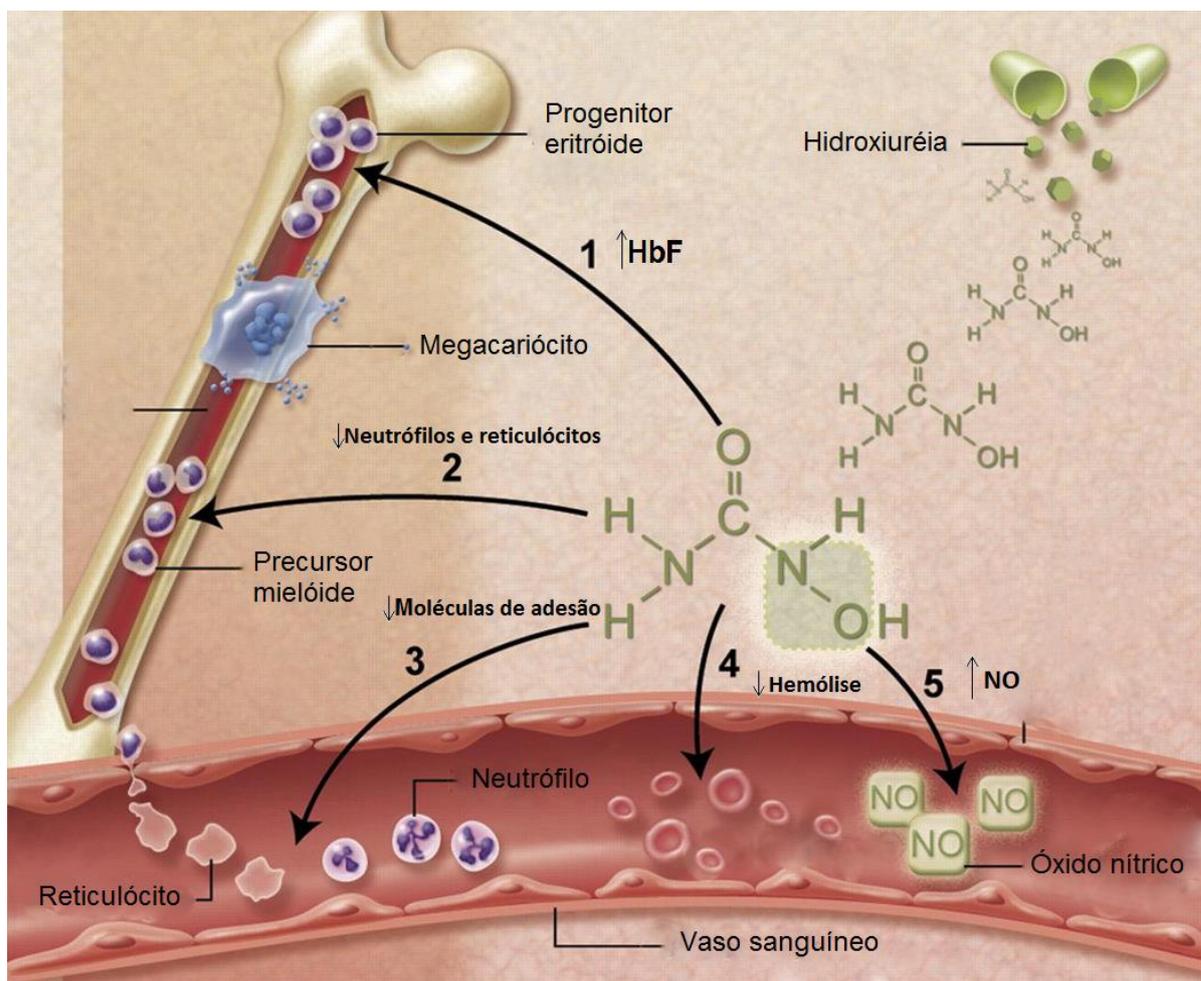
A HU promove diversos efeitos sobre a linhagem eritrocitária, dentre os quais, destaca-se o aumento dos valores de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM) e redução no número de reticulócitos, leucócitos e plaquetas (SILVA-PINTO *et al.*, 2013; KEIKHAEI; YOUSEFI; BAHADORAM, 2015). Além disso, ocasiona diminuição da expressão de moléculas de adesão, incluindo E-selectina e P-selectina, I-CAM, moléculas de adesão plaquetária e VCAM-1 (CONRAN *et al.*, 2004), como também causa redução das proteínas receptoras localizadas em células endoteliais e diminuição da produção de citocinas, mediadores inflamatórios e oxidantes (COVAS *et al.*, 2004)

Outra resposta favorável da HU tem sido o aumento da síntese e biodisponibilidade de NO pela ativação da guanilil ciclase solúvel e GMPc. Estudos mostram que a HU estimula a fosforilação e a ativação da eNOS que resultam na produção de NO. Além disso, esse medicamento é oxidado pela hemoglobina gerando a nitrosilhemoglobina (HbNO) e o NO, além de gerar NO através das enzimas peroxidase, urease e catalase (COKIC *et al.*, 2003; CANALLI *et al.*, 2008; COKIC *et al.*, 2008).

Assim, a HU pode ser doadora de NO, e tem sido proposto que esta propriedade contribui para a atividade desse fármaco na produção de HbF (COKIC *et al.*, 2003). Isto pode

ser demonstrado na pesquisa de Tantaway (2014), na qual uma alteração genética na enzima eNOS está associado com menor nível de hemoglobina fetal. A Figura 4 demonstra a estrutura química da HU e ilustra alguns dos vários mecanismos pelos quais a HU pode proporcionar benefícios terapêuticos para indivíduos com AF.

Figura 4: Efeitos benéficos da hidroxiuréia



Fonte: Adaptado de McGANN; WARE; 2011

Efeitos benéficos da hidroxiureia na anemia falciforme: (1) Indução de hemoglobina fetal; (2) Diminuição do número de neutrófilos e de reticulócitos; (3) Alteração na expressão de moléculas de adesão sobre os neutrófilos circulantes e reticulócitos e diminuição da adesão com consequente diminuição da lesão endotelial; (4) Macrocitose e aumento da hidratação diminuindo a hemólise; (5) Liberação local de óxido nítrico (NO) resultando em vasodilatação.

Segundo Cançado *et al.* (2009), a HU é indicada para pacientes com idade superior a três anos, com três ou mais episódios de crises vaso-oclusivas com necessidade de atendimento médico; uma crise torácica aguda recidivante; um ou mais acidentes vasculares encefálicos; priapismo recorrente e anemia grave e persistente, nos últimos 12 meses. É contraindicada para pacientes com hipersensibilidade à HU e com problemas relacionados à disfunção da medula óssea como: contagem de neutrófilos inferior a $2.5 \times 10^9/L$, contagem de

plaquetas inferior que $95 \times 10^9/L$, concentração de Hb inferior 4,5 g/dL ou contagem de reticulócitos inferior $95 \times 10^9/L$.

A HU tem como principal reação adversa em curto prazo a mielossupressão dose-dependente. Como um agente antiproliferativo, a HU pode ocasionar neutropenia, anemia, e trombocitopenia, ulceração da pele ou agravamento de úlcera já existente, distúrbios gastrointestinais e atraso de crescimento, efeitos adversos que são indesejáveis, especialmente em crianças e jovens (SEGAL *et al.*, 2008; STROUSE *et al.*, 2008; CANÇADO *et al.*, 2009). A terapia com esse medicamento em longo prazo também pode prejudicar respostas imunitárias e assim, possivelmente, aumentar o risco de infecções (LEDERMAN *et al.*, 2014; KUVIBIDILA *et al.*, 2015). A HU também pode ser associada à leucemia além de provavelmente induzir infertilidade no sexo masculino (WILSON, 2000; DEBAUN, 2014).

É importante ressaltar que aproximadamente de 25% dos pacientes não respondem à terapia com HU, e em vários casos de tratamento crônico o efeito benéfico diminui, sendo necessário doses cada vez maiores para se alcançar o efeito, aumentando a toxicidade (ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2005). Portanto, são necessários estudos adicionais acerca de novas estratégias terapêuticas, visando a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com anemia falciforme.

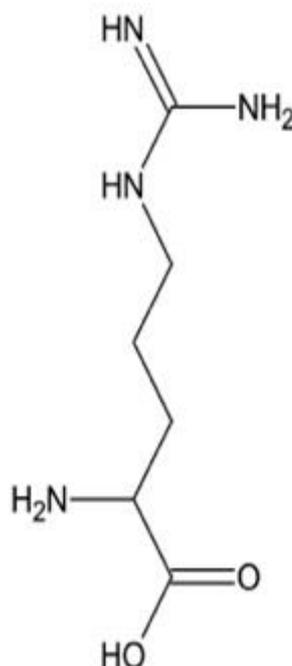
1.7.2 L-Arginina

A L-arginina ou ácido L-amino-5-guanidino-valérico (Figura 5) é um aminoácido semi-essencial que 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). A L-arginina é o substrato para enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS_e) para a produção de NO, portanto desempenha um papel fundamental na formação de NO e se encontra reduzida em portadores de AF (MORRIS, 2014).

O metabolismo da L-arginina está alterado na AF o que contribui para disfunção endotelial, vaso-oclusão, complicações pulmonares e mortalidade precoce. Na AF, durante o processo de hemólise, ocorre a liberação de hemoglobina livre que reage rapidamente com NO, resultando em elevado consumo de NO e formação de espécies reativas de oxigênio, inibindo a vasodilatação. Além disso, simultaneamente a enzima arginase é liberada na circulação em sua forma ativa, catalisando a hidrólise de L-arginina, substrato para a

produção de NO, inativando-a em ornitina e uréia (KATO, 2008; OMODEO-SALE *et al.*, 2010; MORRIS, 2014).

Figura 5: Estrutura química da L-arginina



Fonte: TAPIERO *et al.*, 2002.

Além desses eventos, a inflamação, a depleção de antioxidantes e a lesão de isquemia-reperfusão contribuem para a alteração no metabolismo da L-arginina, bem como a disfunção renal, comumente associada a AF, a qual compromete a síntese endógena de arginina a partir de citrulina. A biodisponibilidade da L-arginina também é diminuída através dos elevados níveis de ornitina devido a ornitina e arginina competirem pelo mesmo sistema de transporte celular. A dimetilarginina assimétrica (ADMA) é um análogo da arginina e inibidor da enzima NOS e está elevada na AF, reduzindo ainda mais os níveis de L-arginina. Desta forma, os pacientes com AF apresentam um maior consumo e diminuição da produção de NO e L-arginina, contribuindo para complicações associadas à AF (MORRIS *et al.*, 2013; MORRIS; BAKSHI, 2016).

Nesse contexto, regular a disponibilidade de L-arginina é um mecanismo potencial que pode levar ao controle da produção de NO (KATO, 2008; JAIN; GLAWIN, 2010). Estudos clínicos com suplementação de L-arginina mostraram um aumento na biodisponibilidade do NO amenizando a hipertensão pulmonar (WILLIAM; WAUGH, 2005; MORRIS, 2006; MORRIS *et al.*, 2008). Estudos realizados com camundongos transgênicos

com células falciformes, mostraram que a terapia com L-arginina melhorou a função microvascular, diminuiu citocinas inflamatórias e proteína C-reativa e protegeu contra o estresse oxidativo (ARCHER *et al.*, 2008; KAUL; ZHANG; DASGUPTA, 2008).

Em pesquisas envolvendo pacientes com AF, o tratamento com L-arginina foi capaz de aumentar os níveis de glutathione dos eritrócitos e metabolitos do óxido nítrico (NOx), além de reduzir a dor e o consumo de opiáceos (MORRIS *et al.*, 2013; KEHINDE *et al.*, 2015). ELIAS e colaboradores (2013) verificaram que a suplementação com L-arginina em pacientes em uso de HU foi capaz de elevar a produção de HbF e reduzir o estresse oxidativo e o estado inflamatório crônico de pacientes com AF após 12 semanas de tratamento.

1.7.3 Inibidores de Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDEs) catalisam a hidrólise intracelular e degradam GMPc e monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), regulando desse modo as vias de sinalização dos nucleotídeos cíclicos e respostas biológicas. Inibidores de PDE podem ser utilizados clinicamente para o tratamento de várias doenças, incluindo distúrbios do sistema nervoso central, disfunção erétil, hipertensão pulmonar, insuficiência cardíaca aguda e doenças inflamatórias (BOBIN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016).

Os níveis intracelulares de AMPc e GMPc são fortemente controlados por 2 mecanismos: taxa de síntese da adenilil ciclase (AC) e GCs respectivamente, ou pela taxa de hidrólise da ponta 3'fosfodiesterase do AMPc ou GMPc pelas fosfodiesterases (PDE) que atuam inativando os nucleotídeos cíclicos (MATSUMOTO; KOBAYASHI; KAMATA, 2003).

As enzimas PDEs podem ser agrupados em 11 famílias de isoenzimas com base no seu substrato, especificidade e regulação (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006). A relação risco-benefício e a ocorrência de efeitos indesejáveis dos inibidores de PDE não seletivos dificultou o sucesso terapêutico dessas drogas e, portanto, estimulou a indústria farmacêutica a desenvolver inibidores de PDE específico para uma família (LI *et al.*, 2016).

Os inibidores de PDE bloqueiam a capacidade de hidrólise exercida pelas PDEs, causando uma elevação da concentração de nucleotídeo cíclico correspondente ao tipo de inibidor utilizado. Dessa forma, estão sendo estudados como possível estratégia terapêutica na AF, com a finalidade de promover o aumento intracitoplasmático de GMPc e NO. Tendo em vista a importância da via NO/GMPc na indução de HbF, a modulação dos níveis

intracelulares de NO e GMPc através do uso de inibidores de fosfodiesterases pode ser efetiva no tratamento da AF (COKIC *et al.*, 2003; CONRAN, 2015).

Uma vez que cada PDE tem uma expressão diferente nos tecidos ou célula, os inibidores de PDE específico oferecerem uma abordagem terapêutica mais específica para a célula. Por exemplo, os inibidores da enzima PDE5, a qual está presente nas células musculares lisas e corpos cavernosos, são atualmente utilizados para o tratamento de doenças vasculares, disfunção erétil e hipertensão pulmonar (BURNETT *et al.*, 2014; ARCHER; GALACTEROS; BRUGNARA, 2015). Um estudo realizado em pacientes com AF com hipertensão pulmonar relatou que o uso do sildenafil, inibidor da PDE5, induziu a elevação de HbF e melhorou o quadro de hipertensão e a capacidade de fazer exercícios. Contudo, essa terapia parece estar relacionada com aumento de internações por crises de dor (MACHADO *et al.*, 2011).

Das 11 famílias de PDE, as isoformas PDE 1A, B e C, 2A, 5A, 6A, B e C, 9A, 10A e 11A têm maior especificidade para a degradação do GMPc e AMPc. O estudo de Almeida *et al.*, (2008) demonstrou que a enzima fosfodiesterase 9A (PDE9A) é expressa nos reticulócitos e neutrófilos humanos, com uma expressão ainda maior nestas células em indivíduos com AF. Neste contexto, a PDE9 pode representar um alvo farmacológico para o aumento intra-eritrocitário de GMPc, com um consequente aumento de NO e indução de HbF.

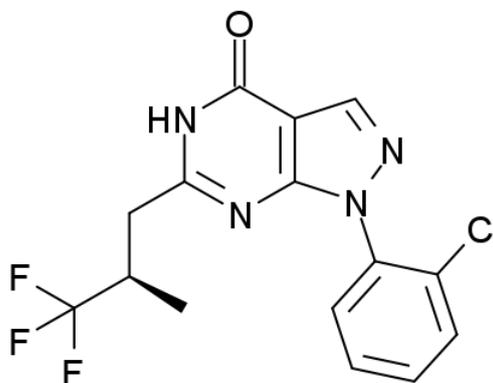
1.7.3.1. BAY 73-6691

De acordo com a literatura, o BAY 73-6691 (Figura 6) é um inibidor eficaz da PDE9A. Este inibidor tem sido submetido a ensaios pré-clínicos para o tratamento de doença de Alzheimer, pois a inibição da PDE9A, também expressa no cérebro, tem sido sugerida como uma terapia para melhorar a memória através da via NO / GMPc (HENDRIX, 2005).

Quanto ao uso do BAY 73-6691 como uma possível estratégia terapêutica para o tratamento da AF, os resultados de um estudo feito por Almeida e colaboradores (2008) mostraram que a inibição *in vitro* da PDE9A nas células da linhagem eritróide e leucócitos foi capaz de elevar a expressão do gene HBG, o qual é responsável pela produção de HbF. O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou ainda que o uso desse inibidor associado à HU em modelo murino falciforme causou redução no recrutamento de leucócitos para a

microcirculação, diminuição nas crises de vaso-oclusão, elevação dos níveis de GMPc e prolongou a sobrevivência dos animais (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Figura 6: Estrutura química do BAY 73-6691



Fonte: WUNDER, 2005

Recentemente, um estudo realizado por Barbosa *et al.* (2015) em neutrófilos de pacientes com AF com BAY 73-6691 constatou que a inibição da PDE9A promoveu aumento da biodisponibilidade de NO, induziu a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, reduziu a peroxidação lipídica, bem como, diminuiu os níveis de TNF- α e a atividade mieloperoxidase.

1.8 Justificativa

A AF é a doença hereditária mais prevalente na população brasileira e é considerada um problema de saúde mundial em decorrência de suas elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Vários estudos têm demonstrado que a doença é caracterizada por um processo inflamatório crônico que potencializa os processos de hemólise e de vaso-occlusão. Estudos relatam uma diminuição da biodisponibilidade do NO em crianças e adultos com AF, evidenciando o envolvimento do metabolismo do NO na fisiopatologia da doença. Estas alterações propiciam o aumento da produção de radicais livres, dano endotelial, angiogênese e estado pró-coagulante nesses pacientes. A HU além de aumentar a concentração da HbF, tem uma ação moduladora em todos esses processos, no entanto, pesquisas têm evidenciado o aumento do índice de dano no DNA em pacientes em uso crônico de HU. Neste contexto, várias estratégias terapêuticas têm sido estudadas no sentido de detectar um fármaco que possa substituir a HU. Porém por se tratar de uma doença de causa genética as estratégias têm sido direcionadas a estudos com substâncias que possam elevar a HbF sem causar toxicidade ou que possam potencializar a ação da HU, contribuindo para a diminuição do uso da mesma, sem comprometer o maior marcador clínico de prognóstico que é a HbF.

As pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) foram ensaios pré-clínicos avaliando os efeitos da HU e a ação do BAY 73-6691 em neutrófilos de pacientes com AF e ensaio clínicos com a suplementação da L-arginina associada a HU em pacientes com AF em estado basal. Dando continuidade as pesquisas pré-clínicas, considerando a carência de dados na literatura referentes a este assunto, este estudo buscou avaliar o efeito da L-arginina e do BAY 73-6691 isoladamente e da associação de ambos, em neutrófilos de pacientes em uso ou de HU determinando a toxicidade e a sua ação sobre moduladores inflamatórios e no NO, gerando dados que possam contribuir com o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para a doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da L-arginina e do BAY 73-6691 sobre as concentrações de TNF- α , IL-8 e óxido nítrico em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a citotoxicidade da L-arginina, do BAY 73-6691 e da associação de L-arginina e BAY 73-6691 sobre neutrófilos de pacientes com AF com e sem uso de HU.

Avaliar os efeitos da L-arginina, do BAY 73-6691 e da associação de L-arginina e BAY 73-6691 sobre os níveis das citocinas inflamatórias IL-8 e TNF- α em neutrófilos de pacientes com AF com e sem uso de HU;

Avaliar os efeitos da L-arginina, do BAY 73-6691 e da associação de L-arginina e BAY 73-6691 sobre os níveis de óxido nítrico em neutrófilos de pacientes com AF com e sem uso de HU.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O estudo está em conformidade com as orientações constantes da Resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde e com o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo número 949.975 (ANEXO A). Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

3.2 Desenho do estudo

Estudo do tipo experimental no qual foi incluído pacientes com diagnóstico de AF atendidos no Ambulatório de Hematologia do HUWC. O estudo foi realizado no período de janeiro de 2015 a janeiro de 2016.

3.3 Casuística

Participaram do estudo 50 pacientes adultos, de ambos os sexos, com diagnóstico molecular de anemia falciforme, acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, em Fortaleza, Ceará. Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de seleção da amostra e estratificados em dois grupos, de acordo com o tratamento com hidroxiuréia:

- Grupo SS (formado por 20 pacientes sem uso de hidroxiuréia);
- Grupo SSHU (formado por 30 pacientes em uso de hidroxiuréia na dose de 20-30mg/kg/dia).

Um grupo controle formado por 30 indivíduos voluntários, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, com perfil eletroforético HbAA.

O grupo SS foi constituído por pacientes que não fazem uso de HU a pelo menos 1 ano.

3.4 Seleção da amostra

3.4.1. Critérios de inclusão

Pacientes com AF:

- Pacientes adultos (maiores de 18 anos), de ambos os sexos, em uso de HU, com diagnóstico de AF (HbSS) previamente confirmado por estudo clínico e molecular;
- Pacientes no estado estacionário doença, segundo os critérios estabelecidos por Ballas (2012): 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.

Grupo controle: Indivíduos maiores de 18, de ambos os sexos, sem hemoglobinopatias, que declararam e aparentavam estar saudáveis.

3.4.2. Critérios de exclusão:

Pacientes com AF

- Pacientes com diagnóstico de hemossiderose transfusional, em uso contínuo de vitaminas antioxidantes e/ou anti-inflamatórios.

Grupo controle: Indivíduos em uso contínuo de vitaminas antioxidantes e/ou anti-inflamatórios.

3.5 Coleta das amostras

Foram coletados aproximadamente 6mL de sangue venoso em um tubo de coleta à vácuo, contendo o anticoagulante heparina. As amostras foram mantidas em banho de gelo até a realização do isolamento dos polimorfonucleares, realizado em até uma hora após a coleta.

3.6. Reagentes

BAY 73-6691, dimetilsulfóxido (DMSO), brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e Triton X-100, azul de Tripan, Histopaque 1.077 e L-arginina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). LDH Liquiform® foi adquirido da Labtest Diagnostica (Lagoa Santa, MG, Brasil). O kit Nitrite/Nitrate foi adquirido da Roche® (Mannheim, Germany) e os kits TNF- α OptEIA e IL-8 OptEIA foram adquiridos da BD Biosciences (San Diego, CA).

3.7. Métodos

3.7.1 Isolamento de polimorfonucleares

As células polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, foram separadas do sangue periférico de cada paciente por gradiente de densidades através de centrifugação sobre duas camadas de Histopaque® de densidades 1.077 e 1.119 g / L (ENGLISH; ANDERSEN, 1974).

Cerca de 6mL de sangue total colhido em heparina foram despejados lentamente sobre uma camada contendo as duas densidades de Histopaque® (proporção 1:1:1). Em seguida, foi realizada uma centrifugação de 30 minutos a 2500 rpm, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fase contendo as células polimorfonucleares foi recolhida para outro tubo falcon®.

As hemácias contaminantes foram lisadas pela adição de uma solução lisante de NH₄Cl 0,83% (com pH 7,2 a 37°C) e após ser lavado com salina, o *pellet*, formado, predominantemente, de neutrófilos, foi ressuspenso em meio HBSS (Solução balanceada de Hank's) (pH = 7,4, sem cálcio e magnésio). A viabilidade celular foi determinada pela técnica de Azul Tripan a 2% (RENZI *et al.*, 1993). Foram aceitas para o estudo isolados com viabilidade celular $\geq 90\%$.

3.7.2 Tratamento dos neutrófilos com L-arginina e BAY 73-6691

Os neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células) foram tratados com L-arginina nas concentrações 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e BAY 73-6691 nas concentrações 0,1, 1, 10 e 100

$\mu\text{g/mL}$ e com a associação das drogas: L-arginina $10 \mu\text{g/mL}$ + BAY 73-6691 $10 \mu\text{g/mL}$. O tratamento foi realizado com incubação por 15 minutos, a 37°C .

As concentrações 0,1, 1, 10 e $100 \mu\text{g/mL}$ foram escolhidas com base em um estudo semelhante realizado com BAY 73-6691 (BARBOSA *et al.*, 2015). Assim, foram adotadas as mesmas concentrações de L-arginina a fim de obter um padrão de concentração para ambas as drogas.

A concentração máxima das drogas que não apresentou citotoxicidade pelos ensaios realizados durante o estudo ($10 \mu\text{g/mL}$) foi escolhida para compor os testes com a associação.

Neutrófilos não tratados (HBSS) foram utilizados como controle e neutrófilos tratados com Triton X-100 a 0,2% foram utilizados como controle citotóxico nos ensaios de citotoxicidade.

3.7.3 Ensaios de citotoxicidade

Atividade de LDH

A LDH é uma enzima citosólica, assim sua detecção no fluido extracelular é um indicativo de morte ou perda da integridade celular devido a danos da membrana celular (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). O princípio do ensaio constitui numa medida espectrofotométrica (340 nm) do consumo de NADH durante a redução de piruvato a lactato pela LDH.

A atividade da enzima LDH foi determinada no sobrenadante das células utilizando-se o Kit LDH Liquiform (Labtest®).

Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

O ensaio de MTT é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o quanto o MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor azul. Desse modo, a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

A placa foi centrifugada a 2.000 rpm por 15 minutos a 25°C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 200 µL de solução de MTT na concentração de 5mg/mL e as células foram incubadas novamente por mais 3 horas. Por fim, a placa foi centrifugada novamente nas mesmas condições acima e, após descarte do sobrenadante, foi incubada por 48hs a 37°C. Decorrido este tempo, foram adicionados 150 µL de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan. As placas foram agitadas durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm.

3.7.4 Determinação do TNF- α

Os níveis de TNF- α liberados foram determinados no sobrenadante das células utilizando o kit Human TNF alpha ELISA (eBioscience®, USA), cujo método é o ensaio imunoenzimático (ELISA).

Nesse método, o anticorpo para um antígeno específico, chamado de anticorpo de captura é, inicialmente, adsorvido no poço. Depois, a amostra com o antígeno é adicionada e se liga a esse anticorpo. Logo após, é adicionado outro anticorpo específico para o antígeno. Finalmente, um terceiro anticorpo ligado à enzima é adicionado. Essa enzima irá reagir com o substrato adicionado, gerando cor. A intensidade da reação (cor mais fraca ou mais forte) é proporcional à quantidade de antígeno presente.

O procedimento foi realizado de acordo com as orientações descritas pelo fabricante. A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa a 450 nm e os resultados convertidos a pg/mL por curva padrão.

3.7.5 Determinação da IL-8

Os níveis de IL-8 liberados foram determinados no sobrenadante das células utilizando o kit de ELISA (eBioscience®, USA). O procedimento foi realizado de acordo com as orientações descritas pelo fabricante. A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa a 450 nm e os resultados convertidos a pg/mL por curva padrão.

3.7.6 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)

Os neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram tratados com: L-arginina, nas concentrações 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, BAY 73-6691 nas concentrações 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, Associação L-arginina 10 $\mu\text{g/mL}$ + BAY 73-6691 10 $\mu\text{g/mL}$ e HBSS (neutrófilos não tratados – estado basal). Os níveis de NO foram determinados pela concentração de nitrito/nitrato (NOx) no sobrenadante das células por meio de uma reação colorimétrica entre a amostra e o reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% N-naftiletilenodiamida em ácido fosfórico a 5%). O kit Nitrite/Nitrate foi adquirido da Roche[®] (Mannheim, Germany). A absorbância do complexo colorido formado foi mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 560 nm.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Utilizou-se o teste D'Agostino e Pearson para verificar a normalidade dos dados. A comparação entre as médias foi realizada utilizando o teste t-Student para dados com distribuição normal ou Mann-Whitney para dados, sem distribuição normal, e análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Características laboratoriais dos indivíduos em estudo.

A população em estudo foi constituída por 50 pacientes com AF com idade variando de 22 a 69 anos, com mediana de 37,80 anos, sendo 26 (52%) do sexo feminino e 24 (48%) do sexo masculino. As características demográficas e hematológicas dos pacientes com AF e do grupo controle estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características demográficas e hematológicas dos pacientes com AF não tratados (n=20) e tratados com HU (n=30) e do grupo controle (n=30).

Parâmetros	SS	SSHU	AA	Valor de p
Masculino/Feminino(n)	8/12	16/14	11/19	----
Idade (anos)	37,0 (22-52)	38,14 (22 – 69)	31,5 (20 - 50)	----
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	2,86 (1,57 – 3,38)	2,62 (1,94 – 3,50)	5,02 (4,3 – 5,9)	$p < 0,0001^{a,b}$
Hemoglobina (g/dL)	9,29 (6,54 – 10,70)	9,18 (6,57 – 12,70)	13,8(11,9–16,7)	$p < 0,0001^{a,b}$
Hematócrito (%)	27,76 (19,0 – 32,26)	27,40 (19,54 – 38,8)	41,2(36,8-49,9)	$p < 0,0001^{a,b}$
Leucócitos ($\times 10^9/\text{L}$)	10,53 (7,16 – 14,63)	7,91 (4,42 – 12,04)	7,4 (3,9 – 13,8)	$p < 0,0001^{a,c}$
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	413,5 (255,1 – 552,7)	374,53 (165,0 – 689,0)	229,9 (142-304)	$p < 0,0001^{a,b}$
HbF (%)	8,5 (5,0 – 13,20)	10,54 (1,9 – 28,10)	NA	$p = 0,4605$

SS: pacientes não tratados com HU; SSHU: pacientes tratados com HU; NA: não avaliado; HbF: hemoglobina fetal. Os resultados estão expressos em média (mínimo – máximo). ^(a): $p \leq 0,05$ entre os grupos SS e HbAA; ^(b): $p \leq 0,05$ entre os grupos SSHU e HbAA; ^(c): $p \leq 0,05$ entre os grupos SS e SSHU

Observou-se na Tabela 1 que os pacientes com AF tratados e não tratados com HU apresentaram valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito significativamente inferiores quando comparados ao grupo controle. Os pacientes com AF apresentaram valores de plaquetas superiores ao grupo controle. Os pacientes não tratados com HU apresentaram valor de leucócitos significativamente superior ao grupo de pacientes tratados com HU e ao grupo controle.

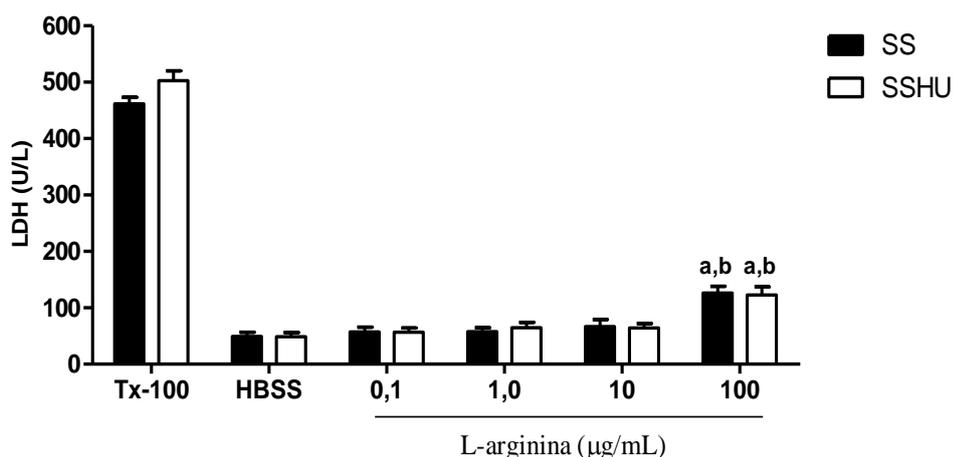
4.2 Avaliação da citotoxicidade da L-arginina em neutrófilos de pacientes com AF

4.2.1 Atividade de lactato desidrogenase (LDH)

A Figura 7 apresenta os resultados obtidos na avaliação do efeito da L-arginina sobre a toxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, avaliada pela atividade da enzima LDH. O tratamento de neutrófilos SS e SSHU com L-arginina não promoveu aumento da atividade de LDH quando comparado ao grupo HBSS nas concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, houve elevação da atividade LDH nos neutrófilos SS e SSHU tratados com L-arginina na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao grupo de células não tratadas (HBSS) e às demais concentrações de L-arginina ($p < 0,05$).

O tratamento com Triton X-100, controle citotóxico positivo, promoveu significativo aumento da atividade de LDH em neutrófilos SS e SSHU. Não se observou diferença significativa entre os neutrófilos SS e SSHU não tratados com L-arginina, indicando que o tratamento com HU não influenciou na toxicidade em neutrófilos neste modelo de ensaio ($p = 0,6162$).

Figura 7: Efeito da L-arginina sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados ($n=30$) e não tratados com HU ($n=20$), avaliado pela atividade de LDH.



^a $p < 0,05$ entre 100 $\mu\text{g/mL}$ de L-arginina e células não-tratadas (HBSS)

^b $p < 0,05$ entre 100 $\mu\text{g/mL}$ e demais concentrações de L-arginina

Nota: Tx-100: Controle citotóxico (0,2% v/v); HBSS: células não tratadas; Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

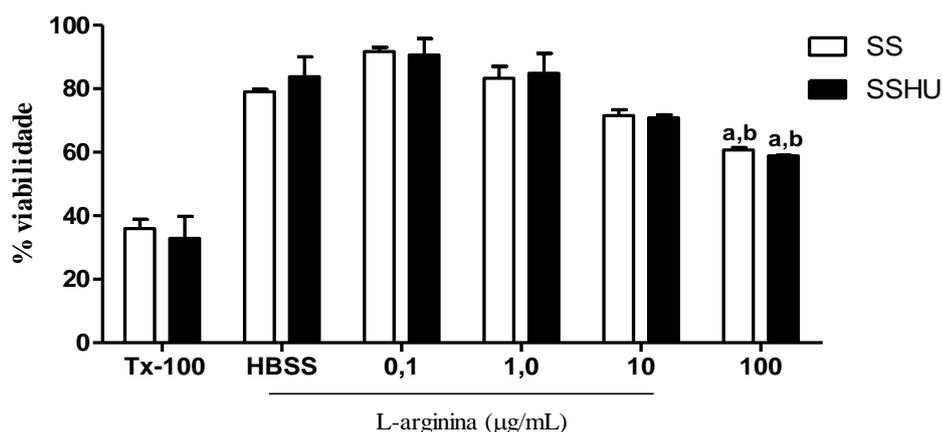
Os valores de média \pm erro padrão da média (E.P.M) de todos os resultados deste estudo estão apresentados na Tabela 2 (APÊNDICE B).

4.2.2 Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

A Figura 8 apresenta o efeito da L-arginina sobre a toxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, avaliado pelo ensaio do MTT. O tratamento de neutrófilos SS e SSHU com L-arginina não promoveu diminuição da viabilidade celular nas concentrações 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ quando comparado ao grupo de células não tratadas (HBSS). Entretanto, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ causou redução da viabilidade celular nos neutrófilos SS e SSHU quando comparado ao grupo de células não tratadas HBSS ($p < 0,001$).

O tratamento com Triton X-100, controle citotóxico positivo, promoveu redução da viabilidade de neutrófilos SS e SSHU. Não se observou diferença significativa entre os neutrófilos SS e SSHU não tratados com L-arginina, indicando que o tratamento com HU não influenciou na toxicidade em neutrófilos neste modelo de ensaio ($p = 0,8366$).

Figura 8: Efeito da L-arginina sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados ($n=30$) e não tratados com HU ($n=20$), avaliada pelo ensaio MTT.



^a $p < 0,05$ entre 100 $\mu\text{g/mL}$ de L-arginina e células não-tratadas (HBSS)

^b $p < 0,05$ entre 100 $\mu\text{g/mL}$ e demais concentrações de L-arginina

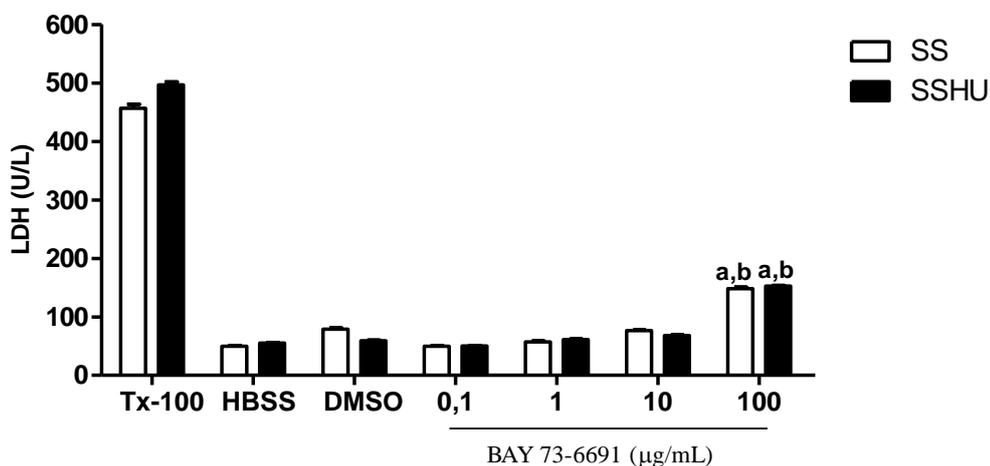
Nota: Tx-100: Controle citotóxico (0,2% v/v); HBSS: células não tratadas. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

4.3 Avaliação da citotoxicidade do BAY 73-6691 em neutrófilos de pacientes com AF

A figura 9 apresenta os resultados obtidos na avaliação do efeito do BAY 73-6691 sobre a toxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, avaliados pela atividade da enzima LDH. O tratamento de neutrófilos SS e SSHU com BAY 73-6691 não promoveu aumento da atividade de LDH nas concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao grupo veículo. No entanto, foi observada elevação significativa da atividade LDH nos neutrófilos SS e SSHU tratados com BAY 73-6691 na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao grupo de células não tratadas (HBSS), ao grupo veículo e às demais concentrações de BAY 73-6691.

O tratamento com Triton X-100, controle citotóxico positivo, promoveu aumento da atividade de LDH em neutrófilos SS e SSHU. Não se observou diferença significativa entre os neutrófilos SS e SSHU não tratados com BAY 73-6691, indicando que o tratamento com HU não influenciou na toxicidade em neutrófilos neste modelo de ensaio ($p > 0,05$).

Figura 9: Efeito do BAY 73-6691 sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados ($n=30$) e não tratados com HU ($n=20$), avaliado pela atividade de LDH.



^a $p < 0,05$ entre 100 $\mu\text{g/mL}$ de BAY 73-6691 e células não-tratadas (HBSS)

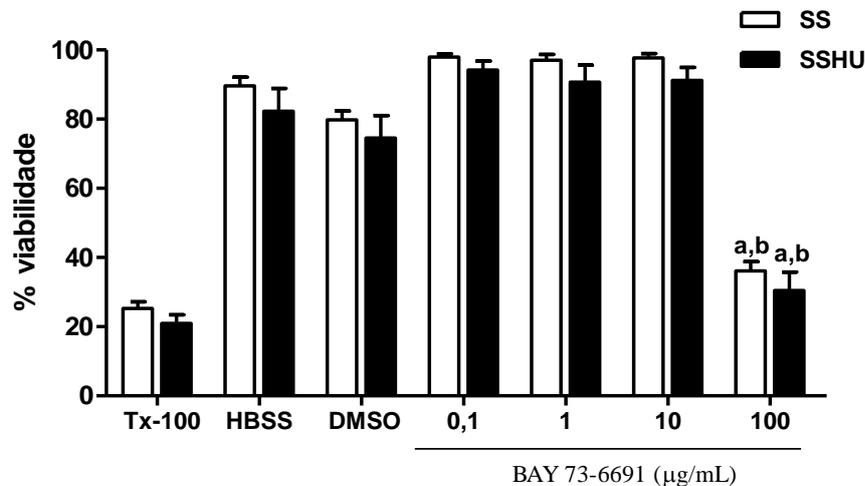
^b $p < 0,05$ entre 100 $\mu\text{g/mL}$ e demais concentrações de BAY 73-6691

Nota: Tx-100: Controle citotóxico (0,2% v/v); HBSS: células não tratadas; DMSO: veículo (1% v/v); Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

A figura 10 apresenta o efeito do BAY 73-6691 sobre a toxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, avaliado pelo ensaio do MTT. O tratamento com BAY 73-6691 não diminuiu a viabilidade celular de neutrófilos SS e SSHU quando comparado ao grupo veículo nas concentrações 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ promoveu redução da viabilidade celular nos neutrófilos SS e SSHU quando comparado ao grupo veículo e às outras concentrações da droga.

Não se observou diferença significativa entre os neutrófilos SS e SSHU não tratados com BAY 73-6691, indicando que o tratamento com HU não influenciou na toxicidade em neutrófilos neste modelo de ensaio ($p > 0,05$). O tratamento com Triton X-100, controle citotóxico positivo, promoveu significativa redução da viabilidade de neutrófilos SS e SSHU.

Figura 10: Efeito do BAY 73-6691 sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados ($n=30$) e não tratados com HU ($n=20$), avaliada pelo ensaio MTT.



^a $p < 0,05$ entre 100 $\mu\text{g/mL}$ de BAY 73-6691 e células não-tratadas (HBSS)

^b $p < 0,05$ entre 100 $\mu\text{g/mL}$ e demais concentrações de BAY 73-6691

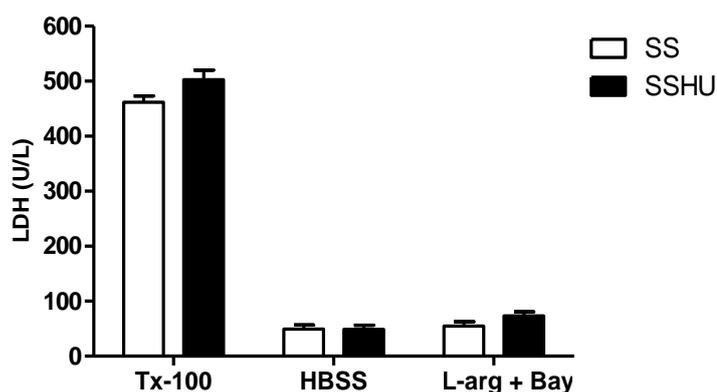
Nota: Tx-100: Controle citotóxico (0,2% v/v); HBSS: células não tratadas; DMSO: veículo (1% v/v); Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

4.4 Avaliação da citotoxicidade da associação L-arginina e BAY 73-6691 em neutrófilos de pacientes com AF

Com base nos ensaios prévios de toxicidade das drogas isoladas, foi escolhida uma concentração longe da faixa de citotoxicidade, a de 10 µg/mL, para o tratamento de neutrófilos com a associação L-arginina e BAY 73-6691. Dessa forma, a Figura 11 apresenta o efeito da associação L-arginina 10 µg/mL e BAY 73-6691 10 µg/mL sobre a toxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, avaliada pela atividade de LDH. O tratamento de neutrófilos SS e SSHU com L-arginina em conjunto com o BAY 73-6691 não promoveu aumento da atividade de LDH quando comparado ao grupo de neutrófilos não tratados (HBSS) ($p < 0,05$).

O tratamento com Triton X-100, controle citotóxico positivo, promoveu significativo aumento da atividade de LDH em neutrófilos SS e SSHU. Entre os neutrófilos SS e SSHU não foi observado diferença significativa, indicando que o tratamento com HU não influenciou na toxicidade em neutrófilos neste modelo de ensaio.

Figura 11: Efeito da associação L-arginina 10 µg/mL e BAY 73-6691 10 µg/mL sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20), avaliado pela atividade de LDH.

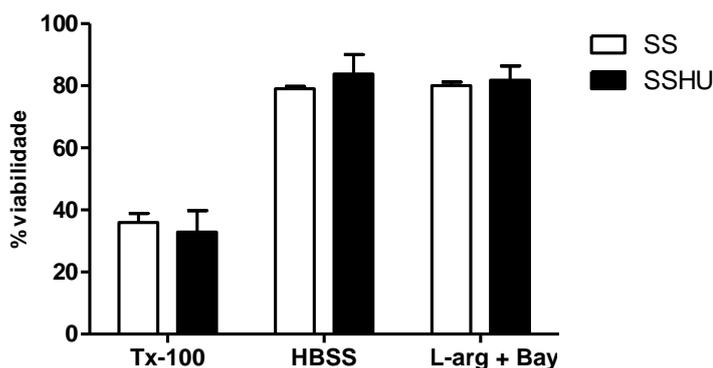


Nota: Controle citotóxico (0,2% v/v); HBSS: células não tratadas; Tx-100; Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

A Figura 12 apresenta o efeito da associação L-arginina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e BAY 73-6691 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre a toxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU, avaliado pelo ensaio do MTT. O tratamento de neutrófilos SS e SSHU com L-arginina em conjunto com o BAY 73-6691 não promoveu aumento da atividade de LDH quando comparado ao grupo HBSS.

Não foi observada diferença significativa entre os neutrófilos SS e SSHU, indicando que o tratamento com HU não influenciou na toxicidade em neutrófilos neste modelo de ensaio. O tratamento com Triton X-100, controle citotóxico positivo, promoveu aumento da atividade de LDH em neutrófilos SS e SSHU.

Figura 12: Efeito da associação L-arginina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e BAY 73-6691 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20), avaliado pelo ensaio do MTT.



Nota: Controle citotóxico (0,2% v/v); HBSS: células não tratadas; Tx-100; Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

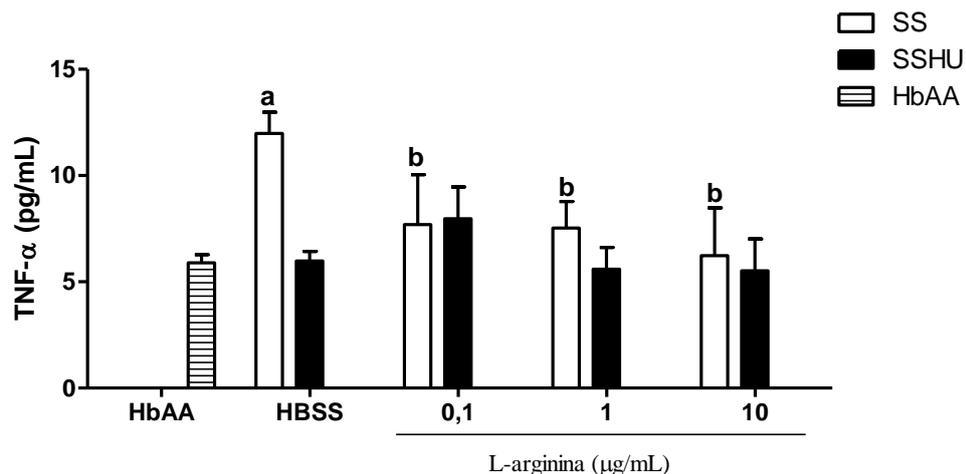
4.5 Determinação dos níveis de TNF- α

Os resultados dos efeitos da L-arginina e do BAY 73-6691, obtidos através do ensaio de LDH e MTT, demonstraram toxicidade em neutrófilos de pacientes com AF na maior concentração testada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e assim, para a determinação de TNF- α , IL-8 e NO, foram escolhidas apenas as concentrações que não promoveram efeitos tóxicos (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A Figura 13 apresenta o efeito da L-arginina sobre os níveis basais de TNF- α em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. Foi observado os neutrófilos SS apresentaram níveis basais de TNF- α significativamente elevados em relação aos neutrófilos SSHU e neutrófilos do grupo controle (HbAA) ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os níveis basais de TNF- α em neutrófilos SSHU e neutrófilos do grupo controle ($p > 0,05$).

Foi observado que o tratamento com L-arginina reduziu os níveis de TNF- α em neutrófilos SS nas concentrações 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao grupo HBSS. O tratamento com L-arginina não promoveu redução significativa dos níveis de TNF- α em neutrófilos SSHU.

Figura 13: Efeito da L-arginina sobre níveis de TNF- α em neutrófilos de pacientes com AF tratados ($n=30$) e não tratados com HU ($n=20$).



^a $p < 0,05$ entre HBSS-SS e HbAA

^b $p < 0,05$ entre L-arginina ($\mu\text{g/mL}$) e HBSS-SS

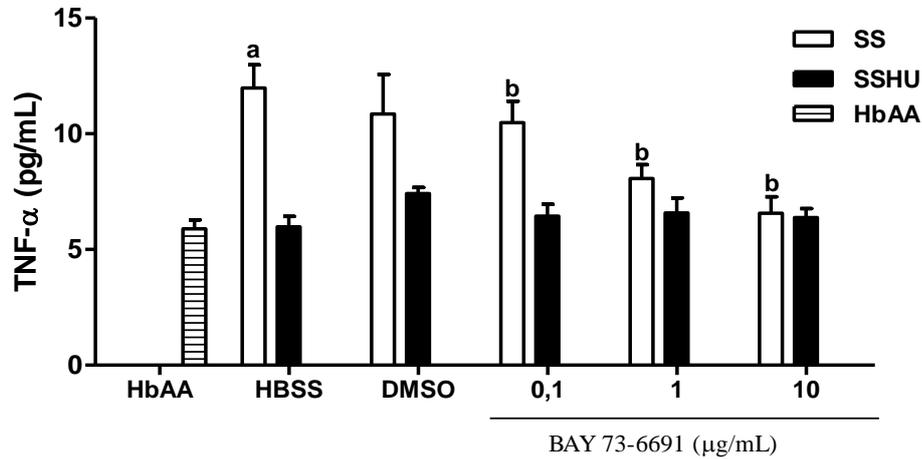
Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

A Figura 14 apresenta o efeito do tratamento com o BAY 73-6691 sobre os níveis de TNF- α em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. O tratamento com BAY 73-6691 promoveu redução dos níveis de TNF- α em neutrófilos SS nas concentrações 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao grupo HBSS. O tratamento com o BAY 73-6691 não diminuiu significativamente os níveis de TNF- α em neutrófilos SSHU.

O veículo (DMSO 1% v/v) não causou alteração os níveis basais de TNF- α em

neutrófilos SS ($p=0,554$) e em neutrófilos SSHU ($p=0,119$).

Figura 14: Efeito do BAY 73-6691 sobre níveis de TNF- α em neutrófilos de pacientes com AF tratados ($n=30$) e não tratados com HU ($n=20$).



^a $p < 0,05$ entre HBSS-SS e HbAA

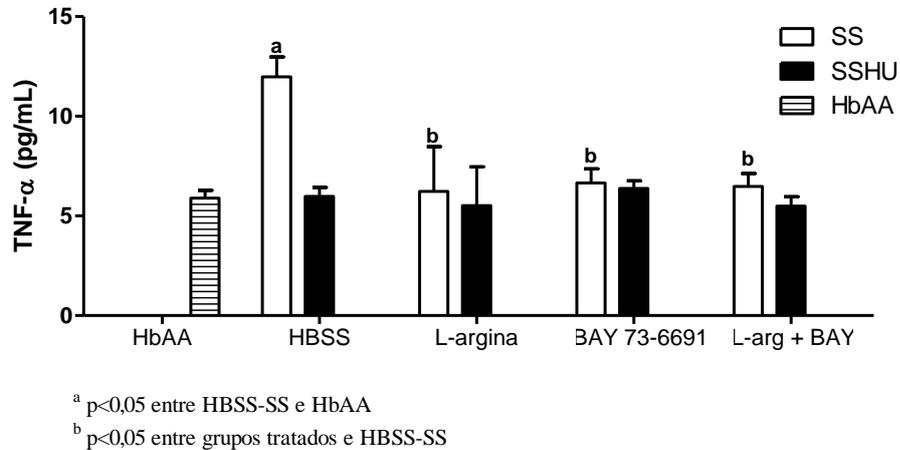
^b $p < 0,05$ entre BAY 73-6691 ($\mu\text{g/mL}$); HBSS-SS e DMSO

Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas; DMSO: veículo; Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

A Figura 15 mostra o efeito do tratamento com a associação das drogas L-arginina e BAY 73-6691, ambas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, sobre os níveis de TNF- α em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU.

O tratamento com a associação L-arginina e BAY 73-6691 promoveu significativa redução dos níveis de TNF- α em neutrófilos SS quando comparado ao grupo HBSS ($p=0,0013$). Não se observou diferença significativa dos níveis de TNF- α entre o tratamento com a associação e o tratamento de L-arginina 10 $\mu\text{g/mL}$ e BAY 73-6691 10 $\mu\text{g/mL}$ de forma isolada ($p > 0,05$).

Figura 15: Efeito da associação L-arginina 10µg/mL e BAY 73-6691 10µg/mL sobre níveis de TNF-α em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).



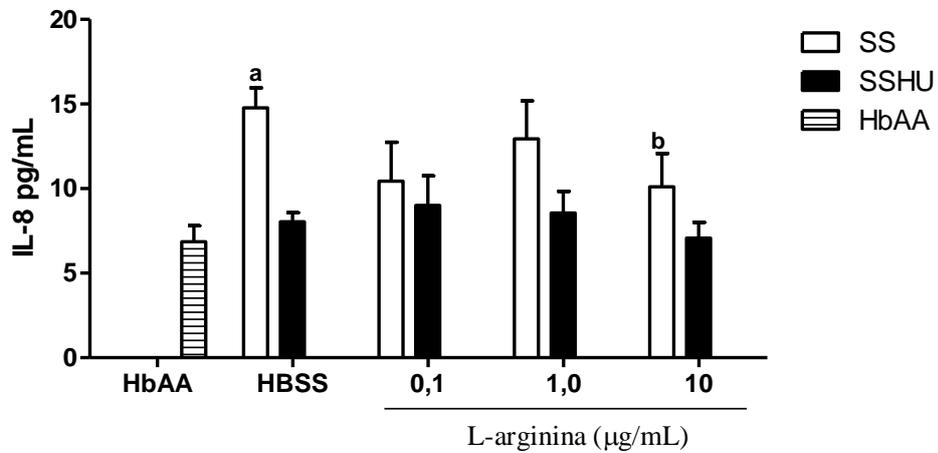
Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas; L-arginina: grupo tratado com L-arginina 10 ug/mL; BAY 73-6691: grupo tratado com BAY 73-6691 10 ug/mL; L-arg + BAY: grupo tratado com associação L-arginina e BAY 73-6691; Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

4.6 Determinação dos níveis de IL-8

A Figura 18 apresenta o efeito da L-arginina sobre os níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. Foi observado que os neutrófilos SS apresentaram níveis basais de IL-8 significativamente elevados em relação aos neutrófilos SSHU e neutrófilos do grupo controle (HbAA). Não houve diferença significativa entre os níveis basais de IL-8 em neutrófilos SSHU e neutrófilos do grupo controle ($p > 0,05$).

O tratamento com L-arginina reduziu os níveis de IL-8 em neutrófilos SS na concentração de 10 µg/L em relação aos neutrófilos SS não tratados (HBSS). Não foi observada redução significativa dos níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes tratados com HU.

Figura 16: Efeito da L-arginina sobre os níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).



^a $p < 0,05$ entre HBSS-SS e HbAA

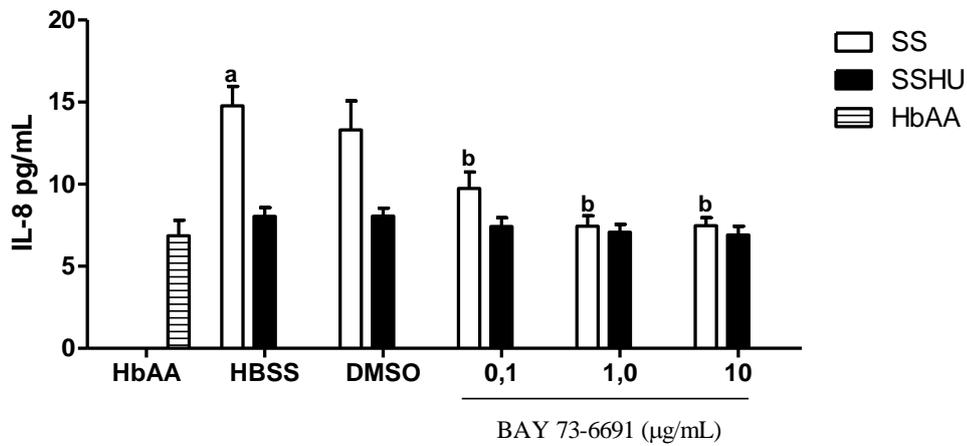
^b $p < 0,05$ entre L-arginina (µg/mL) e HBSS-SS

Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas; Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

A Figura 17 apresenta os resultados do efeito do tratamento com o BAY 73-6691 sobre os níveis da citocina IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. O tratamento com BAY 73-6691 reduziu os níveis de IL-8 em neutrófilos SS nas concentrações 0,1, 1 e 10 µg/mL em relação grupo HBSS. Não foi observada redução significativa dos níveis de IL-8 em neutrófilos SSHU.

O veículo (DMSO 1% v/v) não causou alteração os níveis basais de IL-8 em neutrófilos SS ($p = 0,9896$) e em neutrófilos SSHU ($p = 0,4923$).

Figura 17: Efeito do BAY 73-6691 sobre os níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).



^a $p < 0,05$ entre HBSS-SS e HbAA

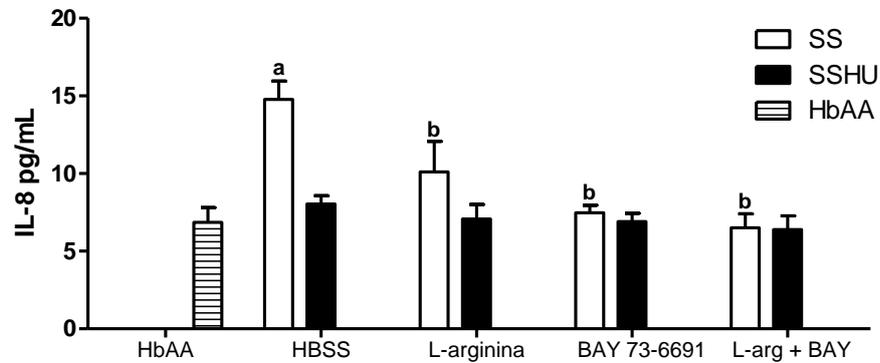
^b $p < 0,05$ entre BAY 73-6691 (µg/mL) e HBSS-SS

Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas; Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

A Figura 18 mostra o efeito do tratamento com a associação das drogas L-arginina e BAY 73-6691, ambas nas concentrações de 10µg/mL, sobre os níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU.

O tratamento com a associação promoveu redução dos níveis de IL-8 em neutrófilos SS quando comparado ao grupo HBSS ($p < 0,0001$). Não se observou diferença significativa dos níveis de IL-8 entre o tratamento com a associação e o tratamento de L-arginina 10µg/mL e BAY 73-6691 10µg/mL de forma isolada ($p > 0,05$). Não foi observada redução significativa dos níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes tratados com HU.

Figura 18: Efeito da associação L-arginina 10µg/mL e BAY 73-6691 10µg/mL sobre níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).



^a $p < 0,05$ entre HBSS-SS e HbAA

^b $p < 0,05$ entre grupos tratados e HBSS-SS

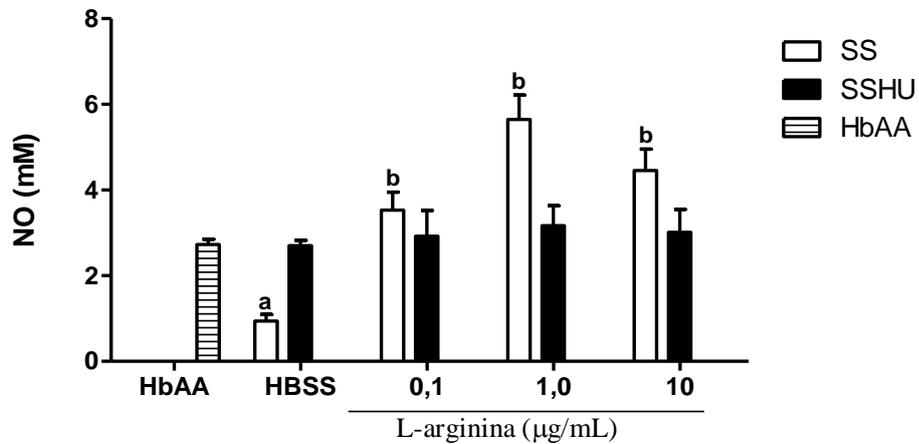
Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas; L-arginina: grupo tratado com L-arginina 10 µg/mL; BAY 73-6691: grupo tratado com BAY 73-6691 10 µg/mL; L-arg + BAY: grupo tratado com associação L-arginina e BAY 73-669; Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

4.7 Determinação dos níveis de NO

A Figura 19 apresenta o efeito da L-arginina sobre os níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. Observou-se que os neutrófilos SS apresentaram níveis basais de NO significativamente reduzidos em relação aos neutrófilos SSHU e neutrófilos do grupo controle (HbAA). Não houve diferença significativa entre os níveis basais de TNF- α em neutrófilos SSHU e neutrófilos do grupo controle ($p > 0,05$).

O tratamento com L-arginina promoveu elevação dos níveis de NO em neutrófilos SS nas concentrações 0,1, 1 e 10 µg/mL em relação grupo HBSS ($p < 0,05$). Não foi observado aumento significativo dos níveis de NO em neutrófilos de pacientes tratados com HU.

Figura 19: Efeito da L-arginina sobre os níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).



^a p<0,05 entre HBSS-SS e HbAA

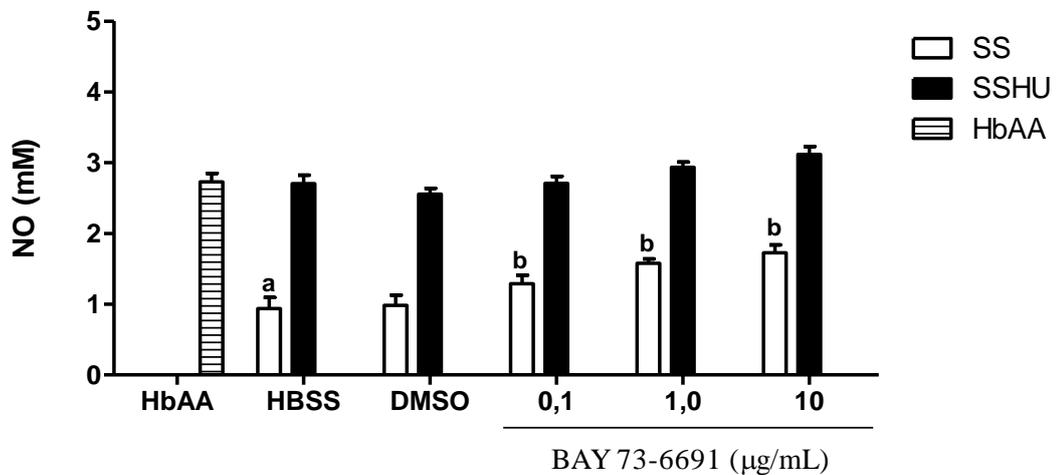
^b p<0,05 entre L-arginina (µg/mL) e HBSS-SS

Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas; Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey

A Figura 20 apresenta o efeito do BAY 73-6691 sobre os níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. O tratamento com BAY 73-6691 promoveu aumento dos níveis de NO em neutrófilos SS nas concentrações 0,1, 1 e 10 µg/mL em relação ao grupo HBSS (p<0,05). Não foi observado aumento significativo dos níveis de NO em neutrófilos de pacientes tratados com HU.

O veículo (DMSO 1% v/v) não alterou os níveis basais de NO em neutrófilos SS (p= 0,83) e em neutrófilos SSHU (p= 0,33).

Figura 20: Efeito do BAY 73-6691 sobre os níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).



^a $p < 0,05$ entre HBSS-SS e HbAA

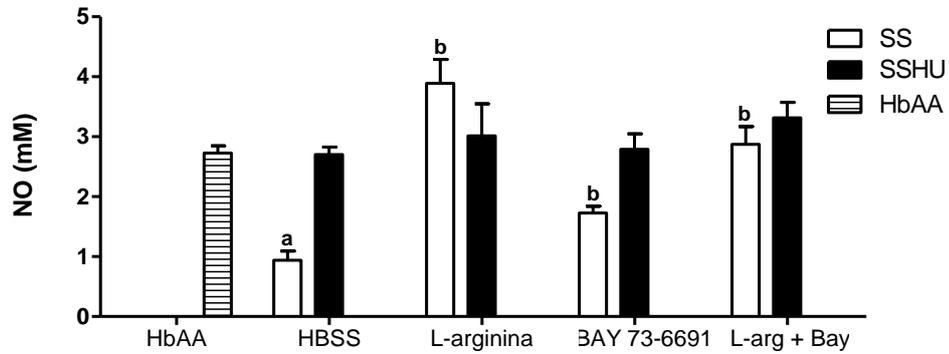
^b $p < 0,05$ entre BAY 73-6691 ($\mu\text{g/mL}$), HBSS-SS e DMSO

Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas; DMSO: veículo; Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

A Figura 21 apresenta o efeito do tratamento com a associação das drogas L-arginina e BAY 73-6691, ambas nas concentrações de $10\mu\text{g/mL}$, sobre os níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados e não tratados com HU. O tratamento com a associação aumentou significativamente os níveis de NO em neutrófilos SS quando comparado ao grupo HBSS.

Não foi observada diferença significativa dos níveis de NO entre o tratamento com a associação e o tratamento de L-arginina $10\mu\text{g/mL}$ e BAY 73-6691 $10\mu\text{g/mL}$ ($p > 0,05$).

Figura 21: Efeito da associação L-arginina 10 μ g/mL e BAY 73-6691 10 μ g/mL sobre níveis de NO em neutrófilos de pacientes com AF tratados (n=30) e não tratados com HU (n=20).



^a $p < 0,05$ entre HBSS-SS e HbAA

^b $p < 0,05$ entre grupos tratados e HBSS-SS

Nota: HbAA: Controle indivíduos saudáveis; HBSS: células não tratadas; L-arginina: grupo tratado com L-arginina 10 μ g/mL; BAY 73-6691: grupo tratado com BAY 73-6691 10 μ g/mL; L-arg + BAY: grupo tratado com associação L-arginina e BAY 73-6691; Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M); Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que os pacientes com AF em uso ou não de HU apresentaram valores significativamente inferiores nos parâmetros hemácias, hemoglobina e hematócrito em comparação com o grupo controle composto por indivíduos sem hemoglobinopatias. Esse achado pode ser atribuído a fisiopatologia da doença que se caracteriza por uma anemia hemolítica crônica de grau variado. Esses dados corroboram com outros estudos publicados (AKINBAMI *et al.*, 2012; LAURENTINO *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 2015). O aumento significativo da contagem de plaquetas nos pacientes com AF se deve a vários fatores entre eles a redução do baço, aumento da ativação plaquetária e do consumo mesmo no estado estacionário da doença (TOMER *et al.*, 2001, VILLAGRA *et al.*, 2007, PROENÇA-FERREIRA *et. al.*, 2010).

Em relação à contagem de leucócitos, foi constatado que os pacientes sem uso de HU apresentaram valor de leucócitos significativamente superior ao grupo de pacientes em uso de HU e ao grupo controle, corroborando com a literatura (OKPALA, 2004; CONRAN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2016) onde o processo inflamatório crônico em pacientes com AF é caracterizado por aumento do número de leucócitos. Além disso, observamos também uma redução significativa na contagem de leucócitos totais nos pacientes em uso de HU em relação aos que não faziam uso desse medicamento. Fato esse que corrobora com os dados da literatura que demonstram que a HU reduz o número de leucócitos circulantes fato relacionado à sua ação citorrredutora (WARE; AYGUN, 2009; WONG, *et al.*, 2014; KEIKHAEI; YOUSEFI; BAHADORAM, 2015).

A hidroxiuréia (HU) reduz fenômenos de hemólise, aumenta a biodisponibilidade do NO, diminui a expressão das moléculas de adesão, e o estresse oxidativo, consequentemente reduzindo as complicações clínicas (COVAS *et al.*, 2004; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; OWUSU-ANSAH *et al.*, 2016). Apesar dos benefícios da terapia com HU, este medicamento, mesmo utilizado em subdoses, pode causar efeitos adversos. Outros fatores tais como a falta de adesão e variabilidade na resposta ao medicamento, contribuem para a necessidade de pesquisas sobre novos medicamentos que possam minimizar os efeitos da HU sem comprometer o aumento da concentração da HbF, na AF.

Nos ensaios de citotoxicidade do estudo, foi evidenciado que a L-arginina e o BAY 73-6691 reduziram a viabilidade de neutrófilos de pacientes com AF apenas na

concentração de 100 µg/mL. Nessa concentração houve dano na membrana lipídica das células tratadas, avaliado pela liberação de LDH, e redução da viabilidade dos neutrófilos pela alteração do metabolismo oxidativo celular, particularmente relacionado com a atividade da enzima mitocondrial desidrogenase succinato. As demais concentrações testadas e a associação L-arginina e BAY não causaram toxicidade em neutrófilos de pacientes tratados e não tratados com HU. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo recente realizado em neutrófilos de 35 pacientes com AF tratados com BAY 73-6691 no qual foi visto, através dos ensaios LDH e MTT, citotoxicidade somente na concentração de 100µg/mL (BARBOSA *et al.*, 2015). Ainda não foram descritos na literatura resultados sobre citotoxicidade da L-arginina em neutrófilos de pacientes com AF.

O uso de HU não influenciou a liberação de LDH e a viabilidade celular dos neutrófilos de pacientes com AF e assim, é possível sugerir que os resultados para ambos os grupos de pacientes com AF estão relacionados apenas à L-arginina e ao BAY 73-6691. Os dados deste estudo demonstram que a terapia combinada dessas drogas não causou efeitos tóxicos na concentração de 10 µg/mL, podendo ser testada em estudos pré-clínicos como uma possível estratégia terapêutica para pacientes com AF.

Quanto às citocinas inflamatórias, TNF- α é uma citocina que está envolvida na ativação de leucócitos e células endoteliais, estimulação de macrófagos, recrutamento e quimiotaxia de células inflamatórias (BANDEIRA *et al.*, 2014; CAVALCANTE *et al.*, 2016). Foi evidenciado que os neutrófilos de pacientes não tratados com HU apresentaram níveis basais de TNF- α superiores aos de pacientes tratados com HU e grupo controle. Este achado corrobora com os estudos de Pedrosa *et al.* (2012) e Barbosa *et al.* (2015) que demonstraram concentrações elevadas de TNF- α em sobrenadante de neutrófilos de pacientes com AF sem uso de HU e que a HU promove a diminuição de mediadores inflamatórios como o TNF- α .

O tratamento com L-arginina e BAY 73-6691 isoladamente foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- α em neutrófilos de pacientes não tratados com HU em todas as concentrações. Não foi constatado esse efeito nos neutrófilos de pacientes tratados com HU, assim pode-se inferir que a L-arginina e o BAY 73-6691 parecem agir de forma semelhante à HU visto que não houve aumento dos efeitos nos neutrófilos SSHU. Esses resultados corroboram o estudo realizado por Barbosa *et al.* (2015) no qual foi encontrado que o tratamento com BAY 73-6691 causou redução dos níveis desse marcador em neutrófilos de pacientes sem uso de HU. Ainda não foram publicados dados sobre o efeito L-arginina sobre os níveis de TNF- α em neutrófilos de pacientes com AF.

A associação L-arginina e BAY 73-6691 reduziu de forma significativa os níveis de TNF- α em neutrófilos SS em relação ao grupo de células não tratadas. Entretanto, a terapia combinada não melhorou a resposta anti-inflamatória quando comparada às drogas isoladas, provavelmente por atuarem pela mesma via de ação.

Em relação à citocina IL-8, foi observado um aumento significativo dos níveis dessa citocina no grupo de pacientes SS em relação ao grupo de pacientes SSHU e ao grupo de indivíduo saudáveis, concordando com estudos que relatam que pacientes com AF, mesmo em estado estacionário, apresentam elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e que o tratamento com HU é capaz de reverter essa condição (PATHARE *et al.*, 2003; LANARO *et al.*, 2006; KEIKHAEI *et al.*, 2013; BANDEIRA *et al.*, 2014).

O tratamento com L-arginina foi capaz de reduzir os níveis desse marcador em neutrófilos de pacientes não tratados com HU na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Quanto ao tratamento com o BAY 73-6691, foi observado diminuição dos níveis de IL-8 em neutrófilos de pacientes sem uso de HU em todas as concentrações. O estudo de Miguel *et al.* (2011) evidenciou a importância da citocinas TNF- α e IL-8 na AF ao demonstrar que elas podem também aumentar a adesão de neutrófilos e que o tratamento com o BAY 73-6691 reduziu a adesão de neutrófilos de pacientes sem uso de HU à fibronectina após estimulação com IL-8, TNF- α e fator estimulador de crescimento de colônia granulocítica (GM-CSF).

Quanto à associação de L-arginina e BAY 73-6691, houve redução das concentrações de IL-8 nos neutrófilos SS em comparação ao grupo de células não tratadas, entretanto não foi observado aumento dos efeitos em relação às drogas individuais sugerindo que essas drogas parecem atuar pelo mesmo mecanismo para diminuir os níveis de IL-8.

Em relação ao NO, os dados deste estudo mostraram que os neutrófilos SS apresentaram níveis basais de NO significativamente reduzidos em relação aos neutrófilos do grupo controle e os neutrófilos SSHU. Essa diferença pode ser atribuída ao uso de HU. Estes resultados estão concordantes com estudos da literatura que relatam a redução da biodisponibilidade do NO nos pacientes com AF e que a terapia com HU é capaz de minimizar esse efeito (NAHAVANDI *et al.*, 2002; MCGANN; WARE, 2015). Estudos sugerem que a indução de HbF e os efeitos anti-inflamatório da HU estão relacionados com a elevação de NO e com a ativação da via de sinalização GMPc-dependente (COKIC *et al.*, 2003; KING, 2004). Assim, a elevação da biodisponibilidade de NO vem sendo estudada como estratégia terapêutica para a AF.

O tratamento com L-arginina foi capaz de elevar significativamente os níveis de NO em neutrófilos de pacientes não tratados com HU em todas as concentrações testadas.

Este resultado corrobora com um estudo realizado com camundongos transgênicos com AF que relata a depleção crônica dos níveis de arginina e que o tratamento com L-arginina promove elevação dos níveis de NO (DASPUGTA; HEBBEL; KAUL, 2006). Outros estudos evidenciaram que a suplementação oral de L-arginina leva ao aumento da concentração plasmática de NO em pacientes com AF (SULIVAN *et al.*, 2010; MORRIS *et al.*, 2013). Neste estudo, o tratamento com L-arginina não elevou os níveis de NO em neutrófilos de pacientes tratados com HU, indicando que a L-arginina não foi capaz de potencializar o efeito da HU. Este resultado é discordante do achado de Elias *et al.* (2013) que demonstrou em um estudo clínico realizado com pacientes com AF que a suplementação oral com L-arginina melhorou a resposta do tratamento com HU, obtendo aumento de NO e HbF. Essa diferença por ter atribuída à complexidade de mecanismos que podem estar envolvidos nos estudos *in vivo*.

O tratamento com BAY 73-6691 causou elevação significativa dos níveis de NO em neutrófilos SS em todas as concentrações e não foi evidenciado acréscimo dos efeitos em neutrófilos SSHU, mostrando que essa droga também parece ter ação similar à HU. Esses dados estão condizentes com o estudo de Barbosa *et al.* (2015) que constatou que o tratamento com BAY 73-6691 aumentou a concentração de NO em neutrófilos de pacientes que não faziam uso de HU.

O tratamento com a terapia combinada L-arginina e BAY 73-6691 foi capaz de elevar os níveis de NO quando comparado com o grupo de células não tratadas. No entanto, não se observou um aumento dos efeitos em comparação com a L-arginina e o BAY 73-6691 isolados. Assim, não foi possível observar sinergismo entre as duas drogas, uma vez que esses efeitos não foram somados, sugerindo que essas drogas podem agir pela mesma via de ação. Esses resultados mostraram que a L-arginina e o BAY 73-6691 isolados apresentaram efeito semelhante à associação, indicando que a monoterapia parece ser promissora e mais indicada para o tratamento da AF.

6. CONCLUSÃO

- A L-arginina e o BAY 73-6691 reduziram a viabilidade de neutrófilos de pacientes com AF apenas na maior concentração testada;
- A associação L-arginina e BAY 73-6691 na concentração de 10 ug/mL não reduziu a viabilidade de neutrófilos de pacientes com AF;
- A L-arginina e o BAY 73-6691 foram capazes de reduzir níveis de TNF- α e IL-8 em neutrófilos de pacientes sem uso de HU.
- A L-arginina e o BAY 73-6691 foram capazes de aumentar níveis de NO em neutrófilos de pacientes sem uso de HU.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo são promissores e demonstram que tanto a L-arginina como o BAY 73-6691 foram capazes de reduzir níveis de TNF- α e IL-8 e aumentar níveis de NO, em neutrófilos de pacientes sem uso de HU. Assim, essas drogas podem constituir possíveis alternativas terapêuticas para atenuar o processo inflamatório e aumentar a biodisponibilidade de NO em pacientes com AF que não fazem uso de HU.

8. REFERÊNCIAS

ADEKILE, A. D.. What's New in the Pathophysiology of Sickle Cell Disease? **Med Princ Pract**, v. 22, n. 4, p.311-312, 2013.

AGRAWAL, R. K. *et al.* Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v. 30, n. 2, p.91-96, 2013.

AKINBAMI, A. *et al.* Haematological values in homozygous sickle cell disease in steady state and haemoglobin phenotypes AA controls in Lagos, Nigeria. **BMC Research Notes** v. 5, n. 1, p. 396 , 2012.

AKINSHEYE, I.; ALSULTAN A.; SOLOVIEFF N.; NGO D.; BALDWIN C.T.; SEBASTIANI P.; CHUI D.H.K.; STEINBERG M.H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, p. 19 27, 2011.

AKINSHEYE, I.; KLINGS, E.S. Sickle cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. *Journal of Cellular Physiology*, v. 224, p. 620-625, 2010.

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.; 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.

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.

ANTWI-BOASIAKO, C.; FRIMPONG, E.; ABABIO, G.K.; DZUDZOR, B.; EKEM, I.; GYAN, B.; SODZI-TETTEY, N.A.; ANTWI, D.A. Sickle Cell Disease: Reappraisal of the Role of Foetal Haemoglobin Levels in the Frequency of Vaso-Occlusive Crisis. **Ghana Med J**. V. 49, n. 2, p. 102-106, 2015.

ARCHER, D.R.; STILES, J.K; NEWMAN, G.W.; QUARSHIE, A.; HSU, L.L.; SAYAVONGSA, P.; PERRY, J.; JACKSON, E.M.; HIBBERT, J.M. C-reactive protein and interleukin-6 are decreased in transgenic sickle cell mice fed a high protein diet. **J. Nutr.**, n. 138, p. 1148–1152, 2008.

ARCHER, N.; GALACTEROS, F; BRUGNARA, Carlo. 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.**, v. 90, n. 10, p.934-950, 2015.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R.S. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a huge review. **Am J Epidemiol** v. 151, n. 9, p. 839–845 , 2000.

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.

BANDEIRA, I. C.; ROCHA, L.B.; BARBOSA, M.C.; ELIAS, D.B.; QUERIOZ, J.A.; FREITAS, M.V.; GONÇALVES, R.P. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB*S haplotype. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p.217-221, 2014.

BARABINO, G; PLATT, M. O; KAUL, D. K. Sickle cell biomechanics. **Annual review of biomedical engineering** v. 12, p. 345–367 , 2010.

BARBOSA, C.G, ALELUIA, A.C.M., PACHECO, A.P.A.S, *et al.* Genetic modulation of HbF in Brazilians with HbSC disease and sickle cell anemia. **Am J Hematol**; v. 88, p. 923–924, 2013.

BARBOSA, M. C.; SANTOS, T. E. J.; SANTOS; T. N.; PEDROSA, A. M.; ELIAS, D. B. D., LEAL, L. K. A. M.; LOPES; A. A.; SASAHARA; G. L.; GONÇALVES; R. P. The Effect of a Selective Inhibitor of Phosphodiesterase-9 on Oxidative Stress, Inflammation and Cytotoxicity in Neutrophils from Patients with Sickle Cell Anaemia. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v. 118, n. 4, p.271-278, 2015.

BILATE, A. M. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 3, 2007.

BITOUNGUI, Valentina J Ngo *et al.* Beta-Globin Gene Haplotypes Among Cameroonians and Review of the Global Distribution : Is There a Case for a Single Sickle Mutation Origin in Africa ? **Journal of Integrative Biology** v. 19, n. 3, p. 171–179 , 2015.

BOBIN, P. *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. **Archives of Cardiovascular Diseases**, p. 30073-30080, 2016.

BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C.P. Phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v.147, p.252–257, 2006.

BRAGA, J.A.P, Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes **Rev. bras. hematol. hemoter**. V. 29, n. 3, p. 33-238, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**, Brasília, DF: ANVISA, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Saúde da População Negra: Uma Questão de Equidade. Brasília. 14p, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de educação em saúde: Linha de cuidado em doença falciforme**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, v. 2, 2009.

BURNETT, A. L. *et al.* Randomized Controlled Trial of Sildenafil for Preventing Recurrent Ischemic Priapism in Sickle Cell Disease. **The American Journal of Medicine**, v. 127, n. 7, p.664-668, 2014.

- CAJADO, C. *et al.* TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**. v. 56, n. 2, p.312-317, 2011.
- 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.
- CANÇADO, R. D. *et al.* Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 31, n. 5, p. 361-366, 2009.
- CAVALCANTE, J. E. A. *et al.* Clinical events and their relation to the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genotypes in Sickle-Cell-Anemia patients. **Hematology/oncology And Stem Cell Therapy**. v. 9, n. 1, p.14-19, 2016.
- CHIRICO, E.; PIALOUX, V. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease. **Life**, v. 64. n. 1, p. 72-80, 2012.
- CHIRICO, E.N.; FAËS, C.; CONNES, P.; CANET-SOULAS, E.; MARTIN, C.; PIALOUX, V. Role of Exercise-Induced Oxidative Stress in Sickle Cell Trait and Disease. **Sports Med.**, v. 46, n. 5, p. 629-639, 2016.
- CHOU, Stella T.; FASANO, Ross M.. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy. **Hematology/oncology Clinics Of North America**, v. 30, n. 3, p.591-608, 2016.
- COKIC, V. P. *et al.* Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood**, v. 111, n. 3, p.1117-1123, 2008.
- COKIC, V.P.; SMITH R.D.; BELESLIN-COKIC. B.B; NJOROGÉ. J.M.; MILLER J.L.; GLADWIN. M.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest** . v. 111, p. 231-239, 2003.
- CONRAN, N. *et al.* Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. **Am. J. Hematol.**, v. 76, n. 4, p.343-347, 2004.
- CONRAN, N. *et al.* Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. **Annals Of Hematology**, v. 86, n. 4, p.255-261, 2007.
- CONRAN, N.. Prospects for early investigational therapies for sickle cell disease. **Expert Opinion On Investigational Drugs**, v. 24, n. 5, p.595-602, 2015.
- CONRAN, N.; COSTA, F.F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. **Clinical biochemistry**. v. 42, p. 1824-38, 2009.
- CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v.33, p.1-16, 2009.

COVAS, D. T. *et al.* Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **haematologica**, v. 89, n. 3, p. 273-280, 2004.

COX, S.E.; MAKANI, J.; KOMBA, A.N. *et al.* Global arginine bioavailability in Tanzanian sickle cell anaemia patients at steady-state: a nested case control study of deaths versus survivors. **Br J Haematol**; v. 155, n. 4, p. 522–524, 2011.

CYTLAK, U. M. *et al.* Identification of the Ca²⁺ entry pathway involved in deoxygenation-induced phosphatidylserine exposure in red blood cells from patients with sickle cell disease. **Pflügers Archiv - European Journal Of Physiology**, v. 465, n. 11, p.1651-1660, 18 2013.

DASGUPTA, T; HEBBEL, R; KAUL, D. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 41, n. 12, p.1771-1780, 2006.

DAVILA, J. *et al.* A novel inflammatory role for platelets in sickle cell disease. **Platelets**, v. 26, n. 8, p.726-729, 30 dez. 2014.

DEBAUN, M. R. Hydroxyurea therapy contributes to infertility in adult men with sickle cell disease: a review. **Expert Review Of Hematology**, v. 7, n. 6, p.767-773, 2014.

DOMINGOS, I. F. *et al.* Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Annals Of Hematology**, v. 93, n. 7, p.1123-1129, 2014.

DOMINICAL, V. M. *et al.* Interactions of sickle red blood cells with neutrophils are stabilized on endothelial cell layers. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, v. 56, n. 1, p.38-40, 2016.

DOMINICAL, V. M. *et al.* Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 99, n. 11, p.214-217, 2014.

ELIAS, D. B. D *et al.* L-arginine as an adjuvant drug in the treatment of sickle cell anaemia. **British Journal Of Haematology**, v. 160, n. 3, p.410-412, 2013.

ENGLISH, D., ANDERSEN, B.R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll–Hypaque. **J Immunol Methods**. v. 5, p. 249–52, 1974.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 3, p.203-208, 2010.

FERRONE, F. Polymerization and Sickle Cell Disease: A Molecular View. **Microcirculation** v. 11, n. 2, p. 115–128 , 2004.

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.

FOTAKIS, G; TIMBRELL, J. A.. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p.171-177, 2006.

FRANCESCHI, L. Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. **Blood**, v. 102, n. 3, p.1087-1096, 2003.

FRANCESCHI, L. CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**, v. 89, n. 3, p. 348-356, 2004.

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.

GATIN, L. *et al.* Osteonecrosis of the Femoral Head: A Proposed New Treatment in Homozygous Sickle Cell Disease. **Hemoglobin**, v. 40, n. 1, p.1-9, 2016.

GHATGE, M. S. *et al.* Crystal structure of carbonmonoxy sickle hemoglobin in R-state conformation. **Journal Of Structural Biology**, v. 194, n. 3, p.446-450, 2016.

GLADWIN, M.T. *et al.* Nitric oxide for inhalation in the acute treatment of sickle cell pain crisis: a randomized controlled trial. **JAMA**. v. 305, n. 9, p. 893–902, 2011.

HABARA, A.; STEINBERG, M. H.. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology And Medicine**, v. 241, n. 7, p.689-696, 1 mar. 2016.

HEBBEL, R. P; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D.. The Endothelial Biology of Sickle Cell Disease: Inflammation and a Chronic Vasculopathy. **Microcirculation**, p. 129–151, 2009.

HEBBEL, R.P. Ischemia-reperfusion injury in sickle cell anemia. **Hematology/Oncology Clinics of NA** v. 28, n. 2, p. 181–198 , 2014.

HENDRIX, M. Selective inhibitors of cGMP phosphodiesterases as procognitive agents. **BMC Pharmacology**, n. 5, s.5, 2005.

HIDALGO, A. *et al.* Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p.384-391, 2009.

HOPPE, C. C.. Inflammatory Mediators of Endothelial Injury in Sickle Cell Disease. **Hematology/oncology Clinics Of North America**, v. 28, n. 2, p.265-286, 2014.

HUTTLE, A. *et al.* Sickle cell in sickle cell disease in Latin America and the United States. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 7, p.1131-1136, 2015.

IQBAL, Z. *et al.* Investigation of sickle-cell haemoglobin polymerisation under electrochemical control. **ChemPhysChem** v. 14, n. 10, p. 2143–2148 , 2013.

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.

JESUS, J.A. Doença falciforme no Brasil. **Gaz. méd. Bahia**; n 80, v 3, p 8-9, 2010.

- KAHN, M.J.; MALEY, J.H.; LASKER, G.F.; KADOWITZ, P.J. Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**. v. 13, n. 1, p. 83-87, 2013.
- KATO, G. J.. Defective nitric oxide metabolism in sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**; v. 62, n. 3, p.373-374, 2015.
- KATO, G. J.. Novel Small Molecule Therapeutics for Sickle Cell Disease: Nitric Oxide, Carbon Monoxide, Nitrite, and Apolipoprotein A-I. **Hematology**, v. 2008, n. 1, p.186-192, 2008.
- 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.
- KATO, G. J; 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.
- KATO, G. J.; HEBBEL, R. P.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, Pathophysiology, Genetics, Translational Medicine and New Research Directions. **Am. J. Hematol.**, v. 84, n. 9, p.618–625, 2009.
- KAUL, D.K.X.; ZHANG, T.; DASGUPTA, M.E. F. Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress, **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v. 295, p39–47, 2008.
- KEHINDE, M.O. *et al.* L-Arginine supplementation enhances antioxidant activity and erythrocyte integrity in sickle cell anaemia subjects. **Pathophysiology**, v. 22, n. 3, p.137-142, 2015.
- KEIKHAEI, B. *et al.* 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.
- KEIKHAEI, B.; YOUSEFI, H.; BAHADORAM, M.. Hydroxyurea: Clinical and Hematological Effects in Patients With Sickle Cell Anemia. **Gjhs**, v. 8, n. 3, p.252-254, 2015.
- KING, B. Nitric oxide production from hydroxyurea. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n.6, p.737-744, 2004.
- KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews**, v. 13, p. 159-175, 2013.
- KUVIBIDILA, S.; WARRIER, R.P., HAYNES J.; BALIGA, S.B. Hydroxyurea and Zileuton Differentially Modulate Cell Proliferation and Interleukin-2 Secretion by Murine Spleen Cells: Possible Implication on the Immune Function and Risk of Pain Crisis in Patients with Sickle Cell Disease. **Ochsner J.**, v. 15, n. 3, p. 241-7, 2015.
- KUYPERS, F. A. Hemoglobin S Polymerization and Red Cell Membrane Changes. **Hematology/oncology Clinics Of North America**, v. 28, n. 2, p.155-179, 2014.

- LANARO, C.; *et al.* 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.
- LAURENTINO, M.R.; CARVALHO, T.M.J.P.; SANTOS, T.E.J.; BARBOSA, M.A.; SANTOS, T.N.; GONÇALVES, R.P. Methemoglobin measure in adult patients with sickle-cell anemia: influence of hydroxyurea therapy. **J Bras Patol Med Lab**, v. 50, n. 3, p. 184-188, 2014.
- LAWRENCE, C.; WEBB, J.. Sickle Cell Disease and Stroke: Diagnosis and Management. **Current Neurology And Neuroscience Reports**, v. 16, n. 3, p.27-28, 12 2016.
- LEDERMAN, H.M., CONNOLLY, M.A., KALPATTHI, R., *et al.* Immunologic effects of hydroxyurea in sickle cell anemia. **Pediatrics**. V. 134, n. 4, p. 686-695, 2014.
- LI, L. CHEN, W., CHEN, T.; REN, J.; XU, Y. Structure-Based Discovery of PDEs Inhibitors. **Curr Top Med Chem**. v.16, n. 9, p. 917-33, 2016.
- 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.
- MACHADO, R.F; BARST, R.J; YOVETICH, N.A, *et al.* Hospitalization for pain in patients with sickle cell disease treated with sildenafil for elevated TRV and low exercise capacity. **Blood**; v. 118, p. 855–864, 2011.
- MADIGAN, C.; MALIK, P.. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. **Expert reviews in molecular medicine** v. 8, n. 9, p. 1–23 , 2006.
- MAIOLI, M. C. P. *et al.* Relationship between pulmonary and cardiac abnormalities in sickle cell disease: implications for the management of patients. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 1, p.21-27, 2016.
- MAITRE, B. *et al.* Inhaled nitric oxide for acute chest syndrome in adult sickle cell patients: a randomized controlled study.**Intensive Care Med**, v. 41, n. 12, p.2121-2129, 2015.
- MAKIS, A.C. HATIZIMICHAEL, E.C.BOURANTAS, K.L. The role of cytokine in sickle cell disease. **Ann hematol**. v. 79, p. 407-413. 2000.
- MAMEZ, A.C.; RAFFOUX, E.; CHEVRET, S.; LEMIALE, V.; BOISSEL, N.; CANET, E.; SCHLEMMER, B.; DOMBRET, H.; AZOULAY, E.; LENGLINÉ, E. Pre-treatment with oral hydroxyurea prior to intensive chemotherapy improves early survival of patients with high hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma**. v. 5, 2016.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P. S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies.**Hematology**, v. 2013, n. 1, p.362-369, 2013.

MATSUMOTO, T.; KOBAYASHI, T.; KAMATA, K. Phosphodiesterase in the vascular system *J Smooth Muscle Res.*v.39, n.4, p.67-86, 2003.

MCGANN, P. T.. Time to Invest in Sickle Cell Anemia as a Global Health Priority. **Pediatrics**, v. 137, n. 6, p.20160348-20160348, 2016.

McGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea for sickle cell anemia: What have we learned and what questions still remain? **Curr Opin Hematol.**; v. 18, n. 3, p. 158–165, 2011.

MCGANN, P. T; WARE, R. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion On Drug Safety**, v. 14, n. 11, p.1749-1758, 2015.

MIGUEL, L. I. *et al.* Inhibition of phosphodiesterase 9A reduces cytokine-stimulated in vitro adhesion of neutrophils from sickle cell anemia individuals. **Inflamm. Res.**, v. 60, n. 7, p.633-642, 2011.

MIOSSEC P, KORN T, KUCHROO VK. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. **N Engl J Med**; v. 361, p. 888-98, 2009.

MOREIRA, J.A.; LAURENTINO, M.R.; MACHADO, R.P.G.;BARBOSA, M.C.; MOTA, A.M.; ROCHA,L.B.S; MARTINS, A.M.C.; ARRUDA, A.B.L.; SOUZA, I.P.; GONÇALVES, R.P. Pattern of hemolysis parameters and association with fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients in steady state. **Rev bras hematol hemoter.**, n. 37, v. 3, p.167–171, 2015.

MORIN, M. G. *et al.* Trasplante de médula ósea en pacientes con anemia falciforme. Experiencia en un centro. **Anales de Pediatría**, 2016.

MORRIS, C. R.. Mechanisms of Vasculopathy in Sickle Cell Disease and Thalassemia. **Hematology**, n. 1, p.177-185, 2008.

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.

MORRIS, C.; BAKSHI, N.; The role of the arginine metabolome in pain: implications for sickle cell disease. **Jpr**, p.167-175, 2016.

MORRIS, C.R. New Strategies for the Treatment of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease : The Rationale for Arginine Therapy. **Treat Respir Med**, v. 5, n. 1, p. 31-45, 2006.

MORRIS, C.R.; VICHINSKY, E.; SINGER, S.T. Pulmonary hypertension in thalassemia: association with hemolysis, arginine metabolism dysregulation and a hypercoagulable state. **Advances in Pulmonary Hypertension**. v. 5, p. 31-38, 2007.

MORRIS, Claudia R.. Alterations of the Arginine Metabolome in Sickle Cell Disease. **Hematology/oncology Clinics Of North America**, v. 28, n. 2, p.301-321, 2014.

MORRISSEY, B.J., BYCROFT, T.P.; ALMOSSAWI, O.; WILKEY, O.B.; DANIELS, J.G. Incidence and Predictors of Bacterial infection in Febrile Children with Sickle Cell Disease. **Hemoglobin**. v. 39, n. 5, p. 316-319, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOZAR, A.; CONNES, P.; COLLINS, B.; HARDY-DESSOURCES, M.D.; ROMANA, M.; LEMONNE, N.; BLOCH, W. Red blood cell nitric oxide synthase modulates red blood cell deformability in sickle cell anemia. **Clin Hemorheol Microcirc.**,2016.

NAHAVANDI, M.; TAVAKKOLI, F.; WYCHE, M. Q.; PERLIN, E.; WINTER, W. P.; CASTRO, O. Nitric Oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Br J Haematol**, v.119, p.855– 857, 2002.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 22, n. 1, p. 05-22, 2000.

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

NGUYEN, v. T. *et al.* Delayed Healing of Sickle Cell Ulcers Is due to Impaired Angiogenesis and CXCL12 Secretion in Skin Wounds. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 2, p.497-506, 2016.

NOUBOUOSSIE, D.; KEY, N. S.; ATAGA, K. I. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. **Blood Reviews**, 2015.

NOVELLI, E. M.; GLADWIN, M. T.. Crises in Sickle Cell Disease. **Chest**, v. 149, n. 4, p.1082-1093, 2016.

NUR, E. *et al.* Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **American journal of hematology**, v. 86, n. 6, p. 484-489, 2011.

OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease—a red cell disorder. **Blood reviews**, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2004.

OMODEO-SALE, F., CORTELEZZI, L., VOMMARO, Z. *et al.* Dysregulation of L-arginine metabolism and bioavailability associated to free plasma heme. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 299, n. 1, p. 148–54, 2010.

OWUSU-ANSAH, Amma *et al.* Inflammatory targets of therapy in sickle cell disease. **Translational Research**, v. 167, n. 1, p.281-297, 2016.

PACE, B. S. *et al.* Cell signaling pathways involved in drug-mediated fetal hemoglobin induction: Strategies to treat sickle cell disease. **Experimental Biology And Medicine**, v. 240, n. 8, p.1050-1064, 2015.

PACK-MABIEN, A. V.; IMRAN, H. Benefits of Delayed Fetal Hemoglobin (HbF) Switching in Sickle Cell Disease (SCD). **Journal Of Pediatric Hematology/oncology**, v. 35, n. 8, p.347-349, 2013.

PATHARE A, AL KINDI S, DAAR S, DENNISON D. Cytokines in sickle cell disease. **Hematology**; v. 8; p. 329-37, 2003.

PEDROSA, A. M. *et al.* Cytotoxicity and DNA damage in the neutrophils of patients with sickle cell anaemia treated with hydroxyurea. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 2, p.401-410, 2014.

PELIZARO, B. I. *et al.* Hydroxyurea in the sickle cell anemia: toxicity and effectiveness. **Rev enferm UFPE on line**, v. 6, n. 8, p. 1864-1870, 2012.

PIEL, F B. Sickle-cell disease: geographical distribution and population estimates. **Med Sci (paris)**, v. 29, n. 11, p.965-967, 2013.

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.

POLANOWSKA-GRABOWSKA, R.; WALLACE, K.; FIELD, J.J. *et al.* P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 30, n. 12, p. 2392-2399, 2010.

POTOKA, K. P.; GLADWIN, M. T.. Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 308, n. 4, p.314-324, 2014.

PROENÇA-FERREIRA, R. *et al.* Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. **PloS one** v. 9, n. 2, 2014.

PROENÇA-FERREIRA, R *et al.* Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for α Ib β 3-mediated ligand binding, diminished cAMP signaling and increased phosphodiesterase 3A activity. **Br J Haematol**. V. 149, p. 280-288, 2010.

PULE, G. D. *et al.* A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. **Expert Review Of Hematology**, v. 8, n. 5, p.669-679, 2015.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **British journal of haematology**, v, 156, p. 433-445, 2011.

REES, DC.; WILLIAMS, TN.; GLADWIN, MT. Sickle-cell disease. **The Lancet** v. 376, n. 9757, p. 2018–2031 , 2010.

REID, M. E. et al. A double-blind, placebo-controlled phase II study of the efficacy and safety of 2,2-dimethylbutyrate (HQB-1001), an oral fetal globin inducer, in sickle cell disease. **Am J Hematol**; v. 89, p. 709–713, 2014.

REITER, C., WANG, X., TANUS-SANTOS, J., *et al.* Cell-free hemoglobina limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. **Nat Med**. v. 8, p. 1383-1389, 2002.

RENZI, D.; VALTOLINA.; M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi endpoint citotoxicity assay. Italian Culture Meeting. Alternative to Laboratory Animals. v.21, p. 86-89, 1993.

ROCHA, L.B.S.; ELIAS, D.B.D.; BARBOSA, M.C.; BANDEIRA, I.C.J.; GONÇALVES, R.P. DNA damage in leukocytes of sickle cell anemia patients is associated with hydroxyurea therapy and with HBB*S haplotype. **Mutation Research**, v.749, p.48– 52, 2012.

SAKAMOTO, T. M. *et al.* Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. **Microvascular Research**, v. 90, p.173-179, 2013.

SANTOS, M. N. N.. Haptoglobin: an emerging candidate for phenotypic modulation of sickle cell anemia?. **Rev bras hematol hemoter**, v. 37, n. 6, p.361-363, 2015.

SARRAY, Sameh et al. Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. **Cytokine**, v. 72, n. 1, p.43-47, 2015.

SAÚDE, 2014. **Doença Falciforme. O que se deve saber sobre herança genética.**

Disponível

em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_deve_saber_sobre_heranca.pdf>. Acesso em: 22 março 2016. Brasília, 2014.

SEGAL, J.B.; STROUSE, J.J.; BEACH, M.C.; HAYWOOD, C.; WITKOP, C., PARK, H.; WILSON, R.F.; BASS, E.B.; LANZKRON, S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease. **Evid Rep Technol Assess**. N. 165, 2008.

SERJEANT, G; HAMBLETION, I. Priapism in Homozygous Sickle Cell Disease: A 40 year Study of the Natural History. **West Indian Medical Journal**, p.175-180, 2015.

SHARPE, C. C.; THEIN, S. L.. How I treat renal complications in sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3720-3726, 2014.

SHETH, S.; BHATIA, M. Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease: patient selection and special considerations. **Journal Of Blood Medicine**, p.229-238, 2015.

SILVA, LB; GONÇALVES, RP. Características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene da β S -globina em Fortaleza , Ceará. **Rev bras hematol hemoter** v. 32, n. 1 , 2009.

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.

SILVA-PINTO, A. C. *et al.* Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 131, n. 4, p.238-243, 2013.

SMITH, W R *et al.* Daily assessment of pain in adults with sickle cell disease. **Annals of Internal Medicine** v. 148, n. 2, p. 94–101 , 2008.

SONATI M.F., COSTA F.F. The genetics of blood disorders: the hereditary hemoglobinopathies. **J Pediatr**; v. 84, p. 40-51, 2008.

STEINBERG, M. H. *et al.* Effect of hydroxiurea on mortality and morbidity in adults sickle cell anemia: risk and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA**, v. 289, n. 13, p. 1645- 1651, 2003.

STEINBERG, M.; NAGEL, R. New and recombinant mutant hemoglobins of biological interest. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. **Cambridge University Press**, p. 1195-1211, 2001.

STEINBERG, M.H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **Scientific World Journal**, v. 8, p. 1295-324, 2008.

STROUSE JJ, LANZKRON S, BEACH MC, et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. **Pediatrics**, v. 122, n. 6, 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.

TANTAWY A, ADLY A, ISMAIL E, ALY S. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 VNTR polymorphism in sickle cell disease: Relation to vasculopathy and disease severity. **Pediatr Blood Cancer**, 2014.

TAPIERO, H.; MATHÉ, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Arginine. **Biomed. Pharmacother.**, v.56, p. 439-445, 2002.

TASSEL C, ARNAUD C, KULPA M, FLEURENCE E, KANDEM A, MADHI F, *et al.* Leukocytosis is a risk factor for lung function deterioration in children with sickle cell disease. **Respiratory medicine**, v. 105, n. 5, p. 788-95, 2011.

TEWARI, S. *et al.* Environmental determinants of severity in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 100, n. 9, p.1108-1116, 1 set. 2015.

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. 6-12; 2013.

TOMER, A.; HARKER, L.A.; KASEY, S.; ECKMAN, J.R. Thrombogenesis in sickle cell disease. **J Lab Clin Med**. V. 137, n. 6, p. 398-407, 2001.

VICARI, P. *et al.* Interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, v. 54, n. 3, p.244-249, 2015.

VIGIL, G. D.; HOWARD, S. S. Photophysical characterization of sickle cell disease hemoglobin by multi-photon microscopy. **Biomedical Optics Express**, v. 6, n. 10, p.4098-4104, 2015.

VILLAGRA, J. *et al.* Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. **Blood** . V. 110, n. 6, p. 2166-2172, 2007.

WALI, Y. *et al.* Coexistence of sickle cell disease and severe congenital neutropenia: first impressions can be deceiving. **European Journal Of Haematology**, v. 89, n. 3, p.245-249, 2012.

WANG, W. C.. Minireview: Prognostic factors and the response to hydroxyurea treatment in sickle cell disease. **Experimental Biology And Medicine**, v. 241, n. 7, p.730-736, 2016.

WARE, R. E.; AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **ASH Education Program Book**, v. 1, p. 62-69, 2009.

WAUGH, W. Arginine Metabolism, Pulmonary Hypertension, and Sickle Cell Disease. **JAMA**, v. 294, n. 19, p.2432-2434, 2005.

WILSON, S. Acute leukemia in a patient with sickle-cell anemia with hydroxyurea. **Ann Intern Med**. v. 5, n. 133(11), p. 925-926, 2000.

WONG, T. E. *et al.* Update on the use of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. **Blood**, v. 124, n. 26, p.3850-3857, 2014.

WOOD, K.C.; HSU, L.L.; GLADWIN, M.T. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. **Free Radic Biol Med**. 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.

WUNDER, F. Characterization of the first potent and selective PDE9 inhibitor using a cGMP reporter cell line. **Molecular Pharmacology**, p.1775-1780, 2005.

YOSMANOVICH, D. *et al.* Calibrating Sickle Cell Disease. **Journal Of Molecular Biology**, v. 428, n. 8, p.1506-1514, 2016.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia:Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 1081p. 2004.

ZAGO, M.A. Considerações gerais sobre as doenças falciformes. In: Manual de Diagnóstico e Tratamento das Doenças Falciformes (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, org.), Brasília: Ministério da Saúde, p. 9-11, 2002.

ZAGO, M.A; PINTO, A.C.S. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. **Rev Bras Hematol Hemoter**; v. 29, p. 207-14. 2007.

ZHANG, D.; XU. C.; MANWANI, D.; FRENETTE, P.S. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**. v. 127, n. 7, p. 801-809, 2016.

ANEXO A- PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DE DROGAS MODULADORAS DA VIA NO-GMPc SOBRE AS PROPRIEDADES ADESIVAS E INFLAMATÓRIAS DE NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36944814.9.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 949.975

Data da Relatoria: 14/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se do protocolo de pesquisa cujo projeto é intitulado: "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DE DROGAS MODULADORAS DA VIA NO-GMPc SOBRE AS PROPRIEDADES ADESIVAS E INFLAMATÓRIAS DE NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME". A pesquisadora principal é a Dra. Romelia Pinheiro Gonçalves. "A anemia falciforme (AF) é uma anemia hereditária, caracterizada pela homozigose da hemoglobina S e por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. A hidroxiuréia (HU) é a única droga utilizada no tratamento da AF, por induzir a síntese de hemoglobina fetal (HbF) e atuar como doadora de óxido nítrico (NO), reduzindo as crises de vaso-oclusão e o processo inflamatório crônico. No entanto, alguns estudos sugerem que a HU tenha efeito mutagênico. Novas estratégias terapêuticas têm surgido com a finalidade de promover o aumento intracitoplasmático de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e de óxido nítrico (NO). Estudo transversal e participarão do estudo 50 pacientes com diagnóstico molecular de AF, divididos em dois grupos, de acordo com o uso de HU. Os neutrófilos dos pacientes serão isolados e tratados com BAY73-6691 e L-arginina. Serão realizados os ensaios para avaliação da viabilidade celular em neutrófilos através da liberação de LDH e do teste do MTT. Além disso, os níveis de TNF- α , IL8, IL-10, NFK-b e GMPc e a expressão de

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 949.975

ICAM-I serão determinados por ensaio imunoenzimático, através de kits comerciais. A produção de espécies reativas de oxigênio será verificada por quimioluminescência. A expressão de moléculas de adesão e será realizada por citometria de fluxo. Trata-se de um projeto inovador, que poderá fornecer informações importantes para o tratamento de pacientes com AF, além de sugerir nova proposta terapêutica. A hipótese é que: "As drogas moduladoras da via NO/GMPc reduzem a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e reticulócitos e o níveis de mediadores inflamatórios. Os pacientes serão divididos em dois grupos: pacientes sem usar hidroxiureia e em uso de hidroxiurêia na dose de 20-30mg/kg/dia. Há critérios de inclusão e de exclusão para os participantes da pesquisa. Um grupo controle será formado por 50 indivíduos com HbAA, confirmado por eletroforese de hemoglobina. O cronograma de execução da pesquisa tem o período de março de 2014 a fevereiro de 2016. Tem 39 referências relevantes e atualizadas até 2012

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

Investigar os efeitos de drogas moduladoras da via NO/GMPc sobre as propriedades adesivas e inflamatórias de neutrófilos de pacientes com anemia falciforme

Objetivos específicos:

-Avaliar os efeitos de drogas moduladoras da via NO/GMPc sobre a citotoxicidade em neutrófilos de pacientes com AF.

-Avaliar os efeitos de drogas moduladoras da via NO/GMPc sobre os níveis de citocinas inflamatórias, expressão de moléculas de adesão, propriedades adesivas, atividade da enzima elastase e níveis de NFκ-b em neutrófilos de pacientes com AF.

-Mensurar o GMPc intracitoplasmático em neutrófilos de pacientes com AF.

-Avaliar os efeitos de drogas moduladoras da via NO/GMPc sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos de pacientes com AF

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto ao riscos, o único apontado pela pesquisadora foi o da possibilidade de aparecer uma mancha roxa no local da coleta de sangue, o que corresponde ao método utilizado.

Quanto aos benefícios: a possibilidade de obter uma nova proposta para tratamento da AF, que possa substituir ou atuar como coadjuvante da HU. Dessa forma, os efeitos tóxicos dessa droga poderão ser minimizados e, além disso, os pacientes que não respondem a esse tratamento poderão se beneficiar com a nova proposta.

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: Rodolfo Tedflio CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (853)366-8613 Fax: (853)281-4961 E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

Continuação do Parecer: 949.975

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante para as pessoas que têm anemia falciforme porque é estudado os efeitos de drogas moduladoras da via NO-GMPc sobre as propriedades adesivas e inflamatórias de neutrófilos o que geraria conhecimento capaz de promover um tratamento mais adequado. A pesquisadora tem muita experiência no estudo da anemia falciforme. O custo previsto é de R\$ 8.269,00, sendo este de responsabilidade da pesquisadora principal.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios foram apresentados estão adequados:

- Carta de apresentação
- Folha de Rosto
- Projeto de Pesquisa
- TCLE
- Curriculum lattes das pesquisadoras
- Orçamento
- Cronograma
- Declaração de concordância dos participantes
- Termo de compromisso com o sigilo
- Declaração de fiel depositário
- Termo de Ciência do Diretor do Serviço de Hematologia

Recomendações:

A análise estatística poderia ser dividida em análise descritiva, através de tabelas gráficas e medidas de tendência central/dispersão e análise inferencial a depender do tipo de variável e, em sendo quantitativa, se pode ser considerada de distribuição normal ou não. O tipo de teste dependerá destes e de outros fatores, incluindo a quantidade de dados disponíveis.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram resolvidas. O TCLE foi completado com: benefícios para os participantes e fontes para contato com a pesquisadora.

Não há problema(s) ético(s) no protocolo (Projeto) atual

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (853)366.-8613 Fax: (853)281.-4961 E-mail: cephuwo@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 949.975

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deverá enviar relatório parcial ao final deste ano de 2014 e após a conclusão da pesquisa (2016) e comunicar qualquer intercorrência que possa eventualmente ocorrer, ao longo da pesquisa.

FORTALEZA, 10 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (853)366-8613 Fax: (853)261-4961 E-mail: cephuwo@huwc.ufc.br

APÊNDICE A - TERMO DE DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Investigação dos efeitos de drogas moduladoras da via NO-GMPC sobre as propriedades adesivas e inflamatórias de neutrófilos de pacientes com anemia falciforme” que tem como objetivo principal Investigar os efeitos de drogas moduladoras da via NO/GMPC sobre as propriedades adesivas e inflamatórias de neutrófilos de pacientes com anemia falciforme que são acompanhados no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Para tanto, necessitamos que o Sr.(a) autorize a obtenção de 2 (duas) amostras de sangue para que a pesquisa seja realizada. A coleta de sangue será realizada no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC).

A participação na pesquisa, não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa devido à coleta do sangue. Esta pesquisa poderá trazer benefícios aos pacientes com anemia falciforme, pois estuda a possibilidade de melhoria no tratamento da doença, usando medicamentos que ofereçam menos riscos.

O senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa 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.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Romélia Pinheiro Gonçalves, endereço para contato institucional: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Porangabussu, CEP 60430-370 - Fortaleza, CE – Brasil, Telefone: (85) 33668264; e para contato pessoal: Rua Pereira Valente, 640, ap 701 – Meirelles – Fortaleza, CE, telefone (85) 9822 4040.

Se o Senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HUWC- Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 - Rodolfo Teófilo; Fone: (0xx)85 3366-8589- E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br.

Caso o Senhor (a) se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se o Senhor(a) concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/ representante legal

Data: / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: / /

APÊNDICE B

Tabela 2- Valores de média \pm erro padrão da média (E.P.M) dos resultados do estudo.

Atividade de LDH (U/L) (L-arginina)						
Grupos	HBSS	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	Tx-100
SS	49,30 \pm 7,27	57,18 \pm 8,34	57,69 \pm 7,18	66,89 \pm 12,18	126,10 \pm 12,0	461,70 \pm 11,64
SSHU	48,61 \pm 7,87	56,69 \pm 7,41	64,81 \pm 9,68	64,34 \pm 7,67	122,70 \pm 14,43	502,9 \pm 17,11

MTT (%) (L-arginina)						
Grupos	HBSS	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	Tx-100
SS	79,0 \pm 0,7	91,67 \pm 1,3	83,30 \pm 3,7	71,50 \pm 1,8	60,67 \pm 0,7	35,97 \pm 2,9
SSHU	83,83 \pm 6,2	90,67 \pm 5,1	84,90 \pm 6,1	70,90 \pm 0,8	58,90 \pm 0,1	32,87 \pm 6,8

Atividade de LDH (U/L) (BAY 73-6691)							
Grupos	HBSS	DMSO	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	Tx-100
SS	49,54 \pm 1,3	68,97 \pm 1,7	49,54 \pm 0,9	57,37 \pm 1,3	76,27 \pm 1,2	148,5 \pm 2,3	456,6 \pm 6,9
SSHU	55,06 \pm 7,8	68,97 \pm 1,2	50,08 \pm 0,6	61,15 \pm 1,0	68,31 \pm 0,8	152,5 \pm 1,1	496,8 \pm 4,9

MTT (%) (BAY 73-6691)							
Grupos	HBSS	DMSO	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	Tx-100
SS	89,59 \pm 2,5	79,78 \pm 2,6	97,74 \pm 0,9	97,00 \pm 1,6	97,74 \pm 1,2	36,12 \pm 2,6	25,25 \pm 1,93
SSHU	82,31 \pm 6,5	74,53 \pm 6,5	94,24 \pm 2,5	90,74 \pm 4,9	91,24 \pm 3,7	30,47 \pm 5,2	20,98 \pm 2,47

Atividade de LDH (Associação L-arginina e BAY 73-6691)			
Grupos	HBSS	L-arg + BAY	Tx-100
SS	49,30 \pm 7,27	54,82 \pm 7,8	462,70 \pm 11,6
SSHU	48,61 \pm 7,87	73,00 \pm 7,8	502,9 \pm 17,1

MTT (Associação L-arginina e BAY 73-6691)			
Grupos	HBSS	L-arg + BAY	Tx-100
SS	79,0 \pm 0,7	80,07 \pm 1,1	35,97 \pm 2,9
SSHU	83,83 \pm 6,2	81,77 \pm 4,6	32,87 \pm 6,8

TNF- α (L-arginina)

Grupos	HBSS	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Controle	5,89 \pm 0,38	-	-	-	-
SS	11,98 \pm 1,0	7,69 \pm 2,3	7,53 \pm 1,2	6,23 \pm 2,2	4,78 \pm 1,2
SSHU	5,98 \pm 0,45	7,97 \pm 1,5	5,59 \pm 1,0	5,52 \pm 1,4	4,23 \pm 0,1

TNF- α (BAY 73-6691)

Grupos	HBSS	DMSO	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Controle	5,89 \pm 0,38	-	-	-	-	-
SS	11,98 \pm 1,0	10,85 \pm 1,7	10,48 \pm 0,9	8,06 \pm 0,5	6,56 \pm 0,7	5,86 \pm 0,2
SSHU	5,98 \pm 0,45	7,41 \pm 0,2	6,44 \pm 0,5	6,58 \pm 0,6	6,38 \pm 0,3	5,48 \pm 0,2

TNF- α (Associação L-arginina e BAY 73-6691)

Grupos	HBSS	L-arg 10 $\mu\text{g/mL}$	BAY 10 $\mu\text{g/mL}$	L-arg + BAY
Controle	5,89 \pm 0,38	-	-	-
SS	11,98 \pm 1,0	6,23 \pm 2,2	6,65 \pm 0,7	6,47 \pm 0,6
SSHU	5,98 \pm 0,45	5,52 \pm 1,9	6,38 \pm 0,3	5,49 \pm 0,4

IL-8 (L-arginina)

Grupos	HBSS	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Controle	6,85 \pm 0,9	-	-	-	-
SS	14,77 \pm 1,1	10,45 \pm 2,2	12,94 \pm 2,2	10,10 \pm 1,9	9,52 \pm 1,1
SSHU	8,04 \pm 0,5	9,01 \pm 1,7	8,55 \pm 1,2	7,07 \pm 0,9	9,53 \pm 0,8

IL-8 (BAY 73-6691)

Grupos	HBSS	DMSO	0,1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Controle	6,85 \pm 0,9	-	-	-	-	-
SS	14,77 \pm 1,1	13,31 \pm 1,7	9,74 \pm 0,9	7,43 \pm 0,6	7,46 \pm 0,4	9,88 \pm 0,6
SSHU	8,04 \pm 0,5	8,05 \pm 0,4	7,42 \pm 0,5	7,07 \pm 0,4	6,91 \pm 0,5	6,64 \pm 0,3

IL-8 (Associação L-arginina e BAY 73-6691)

Grupos	HBSS	L-arg 10 $\mu\text{g/mL}$	BAY 10 $\mu\text{g/mL}$	L-arg + BAY
Controle	6,85 \pm 0,9	-	-	-
SS	14,77 \pm 1,1	10,10 \pm 1,9	7,46 \pm 0,4	6,50 \pm 0,9
SSHU	8,04 \pm 0,5	7,07 \pm 0,9	6,91 \pm 0,5	6,38 \pm 0,8

NO (mM) (L-arginina)

Grupos	HBSS	0,1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
Controle	2,72±0,11	-	-	-	-
SS	0,93±0,1	3,52±0,4	5,65±0,5	3,88±0,4	5,23±0,3
SSHU	2,70±0,1	2,92±0,6	3,16±0,4	3,01±0,5	3,84±0,4

NO (BAY 73-6691)

Grupos	HBSS	DMSO	0,1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
Controle	2,72±0,11	-	-	-	-	-
SS	0,93±0,1	0,98±0,1	1,28±0,1	1,5±0,0	1,72±0,1	1,83±0,1
SSHU	2,70±0,1	2,55±0,8	2,70±0,1	2,93±0,0	3,11±0,1	3,57±0,1

NO (Associação L-arginina e BAY 73-6691)

Grupos	HBSS	L-arg 10 µg/mL	BAY 10 µg/mL	L-arg + BAY
Controle	2,72±0,11	-	-	-
SS	0,93±0,1	3,88±0,4	1,72±0,1	2,87±0,2
SSHU	2,70±0,1	3,01±0,5	3,11±0,1	3,31±0,2
