



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

**ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO CEGO PLACEBO PARA ESTUDO DA**  
**EFICÁCIA DA L-ARGININA COMO PROTOCOLO TERAPÊUTICO**  
**COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME**

**FORTALEZA**

**2019**

RENATA MIRIAN NUNES ELEUTÉRIO

ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO CEGO PLACEBO PARA ESTUDO DA  
EFICÁCIA DA L-ARGININA COMO PROTOCOLO TERAPÊUTICO COADJUVANTE  
NO TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Ensaios pré-clínicos e clínicos.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tamara Gonçalves de Araújo.

FORTALEZA

2019

RENATA MIRIAN NUNES ELEUTÉRIO

ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO CEGO PLACEBO PARA ESTUDO DA  
EFICÁCIA DA L-ARGININA COMO PROTOCOLO TERAPÊUTICO COADJUVANTE  
NO TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em desenvolvimento e inovação tecnológica em medicamentos da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Área de concentração: Ensaios pré-clínicos e clínicos.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tamara Gonçalves de Araújo.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (ORIENTADORA)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tamara Gonçalves de Araújo (COORIENTADORA)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado  
Universidade Federal do Ceará (UNIFOR)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Darcielle Bruna Dias Elias  
Universidade Federal do Ceará (FVJ)

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)

---

- E1e Eleutério, Renata Mirian Nunes.  
Ensaio clínico randomizado duplo cego placebo para estudo da eficácia da L-arginina com protocolo terapêutico coadjuvante no tratamento da anemia falciforme / Renata Mirian Nunes Eleutério. – 2019.  
76 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos - Associação UFC/UFPB/UFRN/UFRPE, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.  
Coorientação: Prof. Dr. Tamara Gonçalves de Araújo.
1. Anemia falciforme. 2. Óxido nítrico. 3. Arginina. I. Título.

CDD 615.1

---

“Que seu remédio seja seu alimento, e que seu  
alimento seja seu remédio” (Hipócrates)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela oportunidade e dom da vida e saúde para enfrentar desafios e tentar evoluir sempre!

Agradeço de forma muito especial a minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes pela confiança e apoio durante esta caminhada. Agradeço imensamente também a coorientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Tamara Gonçalves de Araújo, com toda sua doçura e amizade me auxiliou muito! Obrigada professoras! Vocês me ensinaram muito!

Sou grata de forma especial a todos os professores que conheci nessa jornada, cada um em sua especialidade, e todos em prol de melhorar nossa sociedade, cada um em sua busca incessante por suas causas! Obrigada!

Obrigada aos colegas e amigos que fiz e que pretendo levar para sempre em minha vida! Todos os amigos queridos do Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas, que me apoiaram e me auxiliaram nos testes, arquivos, projeto e também em momentos de alegria e descontração fizeram a vida ficar mais leve! Vivemos muitos momentos importantes também em nossas vidas pessoais, e agradeço o companheirismo e alegrias divididas!

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos de todas as universidades (UFC, UFRN, UFPB, UFRPE) agradeço profundamente todo o apoio e amizade, sem contar as viagens, estudos e MUITA torcida para tudo dar certo, meu muito obrigada! Em especial, as minhas amigas Racquel, Suelen, Paloma e Luana, que foram as pessoas que compartilhei o quarto, aventuras, conhecer novas cidades e os trabalhos nas disciplinas em outros estados! A amiga querida, Islaine, que me recebeu em seu lar, e compartilhou a convivência com sua família, sempre tão querida e acolhedora! Gratidão!

A equipe do HEMOCE e toda a instituição e pacientes, agradeço imensamente pela confiança deste trabalho, em especial Dr<sup>ª</sup> Vânia, Dr Osanildo, Dr<sup>ª</sup> Adlene, Dr<sup>ª</sup> Gecivânia, Léo, Dr Tiê, colegas farmacêuticos que me auxiliaram imensamente na coleta de dados, e aos pacientes do Ambulatório de Hemoglobinopatias do HEMOCE. Que este trabalho tenha trazido uma opção terapêutica para estes pacientes, e que a busca pela qualidade de vida e amizade continuem no espírito de toda a equipe que convivi nestes últimos anos.

Agradeço imensamente o Dr. Ernesto pelo auxílio na confecção e montagem do ensaio clínico, disponibilizando sua farmácia de manipulação (ProPhormula) e amizade!

A Raimundinha e Jéssica, que me auxiliaram muito na secretaria e, como boas amigas, me ajudaram também com suas amizades e apoio! A todos os professores e funcionários que convivi durante esses anos, fica toda minha gratidão e amizade!

Agradeço a minha família que sempre me ajuda de forma incondicional! Meu pai, pelo exemplo que é, além da ajuda durante todo o processo do doutorado, e toda a confiança e amizade durante toda minha vida! A minha mãe, pelo exemplo, dedicação e ajuda para que eu realize sonhos e metas! Aos meus irmãos, por serem os meus maiores presentes desta vida! Em especial, Rafinha, pela parceria e amizade desde sempre, além do apoio e palavras de estímulo! Ao meu marido, por sempre estar comigo nos maiores projetos, me encorajando! E, ao meu filho amado, que trouxe no meio desta experiência a maior delas: ser mãe! A Miguelito pela experiência recente e incrível de amar profundamente o filho de alguém como se fosse meu! A todos meus avós, tios, primos, afilhados, amigos que são família, daqui e do Rio de Janeiro: amo muito cada um de vocês! Isso tudo é por vocês!

A todos que me ajudaram de forma direta ou indireta, fica toda a minha gratidão!

## RESUMO

Anemia falciforme (AF) é a doença monogênica mais prevalente do Brasil, caracterizada pela presença da hemoglobina S (HbS) em homozigose. No estado desoxigenado, a HbS se polimeriza modificando a morfologia e comprometendo a função das hemácias. A hemólise intravascular promove a liberação de hemoglobina livre, a formação de radicais livres que degradam o óxido nítrico (NO), e a liberação da arginase, que consome arginina, o substrato para a formação do NO, ambos mecanismos contribuem para a redução da síntese desse potente vasodilatador. A patofisiologia da doença se caracteriza por eventos recorrentes de hemólise e crises de vaso-oclusão, além de um processo inflamatório sistêmico com dano endotelial, aumento do estresse oxidativo e estado pró-coagulante, apresentando elevada taxa de comorbidades e mortalidade. No Brasil, para o tratamento da AF é recomendado o uso contínuo da hidroxiuréia (HU) com a finalidade de elevar a concentração da hemoglobina fetal (HbF), principal modular clínico da doença. Porém, a citotoxicidade da HU aliada à resistência por alguns pacientes tem contribuído para a busca de alternativas que auxiliem no tratamento, reduzindo os efeitos adversos e melhorando a qualidade de vida. A L-arginina é um aminoácido que não possui efeitos adversos catalogados, sendo o substrato da formação de NO, melhorando assim a microcirculação e reduzindo principalmente o dano endotelial. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo analisar a eficácia da L-arginina como um protocolo terapêutico coadjuvante à utilização da HU no tratamento dos pacientes com AF. Trata-se de um ensaio clínico randomizado duplo cego, placebo, com pacientes com AF, adultos, de ambos os sexos, em uso contínuo de HU há pelo menos dois meses, na dose a partir de 500mg mg/kg/dia, em acompanhamento no Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE). Este estudo foi realizado em 50 pacientes, sendo que 25 receberam a HU + L-arginina (500mg/dia) e 25 pacientes receberam a HU + placebo. O tratamento foi no período de quatro meses, com as avaliações clínica e laboratorial. Antes de iniciar o tratamento (M0) e a cada dois meses do mesmo (M2, M4) foram coletadas amostras de sangue periférico para a realização dos exames laboratoriais: hemograma completo, por método automático, dosagem do NO, por Elisa, determinação da HbF, por HPLC e determinação dos reticulócitos pelo azul cresil brilhante (manual). Foi também realizada a dosagem de arginase, por kit específico Arginase Activity Assay Kit, nos momentos antes de iniciar o tratamento com L-arginina (M0) e com quatro meses de tratamento (M4). A abordagem clínica foi realizada através de consulta médica do serviço de hematologia,



para avaliar a evolução clínica e possíveis reações adversas. A análise estatística foi realizada mediante a utilização do programa estatístico GraphPad Prism® e SPSS®. O nível de significância estatística considerado para todas as análises foi  $p < 0.05$ . Um total de 52% dos pacientes pertencia ao sexo feminino e 48% ao masculino. A média da idade foi de 28 anos. Os pacientes faziam uso de HU há pelo menos dois meses, variando de dois a 108 meses (9 anos). A média da dose de HU ocorreu de 1040mg no grupo placebo e 1070mg no grupo estudo. O aumento dos níveis de NO no grupo estudo (HU +L-arginina) ocorreu de maneira significativa no quarto mês do ensaio clínico. A frequência de dor relatada pelos pacientes também reduziu no grupo estudo, demonstrando o potencial papel da L-arginina como coadjuvante no tratamento da AF. Os outros dados clínicos e laboratoriais não apresentaram diferenças entre os grupos placebo e estudo, incluindo a arginase. O ensaio clínico demonstrou que houve o aumento dos níveis de NO e redução de frequência de dor em pacientes com AF que utilizaram arginina em associação com a HU, demonstrando a possibilidade desta terapêutica ser inserida no protocolo de tratamento, requerendo ainda novos ensaios com mais tempo de acompanhamento.

**Palavras chaves:** Anemia falciforme, Óxido nítrico, Arginina.

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent monogenic disease in Brazil, characterized by the presence of hemoglobin S (HbS) in homozygosity. In the deoxygenated state, the HbS polymerizes by modifying the morphology and compromising the function of the red blood cells. Intravascular hemolysis promotes the release of free hemoglobin, the formation of free radicals that degrade nitric oxide (NO), and the release of arginase, which consumes arginine, the substrate for NO formation, both mechanisms contribute to the reduction of synthesis of this potent vasodilator. The pathophysiology of the disease is characterized by recurrent events of hemolysis and vaso-occlusion crises, as well as a systemic inflammatory process with endothelial damage, increased oxidative stress and procoagulant status, presenting a high rate of comorbidities and mortality. In Brazil, continuous use of hydroxyurea (HU) is recommended for the treatment of SCA in order to raise the concentration of fetal hemoglobin (HbF), the main clinical modality of the disease. However, the cytotoxicity of HU coupled with resistance by some patients has contributed to the search for alternatives that aid in the treatment, reducing the adverse effects and improving the quality of life. L-arginine is an amino acid that has no listed adverse effects, being the substrate of NO formation, thus improving microcirculation and reducing primarily endothelial damage. Thus, this study aimed to analyze the efficacy of L-arginine as a therapeutic protocol to support the use of HU in the treatment of patients with SCA. It is a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of adult patients of both sexes in continuous use of HU for at least two months at a dose of 500mg / kg / day in follow-up in the Blood Center of the State of Ceará (HEMOCE). This study was performed in 50 patients, with 25 receiving HU + L-arginine (500mg / day) and 25 patients receiving HU + placebo. The treatment was in the period of four months, with clinical and laboratory evaluations. Before starting the treatment (M0) and every two months of the same (M2, M4), samples of peripheral blood were collected for the laboratory tests: complete blood count, by automatic method, determination of NO by ELISA, determination of HbF, by HPLC and determination of reticulocytes by bright cresyl blue. Arginase dosage was also performed by specific Arginase Activity Assay Kit at the time before treatment with L-arginine (M0) and four months of treatment (M4). The clinical approach was performed through a medical evaluation from the Hematology Department, to evaluate the clinical evolution and possible adverse reactions. Statistical analysis was performed using the statistical program GraphPad Prism®

and SPSS®. The level of statistical significance considered for all analyzes was  $p < 0.05$ . A total of 52% of the patients belonged to females and 48% to males. The mean age was 28 years. Patients had used UH for at least two months, ranging from two to 108 months (9 years). The mean dose of HU occurred in 1040mg in the placebo group and 1070mg in the study group. The increase in NO levels in the study group (HU + L-arginine) occurred significantly in the fourth month of the clinical trial. The frequency of pain reported by patients also decreased in the study group, demonstrating the potential role of L-arginine as a coadjuvant in the treatment of AF. Other clinical and laboratory data showed no differences between the placebo and study groups, including arginase. The clinical trial demonstrated that there was an increase in NO levels and reduction of pain frequency in patients with AF using arginine in association with HU, demonstrating the possibility of this therapy being inserted in the treatment protocol, requiring further trials with longer duration monitoring.

**Keywords:** Sickle cell anemia, Nitric oxide, Arginine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da hemoglobina normal humana: estrutura quaternária e composta por quatro cadeias polipeptídicas e grupo heme com ferro.....	19
Figura 2 - Esquema da substituição do ácido glutâmico pela valina, originando a hemoglobina tipo S (HbS) .....	20
Figura 3 - Modificação molecular na estrutura da hemoglobina .....	21
Figura 4 - Fisiopatologia da doença falciforme.....	22
Figura 5 - Mecanismos da anemia hemolítica na redução da biodisponibilidade do NO.....	26
Figura 6 – Síntese de NO a partir da L-arginina, que age como substrato para a reação que resulta em vasodilatação.....	29
Figura 7 – Casuística dos pacientes, organizados em dois grupos, estudo e placebo.....	35
Figura 8 – Reação de Griss para análise de nitrito e nitrato.....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Cálculo de ANOVA misto nos momentos M0, M2 e M4 e teste sobre efeito da arginina em relação aos níveis de nitrito.....	48
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escala da frequência de dor.....	37
Tabela 2 – Escala da frequência de internação.....	37
Tabela 3- Características dos pacientes.....	45
Tabela 4 - Parâmetros hematológicos dos pacientes com anemia falciforme durante o ensaio clinico.....	47
Tabela 5 - Média e desvio padrão de nitrito nos momentos M0, M2 e M4, nos grupos estudo e placebo, e geral.....	47
Tabela 6 – Dados da frequência de dor dos pacientes em ambos os grupos, nos momentos M0, M2 e M4.....	49
Tabela 7 – Níveis de arginase nos pacientes em ambos os grupos, nos momentos M0, M2 e M4.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

cGMP - Guanosina Monofostato Cíclico

Ca ++ - Cálcio

CONEP – Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

DNA – Ácido Dioxirribonucleico

eNOS - Endotelial Óxido Nítrico Sintase

Fe+2 – Átomo de Ferro no Estado Ferroso

GTP - Guanosina Trifosfato

HbS – Hemoglobina Falcêmica

HbF – Hemoglobina Fetal

Hb – Hemoglobina

HbSS – Hemoglobina homozigota

HU – Hidroxiuréia

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

ICAM – Molécula de Adesão Intercelular

M0 – Momento sem tratamento

M2 – Momento dois meses de tratamento

M4 – Momento quatro meses de tratamento

MPC - 1 - Proteína Quimiotática de Monócitos

NO – Óxido Nítrico

O<sub>2</sub> – Oxigênio

PDGF - Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas

SOD - Enzima Superóxido Dismutase

VCAM -1 - Molécula de Adesão da Célula Vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Hemácia e Hemoglobina .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Hemoglobinopatias .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Anemia Falciforme .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Quadro clínico e complicações na AF .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5 Óxido Nítrico .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5.1 Ações do Óxido nítrico .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.1.1 Manutenção do tônus vascular .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5.1.2 Agregação Plaquetária .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5.1.3 Inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular.....</b>	<b>27</b>
<b>1.5.1.4 Efeito antiproliferativo.....</b>	<b>27</b>
<b>1.5.1.5 Efeito antioxidativo .....</b>	<b>27</b>
<b>1.6 Arginina.....</b>	<b>28</b>
<b>1.7 Arginase.....</b>	<b>29</b>
<b>1.8 Tratamento da Anemia Falciforme no Brasil.....</b>	<b>31</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>3 METODOLOGIA</b>	
<b>3.1 Considerações Éticas .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Desenho do Estudo .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3 Casuística.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Local de Estudo.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 Seleção da Amostra .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5.1 Critérios de Inclusão .....</b>	<b>35</b>
<b>3.5.2 Critérios de Exclusão .....</b>	<b>36</b>
<b>3.6 Cálculo do tamanho da amostra .....</b>	<b>36</b>
<b>3.7 Seleção dos pacientes e intervenção .....</b>	<b>36</b>
<b>3.8 Coleta do material biológico .....</b>	<b>36</b>
<b>3.9 Capsulas utilizadas no ensaio clínico.....</b>	<b>37</b>
<b>3.10 Dados clínicos.....</b>	<b>37</b>



<b>3.11 Testes realizados.....</b>	<b>37</b>
<b>3.11.1 Hemograma completo.....</b>	<b>37</b>
<b>3.11.2 Dosagem de HbF .....</b>	<b>38</b>
<b>3.11.3 Níveis de Nitrito .....</b>	<b>38</b>
<b>3.11.3.1 Preparo de soluções padrões.....</b>	<b>39</b>
<b>3.11.3.2. Preparo de amostras.....</b>	<b>39</b>
<b>3.11.3.3. Reação do ensaio.....</b>	<b>40</b>
<b>3.11.3.4. Cálculos do resultado .....</b>	<b>40</b>
<b>3.11.4 Níveis de Arginase .....</b>	<b>40</b>
<b>3.11.4.1 Preparo da amostra .....</b>	<b>41</b>
<b>3.11.4.2. Padrão de uréia .....</b>	<b>41</b>
<b>3.11.4.3. Reação do ensaio.....</b>	<b>42</b>
<b>3.11.4.4. Cálculos .....</b>	<b>42</b>
<b>3.12 Descarte do Material biológico.....</b>	<b>43</b>
<b>3.13 Análises Estatísticas.....</b>	<b>43</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	
<b>4.1 Pacientes .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Parâmetros hematológicos .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Níveis de Nitrito + Nitrato .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 Clínica dos Pacientes .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5 Níveis de arginase .....</b>	<b>49</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>55</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS A .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS B .....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária que ocorre devido a mutação pontual no ácido desoxirribonucleico (DNA), havendo a substituição de timina por adenina, e consequente substituição do ácido glutâmico pela valina. Desta maneira, ocorre a formação de uma nova hemoglobina, a hemoglobina S (HbS), que no estado desoxigenado se deforma induzindo hemólise crônica e episódios de vaso-oclusão (BALLAS et al., 2012; NADER et al., 2018).

A AF é considerada a doença monogênica mais prevalente no Brasil, e sua clínica e resposta ao tratamento possuem uma variabilidade de acordo com alguns fatores, como: concentrações da hemoglobina fetal (HbF) e da hemoglobina S, os haplótipos do gene da beta globina, coexistência de alfa talassemia, doenças infectocontagiosas concomitantes, além das amplas questões socioeconômicas e acesso à assistência médica. Dessa forma, é uma doença que têm elevadas taxas de morbidade e mortalidade, devido principalmente aos eventos de vaso-oclusão na microcirculação em vários órgãos, comprometendo assim a qualidade de vida destes pacientes. Destaca-se ainda as dificuldades de adaptação emocional, social e econômica por parte dos pacientes com AF gerados por crises crônicas de dor e internações hospitalares recorrentes. Este cenário pode resultar em depressão, ansiedade, agressividade e pânico (ASNANI et al., 2010; BALLAS et al., 2012; ADAM et al., 2017; GREGORY et al., 2018).

O tratamento da AF no Brasil recomenda a utilização da hidroxiuréia (HU), um medicamento quimioterápico com mecanismo de citotoxicidade utilizado no tratamento de doenças mieloproliferativas crônica, que aumenta a concentração da HbF e com isso reduz tanto os eventos hemolíticos como as crises de vaso-oclusão. Estes pacientes, muitas vezes diagnosticados desde a infância, utilizam apenas esta opção terapêutica durante toda sua vida. Todavia alguns casos não respondem ao tratamento ou a necessidade de ajuste da dose da HU com o passar dos anos. Destaca-se também de que muitas vezes há desabastecimento do medicamento, fato que contribui para a descontinuidade do tratamento acarretando dor, anemia hemolítica e a insuficiência de múltiplos órgãos. Desta maneira, é importante buscar adjuvantes que possam auxiliar o papel da HU, de maneira que a dose mínima seja utilizada, auxiliando sua ação e, conseqüentemente, trazendo impacto nos resultados clínicos e laboratoriais dos pacientes (MAIA et al., 2018).

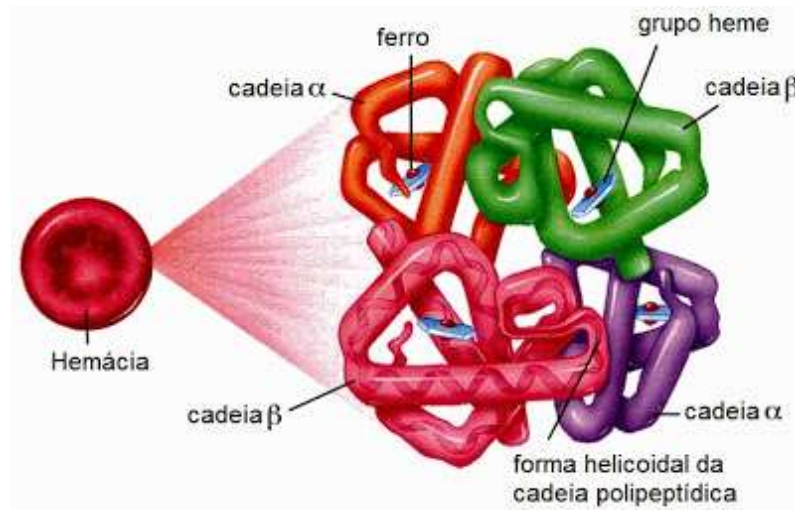
O presente estudo tem por principal objetivo realizar um ensaio duplo cego placebo utilizando arginina como coadjuvante ao tratamento com hidroxiuréia em pacientes adultos com anemia falciforme atendidos no Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE), buscando melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

### **1.1. Hemácias e hemoglobina**

A hemoglobina (Hb) está presente nas hemácias, e é uma proteína solúvel que possui como função primordial o transporte do oxigênio ( $O_2$ ) dos pulmões até os tecidos. A molécula de hemoglobina é formada por diferentes tipos de cadeias: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) e zeta ( $\zeta$ ). Estas cadeias formam um tetrâmero de polipeptídios de globina dispostas em pares, sendo duas cadeias  $\alpha$  e duas que não são tipo  $\alpha$ . Estão conectadas por um grupamento denominado heme, podendo receber, ligar e liberar o  $O_2$  nos tecidos (COSTA, SONATI, 2008; GARDNER, 2018).

O grupamento prostético heme é composto pelo átomo de ferro no estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ) ligado a protoporfirina IX. Na hemoglobina A, o grupo heme se associa a uma cadeia polipeptídica alfa, contendo 141 resíduos de aminoácidos e uma cadeia beta que possui 146 aminoácidos. As combinações entre as diversas cadeias de proteínas originam diferentes tipos de hemoglobina nas hemácias (FIGURA 1) (WEATHERALL, 2010; HOBAN, ORKIN, BAUER, 2016; CARNEIRO et al., 2017; COSTA, CONRAM, 2016).

Figura 1 – Estrutura hemoglobina normal humana: estrutura quaternária e composta por quatro cadeias polipeptídicas e grupo heme com ferro.



Nota: A hemoglobina é uma proteína conjugada, sua molécula é formada por dois componentes: o heme é uma proteína denominada globina. Existem quatro grupos heme em cada molécula de hemoglobina, cada um dos quais contém um átomo de ferro. Fonte: <http://lucindamorais.blogspot.com/p/proteinas-estrutura-e-funcao.html>

## 1.2. Hemoglobinopatias

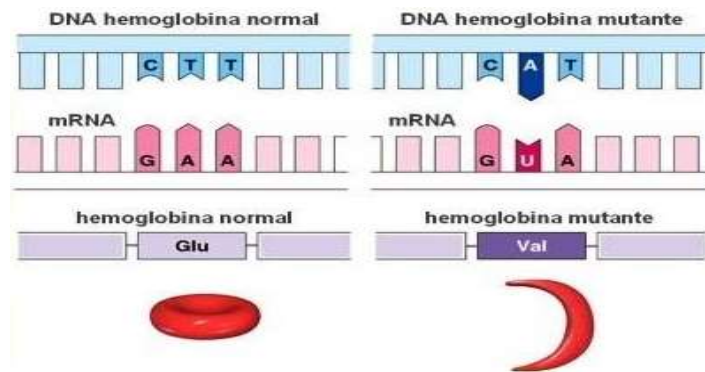
As hemoglobinopatias são condições clínicas que resultam de mutações estruturais e funcionais nos genes que codificam as cadeias de globina da molécula de Hb presente nos glóbulos vermelhos. A doença falciforme é a mais frequente e de maior impacto, por possuir alta prevalência e complicações em suas manifestações clínicas (SOMMER et al., 2006; AZAR, WONG, 2017).

Estudos demonstram que as mutações nas moléculas de Hb se originaram na África. Enquanto que no Brasil, as hemoglobinopatias ocorreram devido a vinda forçada dos escravos provenientes da África, assim como da mistura entre diferentes grupos, contribuindo para a maior distribuição dos genes anormais de globinas que pertencem a grupos étnicos. Justificando toda a heterogeneidade genética, e conseqüentemente os quadros clínicos (REIS et al., 2018).

### 1.3. Anemia Faciforme

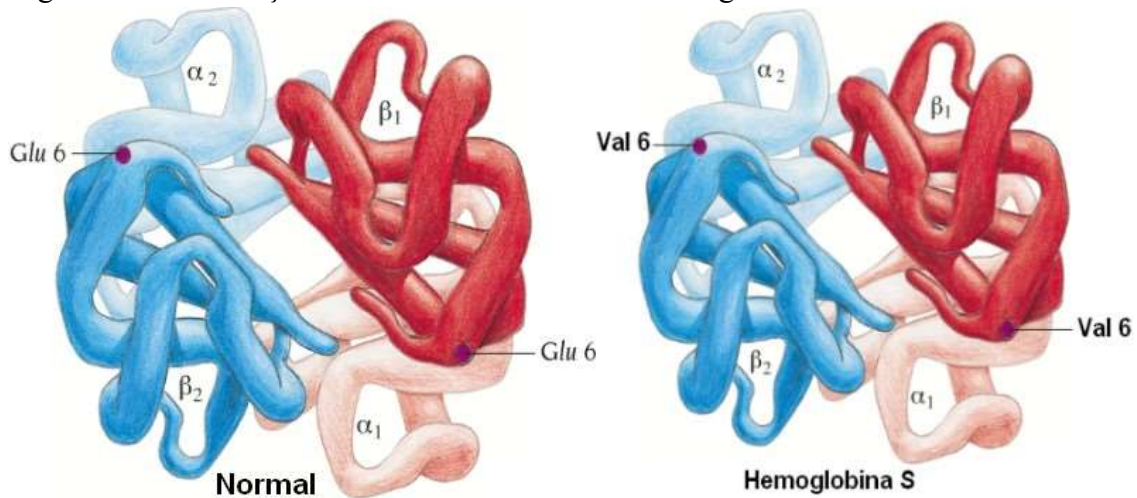
A mutação pontual na posição seis da cadeia beta resulta na substituição da adenina por timina, codificando assim uma valina em vez de um ácido glutâmico na cadeia da  $\beta$ -globina. Esta troca de um único aminoácido confere um grande impacto na estabilidade da molécula de Hb resultante e na função das hemácias. Dando origem, dessa forma, a uma nova Hb, a HbS, que quando em homozigose forma HbSS, definida dentre as doenças falciformes como a anemia falciforme (FIGURAS 2 e 3). (AZAR, WONG, 2017; SUNDD, GLADWIN, NOVELLI, 2018).

Figura 2 – Esquema da substituição do ácido glutâmico pela valina, originando a hemoglobina tipo S (HbS).



Nota: A anemia falciforme é caracterizada por uma mutação pontual que ocasiona uma troca das bases nitrogenadas adenina e timina, levando à substituição do aminoácido ácido glutâmico pelo aminoácido valina em uma das cadeias de hemoglobina, causando uma modificação estrutural na hemácia, que adquire forma de “foice” quando desoxigenada. Fonte: <https://cienciasergipe.com/2016/07/13/anemia-falciforme-vantajosa/>

Figura 3 – Modificação molecular na estrutura da hemoglobina.

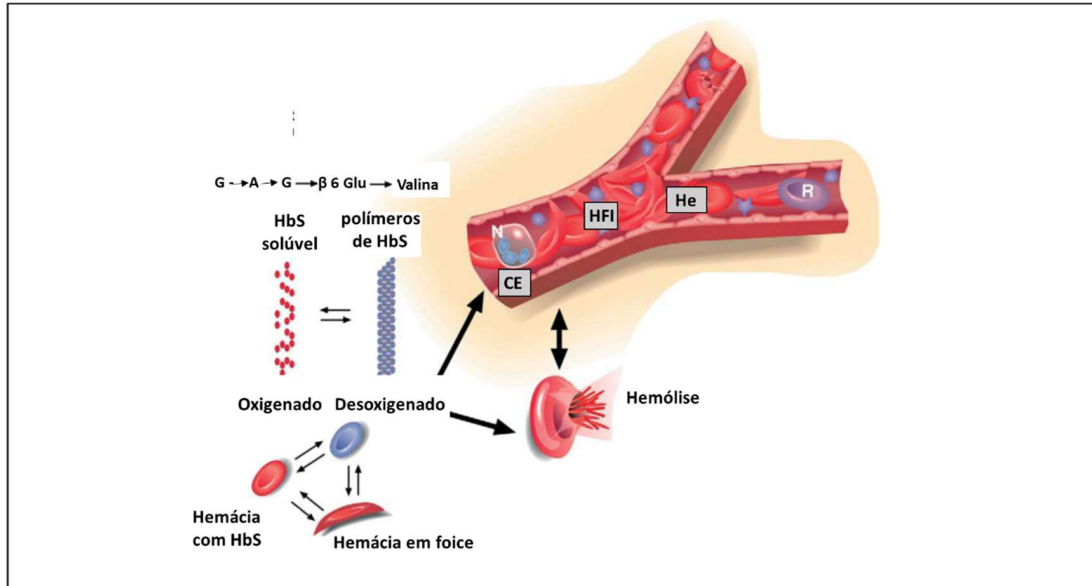


Nota: A mutação pontual da AF ocasiona uma simples troca do nucleotídeo adenina por timina, levando à substituição de um resíduo de ácido glutâmico hidrofílico por um resíduo de valina hidrofóbico na sexta posição na cadeia de β-globina, resultando em um tetrâmero de HbS mutado. Fonte: <http://www.teliga.net/2011/07/estrutura-e-funcao-da-hemoglobina.html>

Em estados de desoxigenação, a HbS pode formar fibras individuais ou agregadas que levam a rigidez e a forma em “foice” das hemácias. Enquanto que quando oxigenado, estes polímeros se desintegram. Dessa maneira, a concentração de oxigênio e de HbS desempenham um importante papel na formação e desintegração dos polímeros da HbS, assim como a associação da HbS com outras variantes da hemoglobina. A HbS desoxigenada mais prontamente polimeriza consigo mesma e muito menos com a HbA. Assim como, polimeriza com menor efetividade a HbF, que provavelmente deriva das quase 20 diferenças de aminoácidos superficiais entre as duas variantes de hemoglobina. A propensão à polimerização da HbS é suficiente para explicar a importância do diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com AF. Estudos em pacientes e modelos de ratos com AF relatam que o aumento do estresse oxidativo e o processo inflamatório crônico estão associados à sua fisiopatologia, e que micropartículas derivadas de eritrócitos iniciam uma cascata que ativa neutrófilos, monócitos e plaquetas, que secretam várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Ao mesmo tempo, a hemólise crônica libera grandes quantidades de hemoglobina livre, que promove o sequestro de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador. Citocinas solúveis, quimiocinas e baixos níveis de NO, então, potencializam a inflamação, a disfunção endotelial e, eventualmente, a lesão de

órgãos-alvo (FIGURA 4) (STEINBERG, 2006; GORDEUK, CASTRO, MACHADO, 2016; HAY, ATOYEBI, 2016).

Figura 4 – Fisiopatologia da doença falciforme.



Fonte: Adaptado de Steinberg, 2006. Legenda: CE (célula endotelial), HFI (Hemácia em foice irreversível), N (Neutrófilo), R (Reticulócito), He (Hemácias). Nota: A troca adenosina/timina no códon 6 do gene que codifica a b-hemoglobina no cromossomo 11 (b6 na figura) ocasiona a substituição do ácido glutâmico por valina. Esta mutação (Glu6Val) traz a polimerização da molécula de HbS quando desoxigenada. Os polímeros de HbS lesionam o eritrócito e levam a uma população heterogênea de células falciformes com citoesqueletos de membrana danificados, redução de cátions e conteúdo de água e distribuição alterada de lipídios de membrana. Agentes que reduzem o fluxo de cátions podem reduzir a densidade celular, diminuindo assim a tendência de polimerizar e aumentar a deformabilidade celular. Na circulação, as células falciformes interagem com o endotélio e outras células do sangue podendo causar vasooclusão. Alguns eritrócitos danificados hemolisam intravascularmente, liberando hemoglobina no plasma, que reduz o óxido nítrico e promove a vasoconstrição.

Desta forma, os pacientes com AF podem apresentar quadro clínico heterogêneo, que varia principalmente com o grau dos eventos de vaso-oclusão, da anemia hemolítica responsáveis pela alta morbidade e mortalidade. Quadros como acidente vascular cerebral (AVC), infartos e priapismo podem ocorrer devido a presença destas complicações e grande interferência na microcirculação devido também ao comprometimento do transporte de oxigênio pelas hemácias em todo o organismo (SONATI, COSTA, 2008).

#### 1.4. Quadro clínico e complicações na AF

O fenômeno da vaso-oclusão ocorre devido a múltiplos fatores que vão contribuir com a redução da luz do vaso, dificultando assim a microcirculação sanguínea. Com a desoxigenação a HbS se polimeriza alterando a forma e estrutura da hemácia, promovendo a inversão da fosfatidilserina (FS), que é uma molécula de adesão presente em maior quantidade na parte interna da membrana celular do que exposta na superfície de eritrócitos normais, aumentando assim a proporção da FS no eritrócito falciforme e elevando o potencial de adesão em cerca de três vezes que eritrócitos normais. A FS liga-se ao receptor da vitronectina do endotélio contribuindo para a adesão das hemácias e ativação da cascata da coagulação. Além disso, a hemólise propicia a liberação de substâncias que estimulam reações de inflamação, expondo receptores do vaso que são específicos para as plaquetas e leucócitos, resultando na agregação tanto plaquetária, como de leucócitos na região do endotélio. Paralelamente, ocorre também a agregação das hemácias em forma de “foice” que, juntamente com a plaquetas e leucócitos, vão reduzir ainda mais o espaço de circulação do sangue, resultando na vaso-obstrução. Clinicamente, os pacientes podem apresentar crises de dor, necrose da cabeça do fêmur, vasculopatia cutânea com o aparecimento de úlceras crônicas, sendo mais observadas sob forma de úlcera de membros inferiores de difícil tratamento, além de priapismo, casos de retinopias proliferativas, entre outros (SETTY, BETAL, 2008; ZEMPSKY et al., 2017; PIEL et al., 2017).

Os acidentes vasculares cerebrais (AVCs) são uma causa significativa de morbidade e mortalidade na AF, ocorrendo em 10 a 25% dos pacientes. O mesmo está associado aos eventos de vaso-oclusão, devido a isquemia na região cerebral. Alguns pacientes com AF desenvolvem infartos que não possuem sintomas, o que pode estar associado a deficiência de cognição e ao risco aumentado de AVC. O AVC isquêmico é mais comum em crianças de 0 a 5 anos de idade e acima de 15 anos, com alto índice de recorrência nos primeiros 2 anos após o evento, porém o AVC hemorrágico ocorre mais frequentemente em pacientes acima de 15 anos de idade. Logo torna-se necessário a realização do doppler transcraniano (DTC), que uma vez elevado é indicador de doença vascular e de risco aumentado de AVC, auxilia na detecção precoce de doentes em risco de virem a sofrer um AVC e monitoriza a evolução dos doentes que tiveram um AVC. Destaca-se que o DTC apresenta limitações, uma vez que o AVC ocorre em cerca de 19% das crianças com DTC normal. Por outro lado, cerca de 60% dos indivíduos considerados de alto risco pelo DTC não terão AVC. O monitoramento também pode incluir os exames de



ressonância magnética (RMN) e a angio-RM. Alguns fatores de risco laboratoriais, como a baixa concentração de hemoglobina e a reticulocitose, tem sido sugerido como métodos preditivos de AVC aliados ao rastreamento com o DTC (BRUGNARA, 2018). As crises de dor são as causas mais frequentes de morbidade na AF, como consequência também da vasooclusão e da isquemia tecidual.

O acometimento pulmonar na AF pode ser de natureza aguda ou crônica. As complicações agudas são representadas pela síndrome torácica aguda (STA), tromboembolismo pulmonar e pela hiper-reatividade brônquica. As complicações crônicas levam a alterações da função pulmonar e à hipertensão pulmonar (HP). A STA e a HP estão entre as causas de maior morbidade na AF. A STA acomete toda a faixa etária na AF, com 12,8 eventos a cada cem paciente/ano. A STA consiste em uma combinação de sinais e sintomas como dispnéia, dor torácica, febre, tosse e infiltrado pulmonar. É diagnosticado pelo aparecimento de infiltrado pulmonar na radiografia do tórax. A fisiopatologia da STA vem sendo amplamente estudada, no entanto vale ressaltar que a fisiologia pulmonar favorece o sequestro de células densas, sendo a circulação pulmonar um filtro mais eficiente que a circulação sistêmica. Vale ressaltar que diferente da circulação sistêmica, responde à hipóxia com vasoconstrição. Na STA existe aumento da endotelina 1 e redução do NO. Estudos reportam que a diminuição da biodisponibilidade do NO ocorre pela redução da L-arginina, substrato do NO, que se encontra frequentemente depletado mesmo em pacientes em estado basal, diminuição da NO-sintetase (NOS), no endotélio e pela liberação de Hb livre que consome o NO. O uso da L-arginina pode contribuir na prevenção de complicações pulmonares na AF (ADISA et al., 2017; FAROOQ, TESTAI, 2019).

O priapismo consiste de ereção peniana prolongada e dolorosa, não acompanhada de desejo ou estímulo sexual. O mesmo trata-se de uma complicação relativamente frequente na AF. Ainda não se sabe ao certo o exato mecanismo que causa o priapismo, mas já se sabe que durante a ereção há o relaxamento da musculatura lisa das artérias do corpo cavernoso, resultando em um aumento de fluxo aferente e redução do fluxo do eferente, até que uma crescente pressão interna do corpo cavernoso e depois o fluxo aferente não funciona mais. Este mecanismo pode levar a uma hipóxia, aumentando a pressão do CO<sub>2</sub>. Assim, novas hemácias vão se falcizar com circulação dificultada e priapismo se mantém, podendo progredir para edema tissular, necrose muscular e reação inflamatória, levando a fibrose e disfunção erétil (BRODERICK, 2012; KATO, 2012).

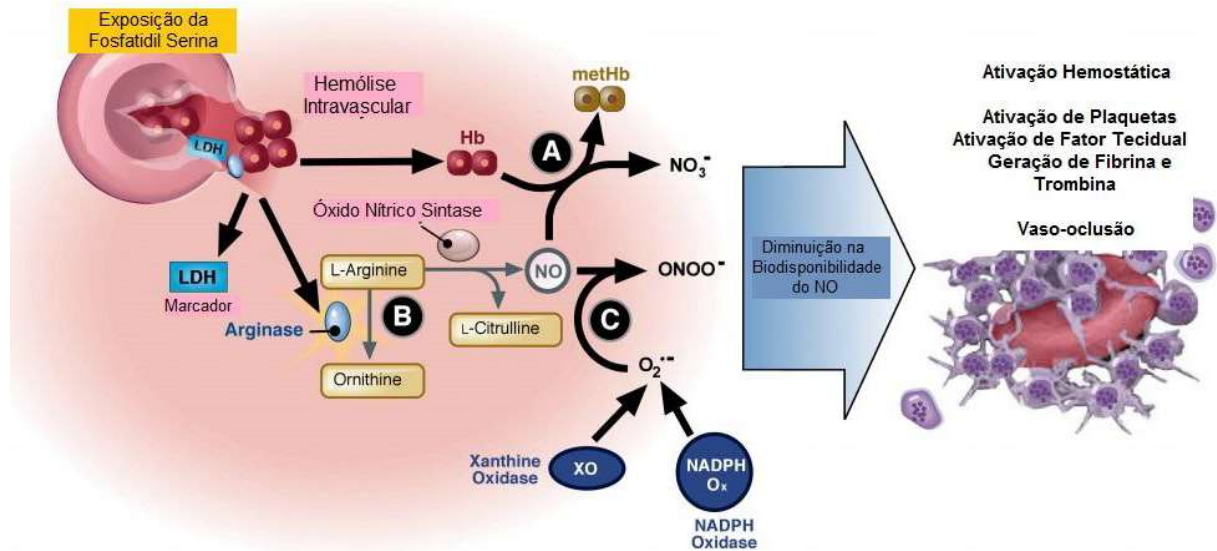
Casos de nefropatia também pode ocorrer na AF, certamente devido a anemia crônica, aumento do fluxo sanguíneo, além dos eventos que resultam na vasooclusão no parênquima. Com isso, com o passar dos anos, pode haver o aumento da hipertrofia glomerular, podendo ser observadas em alterações no exame histopatológico, tais como a hiperplasticidade e lobulação dos tufo glomerulares (NAIK et al., 2017; AEDDULA, BARADHI, 2018).

As infecções são as complicações mais frequentes na AF. Dentre os fatores que contribuem para as infecções recorrentes temos a auto-esplenectomia, e a asplenia funcional. Estudos tem demonstrado que pacientes com AF apresentam disfunção esplênica nos primeiros meses, ainda na infância, resultando na dificuldade de opsonização das bactérias encapsuladas. Por isto, em pacientes que estão na primeira infância deve haver atenção redobrada para casos de septicemia e meningite por *Streptococcus pneumoniae* e por outros microorganismos encapsulados como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*. Outros mecanismos que podem interferir na susceptibilidade à infecção seriam a deficiência na via alternativa do complemento, de opsoninas séricas e alterações funcionais nos leucócitos, além da dificuldade na microcirculação, impedindo que a resposta imunológica eficiente do paciente possa auxiliar no combate os microorganismos infecciosos (BALLAS, 2018; PICCIN et al., 2019; ZHONG, YAZDANBAKHSI, 2018).

### 1.5. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um potente vasodilatador produzido no endotélio vascular pela enzima endotelial óxido nítrico sintase (eNOS) pela conversão oxigênio dependente de arginina para citrulina. O NO pode se difundir para o músculo liso adjacente, e se liga à enzima solúvel guanilato sintase. Essa ativação da enzima converte guanosina trifosfato (GTP) à guanosina monofostato cíclico (cGMP) e ativa as proteínas quinases dependentes de cGMP, que agem no sequestro do cálcio celular, produzindo relaxamento muscular e consequentemente a vasodilatação (ANTWI-BOASIAKO, CAMPBELL, 2018).

Figura 5 - Mecanismos da anemia hemolítica na redução da biodisponibilidade do NO.



Fonte: Adaptado de Vilas Boas (2010). A hemólise libera hemoglobina (Hb) plasmática livre de células e arginase 1 no plasma, que catabolizam o óxido nítrico (NO) e a L-arginina. Ativação de oxidases vasculares - como a xantina oxidase (XO), a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e a sintase do óxido nítrico endotelial desacoplada (eNOS) - geram superóxido, que elimina o NO. Anemia hemolítica e redução da biodisponibilidade de NO estão associadas a complicações clínicas vasculopáticas em pacientes com doença falciforme (DF). LDH = lactato desidrogenase; metHb = metemoglobina;  $\text{NO}_3^-$  = nitrato;  $\text{O}_2^{\bullet-}$  = oxigênio; ONOO = peroxinitrito.

### 1.5.1. Ações do óxido nítrico

#### 1.5.1.1. Manutenção do tônus vascular

A liberação de pequenas quantidades de NO de forma contínua ocorre quando aumenta o atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial do vaso, também chamado de “*shear-stress*”, o que gera uma pequena vasodilatação. A pressão sanguínea e o fluxo pulsátil podem auxiliar na liberação de NO em condições fisiológicas (ALMEIDA et al., 2015).

#### **1.5.1.2. Agregação plaquetária**

A prevenção de agregação de plaquetas ocorre através da elevação da GMPc e da diminuição do cálcio intraplaquetário (CONRAN, TORRES, 2019)

#### **1.5.1.3. Inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular**

A adesão de neutrófilos ao endotélio vascular é um importante mecanismo que pode resultar na aterosclerose. Ocorre devido a expressão de moléculas de adesão na superfície da célula endotelial, como a molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1), a molécula de adesão intercelular (ICAM), a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), a selectina e citocinas. A expressão é modulada de acordo com o aumento do estresse oxidativo que ocorre na célula endotelial. Com isso, doadores de NO demonstram nos estudos sua capacidade de inibir a adesão de monócitos e neutrófilos e camada endotelial (KIM-SHAPIRO, GLADWIN, 2018).

#### **1.5.1.4. Efeito antiproliferativo**

A proliferação das células da camada muscular do vaso pode ocasionar estreitamento vascular. Um dos responsáveis por este estímulo proliferativo é o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Resultando em células da camada muscular alteradas, podendo levar até mesmo a perda da capacidade de contração. Com a presença do NO produzido acredita-se que haja a inibição desta atividade proliferativa da camada muscular, modificando para um mecanismo de atividade antiproliferativa, que, por enquanto, os estudos ainda não compreendem bem como ocorre (DAIBER et al., 2019).

#### **1.5.1.5. Efeito antioxidativo**

O estresse oxidativo do vaso contribui para as doenças tromboembólicas. O NO produzido pela e-NOS induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O<sub>2</sub><sup>-</sup> disponível e, conseqüentemente, a produção de ONOO<sup>-</sup>. O NO também induz a síntese de ferritina, que se liga a íons ferro livres e previne a

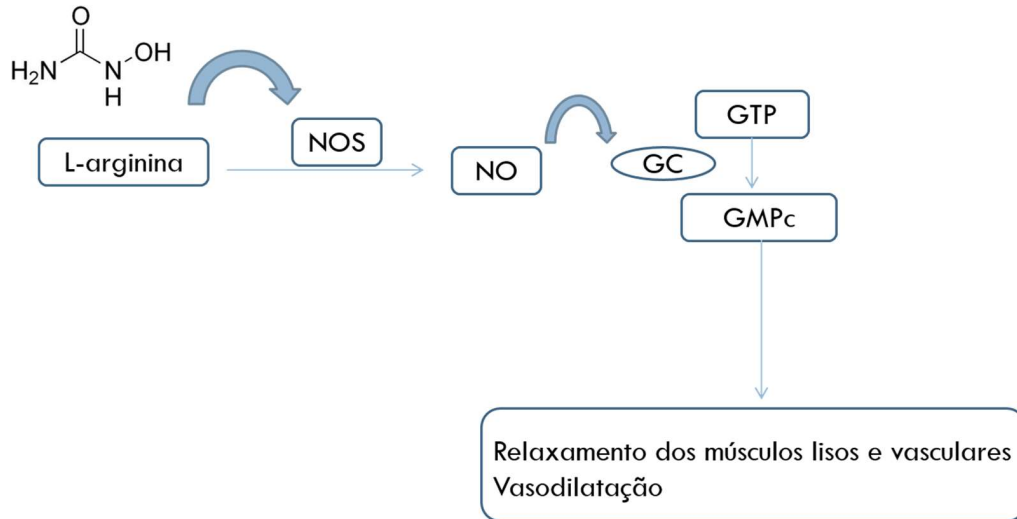
geração de  $O_2^-$ . Na presença da placa de aterosclerose, os macrófagos ativados produzem  $O_2^-$ , expressam i-NOS e produzem NO. Desta forma, são produzidos ONOO<sup>-</sup> e OH<sup>·</sup>, comprometendo a integridade tissular, resultando na ativação da coagulação e contribuindo para a obstrução do vaso (MORRIS, 2014).

## 1.6. Arginina

A arginina é um aminoácido, que é substrato para a síntese do NO. É sabidamente reduzido em pacientes com AF. O aumento do consumo do NO pela Hb livre no plasma e pelas EROS traz esta redução da biodisponibilidade de NO, que é ainda mais exacerbado pela diminuição da disponibilidade do substrato da eNOS, a arginina. Esse estado de resistência ao NO é acompanhado pela regulação compensatória da síntese da eNOS e outros vasodilatadores independentes do NO. Em condições de concentrações baixas de arginina, a enzima eNOS é desacoplada nas suas subunidades, produzindo EROS ao invés de NO, reduzindo ainda mais a biodisponibilidade de NO e aumentando o estresse oxidativo em pacientes com AF (BAKSHI, MORRIS, 2016).

A arginina é substrato para produção de NO, que é um cofator da enzima guanilato ciclase (GC), responsável pela reação que faz a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanina cíclica (GMPc), ocasionando o relaxamento dos músculos lisos e vasculares e, conseqüentemente, a vasodilatação. Este seria o mecanismo que pode auxiliar na atividade coadjuvante da arginina no tratamento de pacientes com AF que utilizam HU, visto que, com o aumento da biodisponibilidade de arginina circulante, que se encontra de forma reduzida nos pacientes com AF, há a possibilidade de suprir a demanda para que haja a reação de formação do NO, e também da formação de GMPc, melhorando então a microcirculação devido a vasodilatação. Assim, haveria a redução de quadros de dor, facilitaria a circulação e evitaria complicações mais importantes, como o AVC e úlceras de perna de difícil tratamento, e que podem ser porta de entrada para infecções importantes. Sendo um objetivo também a redução de quadros de internação destes pacientes, facilitando sua vida pessoal e profissional (MORRIS, 2014).

Figura 6 – Síntese de NO a partir da L-arginina, que age como substrato para a reação que resulta em vasodilatação.



Fonte: Autor, 2018. NOS: enzima óxido nítrico sintetase, NO: óxido nítrico, GC: guanilato ciclase, GTP: trifosfato de guanosina, GMPc: monofosfato de guanina cíclica.

A associação HU e L-arginina é descrita em estudos que demonstram que a HU aumenta a utilização da arginina para a produção do NO circulante, reduzindo quadros de dor e internações. Uma desregulação do metabolismo da arginina contribui para a disfunção endotelial nos pacientes com anemia falciforme, e está fortemente associada à mortalidade prospectiva do paciente. O mecanismo responsável por este transtorno metabólico é o aumento da renovação da arginina, assim como a atividade aumentada da arginase plasmática. Novos tratamentos destinados a melhorar a biodisponibilidade de arginina e NO através da inibição da arginase, supressão da taxa hemolítica, suplementação de arginina oral ou uso de doadores de NO representam possíveis estratégias terapêuticas para complicações de distúrbios hemolíticos (MORRIS et al., 2013; ELIAS et al., 2013).

### 1.7. Arginase

Arginase é uma enzima que contém manganês, e que catalisa a conversão de arginina em uréia e ornitina. Duas isoformas da arginase estão presentes na maioria dos mamíferos, que diferem na distribuição tecidual e na localização subcelular. A arginase I é uma proteína citoplasmática predominantemente expressa no fígado, onde catalisa a quinta e última etapa do ciclo da uréia. A Arginase II é uma proteína mitocondrial com distribuição tecidual mais ampla,

cuja função pode incluir o metabolismo de óxido nítrico e poliamina. A redução da atividade ou expressão da Arginase I resulta na hiperarginemia do transtorno autossômico recessivo. O aumento da atividade da arginase sérica está implicado na lesão hepática e em doenças como câncer. A arginase também participa de múltiplas reações inflamatórias no sistema imunológico (BAKSHI, MORRIS, 2016).

Altos níveis de arginase são encontrados no plasma de indivíduos com anemias hemolíticas crônicas, como é o caso da anemia falciforme. Níveis circulantes de arginina são significativamente reduzidos em pacientes com AF. Embora isso seja consistente com o aumento da atividade da arginase plasmática nesses indivíduos, a possibilidade de que a expressão elevada de arginase em tecidos de pacientes com AF também pode desempenhar um papel no catabolismo da arginina (MORRIS JR, 2012).

É importante ressaltar que as razões entre as concentrações plasmáticas de arginina e seus metabólitos se mostraram mais úteis como biomarcadores em alguns distúrbios do que as concentrações plasmáticas de arginina isoladamente. Baixos valores da razão arginina plasmática / (ornitina plasmática + citrulina), denominada “taxa global de biodisponibilidade de arginina” (GABR), representam um fator de risco independente para morbidade e mortalidade em pacientes com doença falciforme (VILAS-BOAS et al., 2010; MOREIRA et al., 2015).

A arginina tem sido utilizada em poucos trabalhos até então como coadjuvante no tratamento de anemia falciforme, em tratamento oral, tópico e inalatório, demonstrando através de indicadores e marcadores biológicos a melhora dos pacientes. Ao elevar os níveis de óxido nítrico quando a arginina foi administrada por via oral, e redução de uso de opióides em ensaio realizado utilizando arginina inalatória em crianças com AF atendidas em emergência com crises de dor, assim como reduzindo úlceras de pernas em pacientes com AF utilizando a via tópica de arginina. Há também a possibilidade de redução da dose de HU, visto que este medicamento é um indutor de apoptose e comprovadamente pode causar instabilidade genômica em pacientes que já possuem a AF (LITTLE et al., 2009; MCMAHON et al 2010; SULLIVAN et al., 2010; COX et al, 2011; ELIAS et al., 2013; MORRIS et al., 2013).

## 1.8. Tratamento da anemia falciforme no Brasil

A HU consiste no avanço mais importante no tratamento da AF. Vários estudos confirmam a eficácia da HU tanto em crianças como em adultos com AF. A HU promove a diminuição dos episódios de dor intensa, hospitalizações, e número de transfusões. Dentre os mecanismos está o aumento na concentração da HbF e diminuição na concentração da HbS, logo reduzindo tanto os eventos de vaso-oclusão como de hemólise. A HU também atua reduzindo o processo inflamatório como a redução de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os mecanismos ainda não estão totalmente elucidados mas estudo tem atestado a eficácia da HU além do aumento da HbF, principal modulador clínico na AF. A HU promove diminuição do número dos neutrófilos, hidratação eritrocitária, redução da expressão de moléculas de adesão dos eritrócitos, aumento da síntese e biodisponibilidade de óxido nítrico pela ativação da guanilil ciclase e consequente aumento da GMP cíclico intraeritrocitária e endotelial. A HU também age sobre a membrana dos eritrócitos e plaquetas, reduzindo a exposição da FSa, principal determinante da adesão eritrocitária alterada na AF, com diminuição da viscosidade sanguínea e vasodilatação, contribuindo para a diminuição dos fenômenos inflamatórios e vaso-oclusivos (BAKSHI, MORRIS, 2016).

Este medicamento possui citotoxicidade conhecida, capaz de causar dano no DNA, porém sua atividade ao elevar os níveis de HbF e reduzir a polimerização, e consequentemente aumentando a concentração de HbS, traz benefícios clínicos que amenizam complicações e reduz casos de óbitos neste grupo de pacientes. Normalmente, há a necessidade de tomar durante toda a vida, e dependendo do haplótipo ou clínica poderá haver a necessidade de aumentar as doses administradas diariamente para normalizar o estado clínico do paciente, para que ele retorne assim para o estado basal e tenha maior qualidade de vida e atividades de trabalho, estudo e até mesmo social (SANTOS et al., 2012; SINGH et al., 2016).

Como citado anteriormente, alguns trabalhos trazem resultados que demonstraram o potencial da atividade da arginina como coadjuvante no tratamento de AF, monitorado pelo aumento de óxido nítrico em pacientes adultos com AF, ou até mesmo reduzindo a dose de medicamentos que diminuem a dor em crianças com AF atendidas em emergência de um hospital. Outro trabalho realizado pelo nosso grupo, trouxe dados diferenciando um grupo de pacientes adultos com AF em estado basal que utilizava HU e outro que utilizou HU + arginina, com o resultado de aumento do óxido nítrico no grupo que utilizou HU + arginina. Com isso,



este trabalho é o primeiro ensaio duplo cego placebo realizado em adultos com AF no Brasil, que foram acompanhados durante os 4 meses, e que o quadro de dor foi monitorado através da frequência de dor relatada pelos pacientes, sempre a cada dois meses em ambos os grupos placebo e estudo, além de outros parâmetros hematológicos e níveis de arginase (LITTLE et al., 2009; MCMAHON et al 2010; SULLIVAN et al., 2010; COX et al, 2011; ELIAS et al., 2013; MORRIS et al., 2013).

Este trabalho traz a possibilidade de utilizar a arginina como coadjuvante no tratamento de AF, levando a um possível medicamento em que se utilize a associação de HU + arginina para reduzir as doses utilizadas de HU, facilitar a administração utilizando apenas um comprimido para ambos, e buscando melhorar a qualidade de vida dos pacientes, reduzindo a possibilidade de haver complicações de microcirculação e dor, além de AVC, dentre outras que podem levar a morte do paciente com AF. Dessa maneira, os pacientes com AF podem trabalhar, estudar, possuir uma vida social, sem interrupções advindas de quadro de dor e complicações, melhorando até mesmo a questão de autoestima e psicológica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar o uso da L-arginina como um protocolo terapêutico coadjuvante com a hidroxiuréia em pacientes adultos com anemia falciforme acompanhados no serviço do Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE), utilizando associação da hidroxiuréia com L-arginina e placebo.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar o perfil sócio demográfico dos pacientes atendidos no Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE);
- Avaliar o perfil hematológico, de reticulócitos, níveis de NO e a concentração da HbF, HbS a cada dois meses de tratamento nos grupos placebo e estudo;
- Determinar o perfil clínico (frequência de dor, número de hospitalizações, frequência de infecções) dos pacientes, a cada dois meses de tratamento nos grupos placebo e estudo;
- Avaliar a dosagem sérica de arginase nos grupos placebo e estudo.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Considerações Éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 1.292.517 (ANEXO A).

#### **3.2. Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo clínico randomizado duplo cego placebo para estudo da eficácia da L-arginina como coadjuvante no tratamento de AF, que foi desenvolvido seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, contidas na Resolução de nº 466 / 2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Não foram necessárias as etapas preconizadas para experimentação de novos medicamentos, uma vez que este tratamento concomitante se encontra em conformidade com dados da literatura e com a prática já exercida em Centros Internacionais (MORRIS et al., 2003; LITTLE et al., 2009; BALIGA et al., 2010; SULIVAN et al., 2010; SCAVELLA et al., 2010).

#### **3.3. Casuística**

Foram selecionados 50 pacientes com AF, em uso de 500mg/dia ou mais de HU, após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em acompanhamento no Hemocentro do Estado de Ceará (HEMOCE).

Os pacientes foram estratificados utilizando randomização em software adequado (Graphpad Prism 7.0) em dois grupos, sendo:

- Grupo estudo – pacientes com AF em uso de HU (Hydrea® maior ou igual a 500mg/dia) associada com L-arginina (L-arginina 500 mg – 1 vez ao dia).
- Grupo placebo – pacientes com AF em uso de HU (Hydrea® maior ou igual a 500mg/dia) associada com placebo (amido) (FIGURA 01).

Figura 07 - Casuística dos pacientes, organizados em dois grupos, estudo e placebo.



Fonte: Elaborado pela própria autora, 2019.

A dose da HU a partir de 500mg/dia foi selecionada por representar a dosagem utilizada pelos pacientes tratados com HU, resultando assim em resultados com maior confiabilidade. Enquanto que a dose de 500mg/dia da L-arginina foi definida utilizando o parâmetro de trabalho realizado anteriormente pelo mesmo grupo de estudo, pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) da Universidade Federal do Ceará (ELIAS et al., 2013).

### 3.4. Locais de Estudo

O ensaio foi realizado no Ambulatório de Hemoglobinopatias do HEMOCE e no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) da Universidade Federal do Ceará.

### 3.5. Seleção da Amostra

#### 3.5.1. Critérios de Inclusão:

- Pacientes adultos com AF em uso HU ( $\geq 500$  mg/dia);
- Pacientes que aceitaram assinar o TCLE.

### **3.5.2. Critérios de Exclusão:**

- Aqueles que tenham realizado terapêutica transfusional nos últimos três meses;
- Pacientes em uso de quelante de ferro e de vitaminas antioxidantes;
- Pacientes tabagistas e etilistas, gestantes, com diabetes mellitus e/ou com algum quadro de insuficiência renal ou hepática;

### **3.6. Cálculo do tamanho da amostra**

O HEMOCE é referência em doenças hematológicas no Ceará, onde são atendidos aproximadamente 100 pacientes com AF em uso ou não de HU, representantes de todo Ceará. Desta forma o nosso “N” amostral representa bem os pacientes atendidos no Estado.

### **3.7. Seleção dos pacientes e intervenção**

Os pacientes foram selecionados por randomização no Graphpad Prism 7.0, divididos em dois grupos (Grupo estudo e Grupo placebo). Aos pacientes do grupo estudo (HU + L-arginina), após assinar o TCLE, foi prescrito pelo médico Hematologista L-arginina 500mg (1 comprimido por dia durante 4 meses) e foi entregue gratuitamente ao paciente, orientando a ingerir este comprimido juntamente com Hydrea®. Enquanto que os pacientes selecionados para o Grupo placebo (HU + placebo), após a assinatura do TCLE, foi prescrito o placebo (1 comprimido 1 vez ao dia por 4 meses), com as mesmas orientações.

### **3.8. Coleta do material biológico**

A coleta de sangue venoso foi realizada no momento de retorno do paciente a consulta, utilizando dois tubos, um com heparina e outro com EDTA para as dosagens citadas abaixo, nos períodos de 0, 2 e 4 meses de uso concomitante de HU e L-arginina ou HU e placebo.

### 3.9. Cápsulas utilizadas no ensaio clínico

A hidroxiuréia é disponibilizada pelo HEMOCE. As cápsulas de L-arginina e placebo foram produzidas e caracterizadas em parceria com farmácia de manipulação (ProPhormula), utilizando todas as normas e controle de qualidade devidamente documentados. O peso médio das cápsulas foi de 500,70mg ( $\pm$  0,55), sendo confeccionadas de forma igual, mantendo o ensaio placebo e cego.

### 3.10. Dados clínicos

As informações sobre o uso da HU, idade, sexo e dados clínicos foram obtidas de prontuários médicos. No presente estudo foram construídas escalas de dor e de internação (Tabelas 1 e 2) para uso durante a realização do ensaio clínico.

Tabela 1 - Escala de frequência de dor

<b>DOR</b>	<b>Escala</b>
<b>Nunca</b>	0
<b>Anual</b>	1
<b>Mensal</b>	2
<b>Semanal</b>	3
<b>Diária</b>	4

Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2018.  
Nota: Escala de dor sinalizando a frequência em que os pacientes sentem dor

Tabela 2 - Escala de frequência de internação

<b>Internação</b>	<b>Escala</b>
<b>Nunca</b>	0
<b>Há 5 anos</b>	1
<b>Há 3 anos</b>	2
<b>No ano da realização do ensaio clínico</b>	3

Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2018.  
Nota: Escala de dor sinalizando a frequência de internação

### 3.11. Exames laboratoriais

#### 3.11.1. Hemograma completo

Os dados de hemograma completo dos pacientes foram adquiridos a partir do processamento das amostras realizadas e cadastradas no sistema utilizado no HEMOCE, avaliados a cada dois meses para catalogar os dados de cada paciente participante do ensaio

clínico. O acompanhamento dos pacientes com AF é feito normalmente analisando dados do hemograma, sendo realizado a cada retorno do paciente.

### **3.11.2. Dosagem de Hemoglobina Fetal**

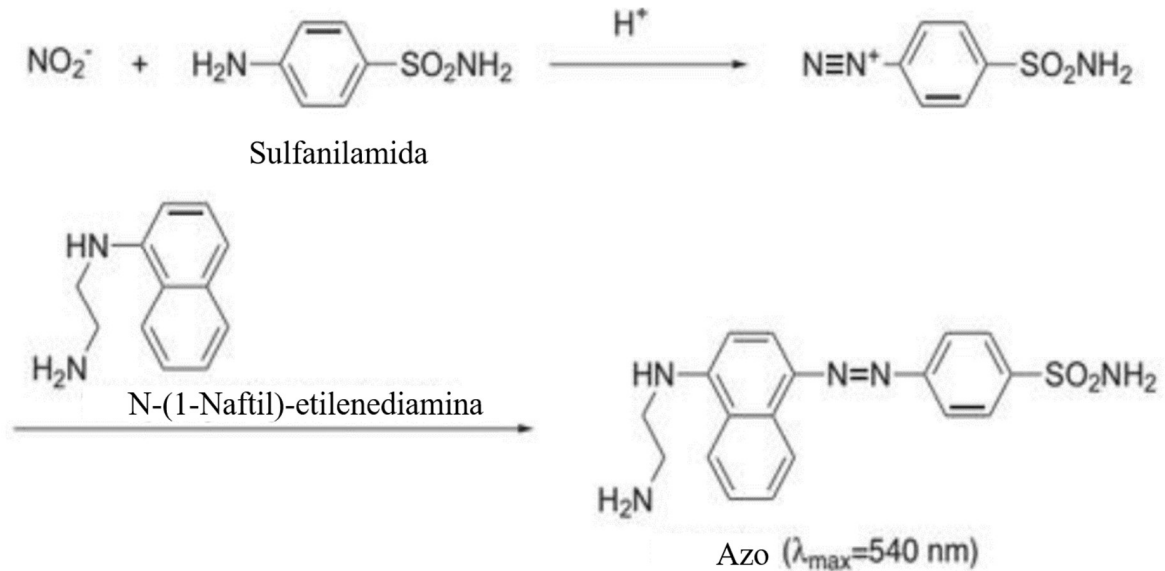
A determinação da concentração de HbF foi realizada através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando Kit de Hemoglobinas Variantes, (Bio-rad®). Esta dosagem foi realizada no HEMOCE, e os dados de cada paciente, em cada momento do ensaio clínico foram acompanhados e catalogados, para posterior análise.

### **3.11.3. Níveis de nitrito**

Os níveis de nitritos foram realizados através da utilização de kit específico, e leitura em ELISA. Para determinação da produção endógena de NO foi realizada a quantificação dos ânions nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), produtos terminais da oxidação do NO. A concentração de nitrito/nitrato foi determinada utilizando kit comercial *Nitrite Nitrate Colormetric method* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

Inicialmente, o ensaio se dá pela conversão das concentrações de nitrato para nitrito através da enzima nitrato redutase. Em seguida, adiciona-se a sulfanilamida (Griss 1) e o N-(1-Naftil)-etilenediamina (Griss 2), promovendo a formação de um componente “azo” caracterizado pela coloração roxa, este último é quantificado através do comprimento de onda de 540-550 nm com auxílio de um espectrofotômetro (Figura 08).

Figura 8 – Reação de Griss para análise de nitrito e nitrato.



Fonte: Adaptado de Mária Kovács et al, 2015.

### 3.11.3.1. Preparo de soluções padrões

Todas as amostras e padrões foram executadas em duplicata. Para obter os padrões para detecção colorimétrica de  $\text{NO}_2^-$ , foi adicionado 0, 20, 40 e 80  $\mu\text{L}$  de 100  $\mu\text{M}$  (0,1 nmole /  $\mu\text{L}$ ) de solução padrão  $\text{NaNO}_2$  em uma placa de 96 poços gerando padrões 0 (branco), 2, 4 e 8 nmole / poço. Foi adicionado também a solução tampão a cada poço para obter o volume de 100  $\mu\text{L}$ . Enquanto que, para os padrões para detecção colorimétrica de  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ , adiciona-se 0, 20, 40 e 80  $\mu\text{L}$  de 100  $\mu\text{M}$  (0,1 nmole /  $\mu\text{L}$ ) de solução padrão  $\text{NaNO}_3$  em uma placa de 96 poços gerando padrões 0 (branco), 2, 4 e 8 nmole / poço. Em seguida, se adiciona a solução tampão a cada poço até o volume ser de 80  $\mu\text{L}$ .

### 3.11.3.2 Preparo de amostras

Para a preparação de amostra, centrifuga-se plasma em um Amicon Ultra-4 Unidade de filtração centrífuga com membrana Ultracel-10 (7000 xg, 4 ° C, 20 minutos) para remover a hemoglobina e proteínas. Deve recolher o sobrenadante. Adicionamos 1–80  $\mu\text{L}$  de amostras em quatro poços de placa de 96 poços. Dois poços serão utilizados para o detectar o  $\text{NO}_2^-$  e o outro



para o  $[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]$ . Adicionamos solução tampão para as amostras apresentassem volumes finais de 100  $\mu\text{L}$  para detecção de  $\text{NO}_2^-$  e 80  $\mu\text{L}$  para  $[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]$ , respectivamente.

### 3.11.3.3 Reação do Ensaio

Foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  da solução de nitrato redutase e 10  $\mu\text{L}$  da solução de cofactos enzimáticos para os poços de amostra e padrão para detectar  $[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]$ . Utilizando um agitador horizontal para homogeneizar, pipetamos e incubamos a placa a 25°C durante duas horas. Em seguida, acrescenta-se 50  $\mu\text{L}$  de Reagente Griess A a todos os poços. Foi homogeneizada com o auxílio de um agitador horizontal, pipetada e incubada a placa a 25°C durante cinco minutos. Adicione 50  $\mu\text{L}$  de Reagente Griess B a todos os poços. Foi homogeneizada usando um agitador horizontal, pipetada e incubada a placa a 25°C durante dez minutos. A medição da absorbância foi realizada a 540 nm (A540) em uma leitora de microplacas.

### 3.11.3.4 Cálculos do resultado

Após corrigir o dado da leitora, deve subtrair pelo valor do resultado do branco em todas as leituras de amostras dos pacientes.

Concentração de nitrito

$$A_{\text{NO}_2^-} / V_{\text{NO}_2^-} = C_{\text{NO}_2^-}$$

$A_{\text{NO}_2^-}$  = Quantidade de nitrito no poço da amostra (nmole) da curva padrão de nitrito

$V_{\text{NO}_2^-}$  = Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ ) adicionado ao poço

$C_{\text{NO}_2^-}$  = Concentração de nitrito na amostra

Peso molecular de nitrito: 46,01 g / mole

### 3.11.3.4.2 Concentração de nitrato mais nitrito

$$A_{[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]} / V_{[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]} = C_{[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]}$$

Onde:

$A_{[\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-]}$  = Quantidade de nitrato mais nitrito na amostra (nmole) da curva padrão

$V [NO_3^- + NO_2^-] =$  Volume de amostra ( $\mu L$ ) adicionado ao poço

$C [NO_3^- + NO_2^-] =$  Concentração de nitrato mais nitrito em amostra

Concentração de nitrato

$C_{NO_3^-} = C [NO_3^- + NO_2^-] - C_{NO_2^-}$

Peso molecular do nitrato: 62,01 g / mole

#### 3.11.4. Níveis de arginase

Os níveis de arginase foram detectados através de kit específico *Arginase Activity Assay Kit* (MAK112), fornecida pela Sigma Aldrich®. O kit de ensaio de atividade da Arginase mede a atividade da arginase nas amostras de soro. Neste ensaio, arginase catalisa a conversão de arginina em ureia e ornitina. A uréia produzida reage especificamente com o reagente de desenvolvimento de cor para gerar um produto colorido proporcional à atividade da arginase presente. Uma unidade de arginase é a quantidade de enzima que irá converter 1,0  $\mu$ mole de L-arginina para ornitina e uréia por minuto a pH 9,5 e 37° C. Este kit tem um limite de detecção de 0.3 unidades / L para a arginase de 2 horas reação em um formato de 96 poços.

##### 3.11.4.1 Preparo da amostra

Devido a estas amostras terem uréia, deve-se utilizar filtro de corte de peso molecular de 10 kDa. Após pipetar 100  $\mu$  L de uma amostra no filtro, diluir com água a 500  $\mu$  L. Centrifugar as amostras a 14.000  $\times$  g durante 30 minutos. Verificando o nível de amostra, que deve ser inferior a 50  $\mu$  L. Adicionar água até a alíquota de 500  $\mu$ L e repetir a centrifugação, com mesmo tempo. Decantar a amostra concentrada e medir o volume final com uma pipeta.

##### 3.11.4.2 Padrão de Ureia

Adicionar 50  $\mu$  L de solução de trabalho padrão 1 mM e 50  $\mu$  L de água nos poços de Placa de 96 poços.

### 3.11.4.3 Reação de Ensaio

Prepare o Tampão Substrato 5 × de acordo. 10 μ L do Tampão Substrato 5 × é necessário para cada amostra e amostra bem em branco. Tabela 1. 5 × tampão de substrato Reagente Volume Tampão de Arginina 8 μ L Mn Solution 2 μ L 2. Adicione 10 μ L do Tampão Substrato 5 × a cada um dos poços de amostra. Não adicione nos poços em branco da amostra. Misture bem usando um agitador horizontal ou pipetando. Incubar a placa por 2 horas a 37 ° C. Cobrir a placa durante a incubação. 3. Prepare o reagente de uréia de acordo com o esquema Tabela 2. 200 μ L do reagente de uréia é necessário para cada poço (padrão de ureia, água, amostra e amostras de poços vazios). Mesa 2. Reagente de Uréia Reagente Volume Reagente A 100 μ L Reagente B 100 μ L 4. Para parar a reação da arginase, adicione 200 μ L do Reagente de Uréia preparado para cada poço (Uréia Padrão, água, amostra e amostras de poços em branco). Em seguida, adicione 10 μ L do tampão de substrato 5 × as amostras de poços vazios. Toque na placa para misturar. Incubar placa durante 60 minutos à temperatura ambiente. Nota: Para algumas amostras, a adição da Ureia Reagente pode causar turbidez. Se isso ocorrer, transfira amostra para um microtubo e centrifugar por 5 minutos a 13.000 × g . Transferir o sobrenadante de volta ao prato e leia a absorbância. 5. Meça a absorbância a 430 nm (A 430).

### 3.11.4.4 Cálculos

A atividade da arginase de uma amostra pode ser determinada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade} = \frac{(A 430) \text{ amostra} - (A 430) \text{ em branco} \times (1 \text{ mM} \times 50 \times 10^3)}{(A 430) \text{ padrão} - (A 430) \text{ água} (V \times T)}$$

T = tempo de reação em minutos

V = volume da amostra ( μL ) adicionado ao poço (1–40 μL )

1 mM = concentração do padrão de uréia

50 = volume de reação ( μL )

$10^3 = \text{mM}$  a u factor de conversão μM

### **3.12 Descarte do material biológico**

O descarte do material biológico será realizado segundo a resolução da diretoria colegiada – RDC 222, de 7 de dezembro de 2018 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

### **3.13 Análises Estatísticas**

Foi realizada mediante a utilização do programa estatístico GraphPad Prism<sup>®</sup> e SPSS<sup>®</sup>. Os testes estatísticos utilizados na análise da associação de variáveis foi o teste do qui-quadrado. Foi utilizado ANOVA misto para comparar grupos estudo e placebo. O nível de significância estatística considerado para todas as análises foi  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Pacientes

Quanto ao gênero, foi observado um percentual de 52% dos pacientes no grupo placebo como sendo do sexo feminino e 48% masculino, mesmo valor encontrado no grupo estudo, havendo similaridade em relação a este perfil em ambos os grupos ( $p=0,999$ ). A média da idade dos pacientes foi de 28 anos ( $DP=\pm 9$ ). Os pacientes faziam uso de HU há pelo menos dois meses, variando de 2 a 108 meses (9 anos). A variação da dose de HU ocorre de forma individualizada, devido a variabilidade clínica dos pacientes e padrão de dose terapêutica da literatura variando de 10 a 30 mg/kg/dia, sendo as médias de dose de 1040mg no grupo placebo e 1070mg no grupo estudo. Não houve relato de efeitos adversos nos pacientes do ensaio clínico (Tabela 3).

Houve histórico de hospitalização em 64% dos pacientes em ambos os grupos, demonstrando ser uma amostragem homogênea, de perfil semelhante, sendo que no grupo placebo 28% dos pacientes foram hospitalizados no último ano, 24% nos últimos três anos e 12% nos últimos cinco anos, enquanto que nos pacientes do grupo estudo 36% foram hospitalizados no último ano, 20% nos últimos três anos e 8% nos últimos cinco anos ( $p=0,910$ ) (Tabela 3).

Em relação a frequência de crises álgicas, 77% dos pacientes do grupo placebo e 72% do grupo estudo apresentaram esta queixa, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $p=0,741$ ). Quanto a quadros de osteonecrose, 8% dos pacientes apresentaram este relato em ambos os grupos ( $p=0,999$ ), enquanto que a úlcera de membros inferiores ocorreu em 12% dos pacientes do grupo placebo e 4% do grupo estudo ( $p=0,609$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 – Características clínicas e demográficas dos pacientes.

	Grupo Placebo		Grupo Estudo		Valor <i>p</i>
<b>Gênero (n/%)</b>					
Feminino	13	52,0%	13	52,0%	<b>&gt;0,999<sup>a</sup></b>
Masculino	12	48,0%	12	48,0%	
<b>Idade (Anos)</b>	28		28		<b>0,843<sup>γ</sup></b>
<b>Dose HU (mg/dia)</b>	1040		1070		
<b>Tempo de uso de HU (meses)</b>					
02 – 48	17	68,0%	14	56,0%	<b>0,678<sup>a</sup></b>
49 – 96	6	24,0%	8	32,0%	
>97	2	8,0%	3	12,0%	
<b>Hospitalização (n/%)</b>					
Nunca	9	36,0%	9	36,0%	<b>0,910<sup>a</sup></b>
5 anos	3	12,0%	2	8,0%	
3 anos	6	24,0%	5	20,0%	
Esse ano	7	28,0%	9	36,0%	
<b>Crise álgicas (n/%)</b>					
Não	5	23%	7	28%	<b>0,741<sup>β</sup></b>
Sim	20	77%	18	72%	
<b>Osteonecrose (n/%)</b>					
Não	23	92%	23	92%	<b>&gt;0,999<sup>β</sup></b>
Sim	2	8%	2	8%	
<b>Lesão de perna (n/%)</b>					
Não	22	88%	24	96%	<b>0,609<sup>β</sup></b>
Sim	3	12%	1	4%	

Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2018. Legenda: <sup>a</sup>Teste Chi-square. <sup>β</sup>Teste Fisher. <sup>γ</sup>Teste Mann Whitney HU (hidroxiuréia).

#### 4.1. Parâmetros hematológicos

Foram analisados parâmetros hematológicos dos pacientes nos momentos M0, M2 e M4, de cada grupo, onde foi verificado que os dados de hemácias x 10<sup>6</sup> (/mm<sup>3</sup>) de 16 pacientes do grupo estudo e 20 do grupo placebo, possuindo a média de 2,5 x 10<sup>6</sup> (/mm<sup>3</sup>) e 2,4 x 10<sup>6</sup> (/mm<sup>3</sup>) em ambos os grupos e nos momentos. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos (*p*=0,378) (Tabela 4).

Em relação aos dados de hemoglobina (g/dL), observamos que no grupo estudo foi detectado 8,7 g/dL no M0, 9,1 g/dL no M2 e 9,4 g/dL no M4, enquanto que no grupo placebo foram os valores de 8,9 g/dL no M0, 9,1 g/dL no M2 e 9,2 g/dL no M4. Demonstrando que não houve diferença entre os grupos nos diferentes momentos estudados ( $p=0,525$ ). Quanto a HbF (%), obtivemos dados do grupo estudo, que foram crescentes nos valores de 13,9% no M0, 15,2% no M2 e 16,4% no M4, enquanto que no grupo placebo as médias foram de 13,6% no M0, 16,0% no M2 e 14,8% no M4. Observamos uma tendência crescente de HbF em ambos os grupos ( $p=0,455$ ). Observando dados de HbS (%), obtivemos dados de 16 pacientes do grupo estudo e, 19 pacientes do grupo placebo, onde notamos no grupo estudo houve uma redução gradativa nas médias, com os valores de 78,4% no M0, 78,0% no M2 e 76,4% no M4, enquanto que no grupo placebo foram de 78,9% no M0, 79,1% no M2 e 77,9% no M4, mesmo assim, não foi significativa no estudo estatístico ( $p=0,882$ ) (Tabela 4).

Quanto ao hematócrito, obtivemos dados de 20 pacientes do grupo placebo e 16 pacientes do grupo estudo, demonstrando as médias no grupo placebo de 26,9% no M0, 26,7% no M2 e 27,0 no M4, e no grupo estudo as médias foram 26,3% no M0, 26,8% no M2 e 28,1 no M4. Neste caso, também não houve diferença significativa ( $p=0,304$ ). Ao analisar VCM (fL) observamos que não houve diferença nos grupos ( $p=0,480$ ), porém em ambos os grupos houve aumento, com médias de 106,2fL no M0, 107,7fL no M2 e 111,8fL no M4 e 106,9fL no M0, 111,5fL no M2 e 113,2fL no M4, no grupo placebo. E quanto a MCHC (%) não houve diferença, com o  $p=0,661$ , e as médias no grupo estudo foram 33,4% no M0, 34,1% no M2 e 33,7% no M4, e no grupo placebo, foram de 34,2% no M0, 34,1% no M2 e 34,2% no M4, e (Tabela 4).

As plaquetas  $\times 10^3$  (/mm<sup>3</sup>) do grupo estudo foram  $383 \times 10^3$  (/mm<sup>3</sup>) no M0,  $331 \times 10^3$  (/mm<sup>3</sup>) no M2 e  $364 \times 10^3$  (/mm<sup>3</sup>) no M4, enquanto que no grupo placebo tiveram as médias de  $435 \times 10^3$  (/mm<sup>3</sup>) no M0,  $378 \times 10^3$  (/mm<sup>3</sup>) no M2 e  $373 \times 10^3$  (/mm<sup>3</sup>) no M4, resultando em um  $p=0,551$ , não demonstrando diferença entre os grupos estudo e placebo neste parâmetro (Tabela 4).

Os reticulócitos são expressos em % e demonstraram uma redução no M4 do grupo estudo, porém não sendo suficiente para ser estatístico, visto que o  $p=0,586$ . No grupo placebo observamos 11,6% no M0, 11,8% no M2 e 8,9% no M4, e no grupo estudo foram observados 9,1% no M0, 9,1% no M2 e 7,4% no M4 (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros hematológicos dos pacientes com anemia falciforme durante o ensaio clínico.

Parâmetros hematológicos	N		Grupo Placebo			Grupo Estudo			Valor <i>p</i>
	(placebo; estudo)		M0	M2	M4	M0	M2	M4	
Hemácias x 10 <sup>6</sup> (/mm <sup>3</sup> )	20	16	2,5	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5	<b>0,378</b>
Hb (g/dL)	20	16	8,9	9,1	9,2	8,7	9,1	9,4	<b>0,525</b>
Hematócrito (%)	20	16	26,9	26,7	27,0	26,3	26,8	28,1	<b>0,304</b>
MCV (fL)	20	16	106,9	111,5	113,2	106,2	107,7	111,8	<b>0,480</b>
MCHC (%)	20	16	34,2	34,1	34,2	33,4	34,1	33,7	<b>0,661</b>
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> (/mm <sup>3</sup> )	20	15	435	378	373	383	331	364	<b>0,551</b>
Reticulócitos (%)	18	18	11,6	11,8	8,9	9,1	9,1	7,4	<b>0,586</b>
HbF (g/dL)	18	17	13,6	16,0	14,8	13,9	15,2	16,4	<b>0,455</b>
HbS (g/dL)	19	16	78,9	79,1	77,9	78,4	78,0	76,4	<b>0,882</b>

Fonte: Elaborada pelo próprio Autor, 2018.

Nota: Medidas repetidas de duas vias ANOVA. Legenda: HbF (hemoglobina fetal), Hb (hemoglobina), HbS (hemoglobina S); MCV (volume corpuscular médio); MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média); SCA (anemia falciforme) M0 (intervalo de tempo antes de receber placebo ou suplementação com L-arginina); M2 (momento dois meses após receber placebo ou suplementação com L-arginina); M4 (período de quatro meses após receber placebo ou suplementação com L-arginina).

#### 4.2. . Níveis de NO

Os níveis de NO foram avaliados através do kit nitrito + nitrato para os grupos placebo e estudo, apresentaram as médias de 38,27(±17,27) (g/L), 39,49(±12,84) e 34,45(±11,25) para o grupo placebo, e 36,55(±20,23), 35,71(±15,11) e 48,64(±20,63) para o grupo estudo (Tabela 5).

Tabela 5 – Média e desvio padrão de nitrito nos momentos M0, M2 e M4, nos grupos estudo e placebo, e geral (ambos os grupos).

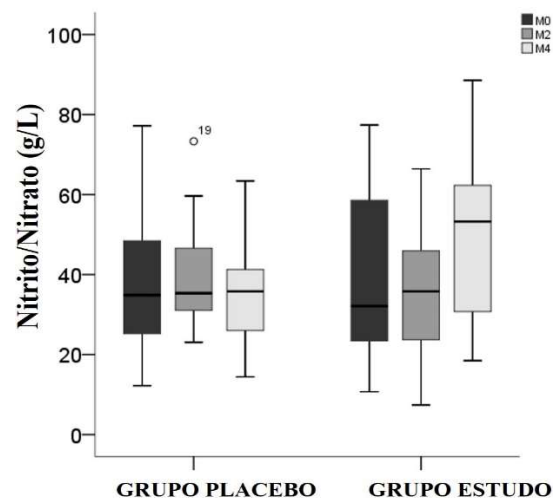
Teste/controle		Média	Desvio Padrão
M0	Placebo	38,27	17,27
	Estudo	36,55	20,23
	Geral	37,41	18,64
M2	Placebo	39,49	12,85
	Estudo	35,71	15,11
	Geral	37,60	14,01
M4	Placebo	34,45	11,25
	Estudo	48,64	20,63
	Geral	41,55	17,94



Fonte: Elaborada pelo próprio Autor, 2018.

Quanto aos níveis de nitrito, foram observados valores decrescentes de  $p$ , havendo significância estatística somente no terceiro momento, com quatro meses de tratamento (Gráfico 01).

Gráfico 01 – Cálculo de ANOVA misto nos momentos M0, M2 e M4 e teste sobre efeito da arginina em relação aos níveis de nitrito.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2018. Nota: Medidas repetidas de duas vias ANOVA. \*  $p \leq 0,001$  na comparação entre M0 versus M4 e M2 versus M4. Legenda: M0 (intervalo de tempo antes de receber placebo ou suplementação com L-arginina); M2 (momento dois meses após receber placebo ou suplementação com L-arginina); M4 (período de quatro meses após receber placebo ou suplementação com L-arginina).

### 4.3. Clínica dos pacientes

Durante o ensaio clínico observamos que 80% dos pacientes do grupo placebo e 72% do grupo estudo possuíam histórico de crises álgicas, 8% dos pacientes em ambos os grupos apresentaram osteonecrose, 12% dos pacientes relataram que já tiveram úlcera de perna no grupo placebo e 4% no grupo estudo. Nenhum destes parâmetros modificou durante o tratamento do ensaio clínico, porém dois pacientes do grupo placebo tiveram crise álgica durante os quatro meses, enquanto que houve uma redução significativa na frequência de quadros de dor relatada pelos pacientes do grupo estudo ( $p < 0,027$ ) (Tabela 6).

Tabela 6 – Dados de frequência de dor dos pacientes em ambos os grupos, nos momentos M0, M2 e M4.

Frequência de dor	GRUPO PLACEBO			GRUPO ESTUDO			<i>p</i>
	M0 n(%)	M2 n(%)	M4 n(%)	M0 n(%)	M2 n(%)	M4 n(%)	
<b>Nunca</b>	28 (7)	28 (7)	28 (7)	24 (6)	24 (6)	24 (6)	<b>0,027</b> *
<b>Anual</b>	12 (3)	12 (3)	12 (3)	52 (13)	52 (13)	52 (13)	
<b>Mensal</b>	28 (7)	28 (7)	28 (7)	12 (3)	12 (3)	20 (5)	
<b>Semanal</b>	8 (2)	8 (2)	12 (3)	0 (0)	0 (0)	4 (1)	
<b>Diária</b>	24 (6)	24 (6)	20 (5)	12 (3)	12 (3)	0 (0)	

Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2018. Legenda: M0 (intervalo de tempo antes de receber placebo ou suplementação com L-arginina); M2 (momento dois meses após receber placebo ou suplementação com L-arginina); M4 (período de quatro meses após receber placebo ou suplementação com L-arginina). Nota: Dados clínicos dos pacientes em ambos os grupos, nos três momentos, não havendo variação nos outros parâmetros além da frequência da dor ( $p=0,027$ ).

#### 4.4. Níveis de arginase

Os níveis de arginase foram avaliados, tendo como média 0,23 unidades por litro (DP=0,070) no M0 e 0,15 unidades por litro (DP=0,072) no M4 no grupo estudo, enquanto que no grupo placebo foram 0,24 unidades por litro (DP=0,063) no M0 e 0,15 unidades por litro (DP=0,060) no M4. Não houve diferença estatística ( $p=0,88$ ), havendo a redução da arginase no M4 em ambos os grupos. Mesmo quando analisando separadamente os casos em que houve redução de dor e aumento de níveis de nitrito + nitrato, ainda assim, não houve redução da arginase nestes pacientes (TABELA 7).

Tabela 7 – Níveis de arginase nos pacientes em ambos os grupos, nos momentos M0, M2 e M4.

	GRUPO ESTUDO	GRUPO PLACEBO
<b>M0</b>	0,23 u/L (+0,070)	0,24 u/L (+0,063)
<b>M4</b>	0,15 u/L (+0,072)	0,15 u/L ( $\pm$ 0,060)

## 5. DISCUSSÃO

A AF é uma doença caracterizada pela hemólise crônica, crise de vascoclusão, processo inflamatório crônico e uma redução da biodisponibilidade do NO. Trata-se de uma doença incurável, cujo tratamento crônico é a utilização de HU. A HU traz benefícios já bem documentados na literatura, tais como o aumento da concentração da HbF, a diminuição no número de hospitalizações, redução das crises de vascoclusão, redução do processo inflamatório, bem como na redução do estresse oxidativo. No entanto, apesar dos trabalhos demonstrarem que a HU é eficaz e segura no tratamento dos pacientes com AF, tanto em crianças como em adultos, poucos estudos têm despertado o possível efeito genotóxico a longo prazo deste fármaco. Também sabe-se que alguns pacientes não são responsivos ao tratamento com a HU, ou ainda que a eficácia do fármaco diminui com o tempo de tratamento. Neste contexto, é urgente a busca de novos fármacos que constituam uma alternativa ao tratamento da AF (CANÇADO, 2009; SONATI, COSTA, 2008).

O referido trabalho teve como objetivo propor uma suplementação de L-arginina em associação com o uso da HU com a finalidade de promover maior doação de NO, aumentando a biodisponibilidade de NO e conseqüentemente reduzindo quadros de dor e das crises de vascoclusão. Tratou-se de um ensaio clínico randomizado duplo cego que analisou a utilização da arginina por via oral em pacientes com AF associado ao tratamento clássico com HU durante quatro meses. A população estudo foi constituída por pacientes adultos com AF, em estado estacionário (basal), sendo os mesmos estratificados em grupo estudo e placebo.

A idade em ambos os grupos apresentou a mesma média, de 28 anos, assim como o gênero, com 48% dos pacientes sendo do sexo masculino e 52% do sexo feminino, em ambos os grupos. Outros estudos demonstram média de idade de pacientes adultos semelhante no trabalho realizado em adultos também pelo nosso grupo de pesquisa (ELIAS et al., 2013).

Em relação a análise hematológica, observou-se que houve um aumento na concentração da Hb total no grupo estudo, mesmo que não significativo. Da mesma maneira, houve aumento gradativo no hematócrito, que pode ser atribuído provavelmente a diminuição da hemólise. Destaca-se também uma diminuição da contagem de reticulócitos, que também pode ser atribuída a redução da hemólise. O VCM teve um aumento não significativo no grupo estudo em relação ao placebo, fato atribuído possivelmente a macrocitose induzida pela HU. Não houve

alteração na contagem das plaquetas, que poderiam nos sinalizar um possível processo inflamatório (BRUGNARA et al., 2018).

Também não foi estatisticamente significante os exames contagem de reticulócitos e hemograma completo, HbF, HbS certamente pelo fato de as hemácias terem um tempo de vida de 45 dias em pacientes com anemia falciforme, necessitando de maior tempo de acompanhamento para observar mudanças. Como citado, a tendência da redução dos reticulócitos no grupo estudo, que pode ser justificado pela vasodilatação, que resulta na redução de hemólise e inflamação. Desta forma, existe a necessidade de menor formação de reticulócitos para gerar as hemácias (DAMANHOURI et al., 2015; MORRIS, 2017).

Existem escassos estudos com L-arginina na AF, no entanto alguns trabalhos já mostraram indícios dos seus benefícios. No estado do Ceará, Elias e colaboradores (2012) avaliaram no mesmo serviço, um ensaio clínico com a suplementação de arginina, em 21 pacientes com AF, e demonstrou que houve aumento significativo de NO e da concentração da HbF. No entanto, o estudo foi realizado em um período de tempo de doze semanas e com ausência do grupo placebo. Os nossos resultados foram semelhantes ao obtido pelo grupo acima no que se refere ao aumento significativo na dosagem do NO, o que consolida o achado relatado.

Morris et al. (2003) realizaram ensaio clínico em que no grupo estudo os pacientes utilizavam HU e arginina, e grupo controle utilizava somente HU. Foi observado que o aumento dos níveis de NO foi significativo estatisticamente somente em pacientes que apresentavam crise algica, enquanto que nos pacientes em estado basal, como em nosso trabalho, não houve este aumento. O que pode ser justificado pelo fato de o acompanhamento ter ocorrido apenas por quatro horas.

Outros trabalhos realizados não tiveram a mesma metodologia de ensaio clínico, porém Sullivan et al. (2010) realizaram estudo utilizando arginina inalatória em pacientes com AF sem e com STA e grupo controle. Os pesquisadores encontraram que os níveis de arginina se encontravam reduzidos nos grupos dos pacientes de anemia falciforme, havendo um aumento dos níveis de arginina somente no grupo de pacientes que utilizou a arginina inalatória, demonstrando que há o aumento da biodisponibilidade da arginina, para que haja de maneira mais eficiente o ciclo do óxido nítrico, potente vasodilatador, o que justifica o aumento significativo dos níveis de NO nos pacientes do presente estudo. O presente estudo realizou a

administração da L-arginina via oral durante 4 meses, momento em que houve significância estatística para o aumento dos índices de NO. Segundo Telen (2016), este resultado ocorreu porque há primeiramente o aumento da biodisponibilidade, para que em seguida haja de maneira gradativa e crescente o ciclo do NO e conseqüente aumento dos níveis de nitrito, que foi utilizado como marcador da presença do NO.

Quanto a clínica, Morris e colaboradores (2003) relataram a redução da frequência de dor nos pacientes do grupo estudo, corroborando que é necessário maior tempo de suplementação da arginina para os pacientes em estado basal. O mesmo grupo demonstrou em 2013, uma redução em 54% na utilização de opióides em crianças com AF com episódios vaso oclusivos em um ensaio duplo cego randomizado utilizando arginina por via inalatória. Neste mesmo ensaio, foi observada a redução dos escores de dor nas crianças de maneira significativa no grupo estudo em relação ao grupo placebo (MORRIS et al., 2013). Nosso trabalho também utilizou placebo, diferindo na forma de administração da arginina, que foi via oral, e também nos pacientes, que se encontravam em estado basal segundo os critérios de Ballas (2012). Em nosso estudo houve um tratamento mais longo, e os pacientes do grupo estudo também tiveram redução da frequência de dor de maneira significativa.

MacMahon et al. (2010) demonstraram que butirato de arginina tópico em úlceras de perna de pacientes com AF reduziram 78% no grupo estudo e 24% no grupo controle, em que não havia a utilização do butirato de arginina. Esta clínica é bastante comum em pacientes com AF, mas não acompanhamos especificamente a redução do tamanho da lesão em membro inferior, sendo apenas citado como complicação pelos pacientes, que são acompanhados e tratados pela equipe do HEMOCE.

Foi realizada a avaliação clínica durante a consulta, e houve relato de pacientes sobre uma melhora clínica e na qualidade de vida dos mesmos. O que nos leva a acreditar que a utilização da arginina pode de fato impactar na melhoria da qualidade de vida dos pacientes, que podem necessitar de tratamento durante toda a sua vida.

Em relação a análise realizada no início e final do ensaio dos níveis de arginase não apresentou modificações em nosso estudo no momento antes e após os meses de tratamento. Este fato pode ser explicado por vários fatores, dentre eles a pequena amostragem em ambos os grupos, ao tempo de uso e, possivelmente, aos haplótipos. Esta questão dos haplótipos se deve

ao fato de que no estado do Ceará temos a predominância dos haplótipos Bantu/Bantu na AF, que costumam ser mais associadas a presença de maiores complicações clínicas, o que pode justificar a diferença em relação a outros estudos realizados em outros continentes também (LAURENTINO et al., 2014).

Conclui-se que o ensaio clínico randomizado foi capaz de comprovar o aumento na produção do NO pela suplementação de L-arginina, e também a redução da dor nos pacientes adultos em uso crônico de HU e L-arginina por um período de quatro meses. No entanto, é importante relatar as limitações do estudo, tais como o tempo de monitoramento, bem como a análise farmacocinética da L-arginina e da HU e outros marcadores de hemólise.

## 6. CONCLUSÃO

- A população em estudo apresenta um perfil sócio demográfico semelhante em relação ao gênero e a idade;
- A avaliação hematológica no decorrer do ensaio clínico não demonstrou alterações significantes, sendo descrito uma redução na contagem de reticulócitos no grupo em uso da L-arginina como coadjuvante;
- A concentração de NO aumentou de forma significativa durante o ensaio clínico no grupo em estudo em relação ao grupo placebo;
- Em relação a avaliação clínica durante o ensaio clínico verificamos uma redução significativa das crises dolorosas com o tempo de uso da L-arginina, fato não observado no grupo placebo;
- A redução da arginase ocorreu em ambos os grupos após o ensaio clínico.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O ensaio clínico traz uma nova possibilidade para ser utilizada no tratamento da AF, mesmo naqueles pacientes que não são responsivos, de maneira que o NO possa auxiliar a ação da HU, que também é uma doadora de NO, potencializando sua ação. E no caso dos pacientes responsivos, novos estudos em que se realize a redução da dose utilizada poderão demonstrar o potencial da L-arginina na AF. Assim como, a utilização no público infantil, até mesmo em outras formas farmacêuticas mais adequadas a esta faixa etária. Os pacientes demonstraram absoluta confiança e se conectaram de forma muito especial a este ensaio, assim como toda a equipe do HEMOCE, através também de palestras e informação continuada para os pacientes que possuem Hemoglobinopatias aqui no estado do Ceará. A informação, o acompanhamento caso a caso e a abertura para novas possibilidades de tratamento e seguimento destes pacientes proporcionam a cada dia a melhora da qualidade de vida, desvendando a AF e evitando suas complicações, tão severas.



## REFERÊNCIAS

ADAM, Soheir S. et al. Depression, quality of life, and medical resource utilization in sickle cell disease. **Blood Advances**, v. 1, n. 23, p. 1983-1992, 2017.

DU, Mengtian et al. Biomarker signatures of sickle cell disease severity. **Blood Cells, Molecules, And Diseases**, v. 72, p.1-9, set. 2018.

ADISA, Olufolake Adetoro et al. Sickle Cell Disease and Acute Chest Syndrome: Mechanisms and Pathogenesis. In: Hematologic Abnormalities and Acute Lung Syndromes. **Humana Press**, Cham, p. 49-65, 2017.

AEDDULA, Narothona Reddy; BARADHI, Krishna M. Sickle Cell Nephropathy. In: **StatPearls** [Internet]. StatPearls Publishing, 2018.

ALMEIDA, Camila Bononi et al. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. **Blood**, v. 126, n. 6, p. 711-720, 2015.

ANTWI-BOASIAKO, Charles; CAMPBELL, Andrew D. Low nitric oxide level is implicated in sickle cell disease and its complications in Ghana. **Vascular Health and Risk Management**, v. 14, p. 199, 2018.

ASNANI, Monika et al. Depression and loneliness in Jamaicans with sickle cell disease. **BMC Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 40, 2010.

AZAR, Sharl; WONG, Trisha E.. Sickle Cell Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 2, p.375-393, 2017.

BAKSHI, Nitya; MORRIS, Claudia R. The role of the arginine metabolome in pain: implications for sickle cell disease. **Journal of Pain Research**, v. 9, p. 167, 2016.

BALLAS, Samir K. et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

- BALLAS, Samir K. Sick cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 105-128, 2018.
- BALIGA, B. S. et al. Combined effects of arginine and hydroxyurea on BFU-E derived colony growth and HbF synthesis in erythroid progenitors isolated from sickle cell blood. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 56, p. OL1290-8, 2010.
- BRODERICK, Gregory A. Priapism and sickle-cell anemia: Diagnosis and nonsurgical therapy. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n. 1, p. 88-103, 2012.
- BRUGNARA, Carlo. Sick cell dehydration: Pathophysiology and therapeutic applications. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 187-204, 2018.
- CANÇADO, Rodolfo D. et al. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 361-6, 2009.
- CARNEIRO, Janaina Santana et al. Beta-Globin Haplotypes and Alpha-Thalassemia 3.7 kb Deletion in Sick Cell Disease Patients From the Occidental Brazilian Amazon. **Journal of Hematology**, v. 5, n. 4, p. 123-128, 2017.
- CONRAN, Nicola; TORRES, Lidiane. cGMP modulation therapeutics for sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, p. 1535370219827276, 2019.
- COSTA, Fernando Ferreira; CONRAN, Nicola (Ed.). **Sickle Cell Anemia: From Basic Science to Clinical Practice**. Springer, 2016.
- COSTA, Maria de Fátima Sonati,; COSTA, Fernand Ferreira. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. S40-S51, 2008.
- COX, Sharon E. et al. Ready-to-use food supplement, with or without arginine and citrulline, with daily chloroquine in Tanzanian children with sickle-cell disease: a double-blind, random order crossover trial. **The Lancet Haematology**, v. 5, n. 4, p. e147-e160, 2018.

DAIBER, Andreas et al. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 187, 2019.

DAMANHOURI, Ghazi A. et al. Clinical biomarkers in sickle cell disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 24-31, 2015.

ELIAS, Darcielle Bruna Dias 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.

FAROOQ, Shama; TESTAI, Fernando D. Neurologic Complications of Sickle Cell Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 19, n. 4, p. 17, 2019.

GARDNER, Renée V. Sickle Cell Disease: Advances in Treatment. **The Ochsner Journal**, v. 18, n. 4, p. 377, 2018.

GORDEUK, Victor R.; CASTRO, Oswaldo L.; MACHADO, Roberto F. Pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 820-828, 2016.

GREGORY, Kato J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18010, 2018.

HOBAN, Megan D.; ORKIN, Stuart H.; BAUER, Daniel E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 839-848, 2016.

HAY, Deborah; ATOYEBI, Wale. Update on sickle cell disease. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 77, n. 4, p. C55-C59, 2016.

KATO, Gregory J. Priapism in Sickle-Cell Disease: A Hematologist's Perspective. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n. 1, p. 70-78, 2012.

KOVÁCS, Mária et al. Effect of sodium nitrite on ischaemia and reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized dogs: is protein S-nitrosylation involved?. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122243, 2015.

KIM-SHAPIRO, Daniel B.; GLADWIN, Mark T. Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 223-237, 2018.

LAURENTINO, Marília Rocha et al. Influence of S-globin haplotypes and hydroxyurea on tumor necrosis factor-alpha levels in sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n. 2, p. 121-125, 2014.

LITTLE, Jane A. et al. Hematologic, biochemical, and cardiopulmonary effects of l-arginine supplementation or phosphodiesterase 5 inhibition in patients with sickle cell disease who are on hydroxyurea therapy. **European Journal of Haematology**, v. 82, n. 4, p. 315-321, 2009.

MAIA, Pedro Aurio Filho et al. Is chronic use of hydroxyurea safe for patients with sickle cell anemia? An account of genotoxicity and mutagenicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, p. 1-3, 2018.

MCMAHON, Lillian et al. A randomized phase II trial of arginine butyrate with standard local therapy in refractory sickle cell leg ulcers. **British Journal of Haematology**, v. 151, n. 5, p. 516-524, 2010.

MOREIRA, Juliane Almeida et al. Pattern of hemolysis parameters and association with fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients in steady state. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 37, n. 3, p. 167-171, 2015.

MORRIS, Claudia R. et al. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 111, n. 2, p. 498-500, 2000.

MORRIS, Claudia R. et al. A randomized, placebo-control trial of arginine therapy for the treatment of children with sickle cell disease hospitalized with vaso-occlusive pain episodes. **Haematologica**, p. haematol. 2013.086637, 2013.

MORRIS, Claudia R. Alterations of the arginine metabolome in sickle cell disease: a growing rationale for arginine therapy. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 28, n. 2, p. 301-321, 2014.

MORRIS, Claudia R. Arginine therapy shows promise for treatment of sickle cell disease clinical subphenotypes of hemolysis and arginine deficiency. **Anesthesia and Analgesia**, v. 124, n. 4, p. 1369, 2017.

MORRIS JR, Sidney M. Arginases and arginine deficiency syndromes. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 15, n. 1, p. 64, 2012.

NADER, Elie et al. Hydroxyurea therapy modulates sickle cell anemia red blood cell physiology: Impact on RBC deformability, oxidative stress, nitrite levels and nitric oxide synthase signalling pathway. **Nitric Oxide**, v. 81, p. 28-35, 2018.

NAIK, Rakhi P. et al. Sickle cell trait and the risk of ESRD in blacks. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 7, p. 2180-2187, 2017.

PICCIN, Andrea et al. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anemia and possible treatment. **European Journal of Haematology**, 2019.

PIEL, Frédéric B.; STEINBERG, Martin H.; REES, David C. Sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561-1573, 2017.

REIS, Flávia Mylla de Sousa et al. Incidence of variant hemoglobins in newborns attended by a public health laboratory. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 2, 2018.

SANTOS, Jean Leandro dos; CHIN, Chung Man. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Química Nova**, p. 783-790, 2012.

SCAVELLA, Arnette et al. Effect of L-arginine supplementation on immune responsiveness in patients with sickle cell disease. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 55, n. 2, p. 318-323, 2010.

SETTY, BN Yamaja; BETAL, Suhita Gayen. Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. **Blood**, v. 111, n. 2, p. 905-914, 2008.

SINGH, Amanpreet; XU, Yong-Jie. The cell killing mechanisms of hydroxyurea. **Genes**, v. 7, n. 11, p. 99, 2016.

SOMMER, Camila K. et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 1709-1714, 2006.

SONATI, Maria de Fátima; COSTA, Fernando Ferreira. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. S40-S51, 2008.

STEINBERG, Martin H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 4, p. 204-210, 2006.

SULLIVAN, Kevin Joseph et al. Effect of oral arginine supplementation on exhaled nitric oxide concentration in sickle cell anemia and acute chest syndrome. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 32, n. 7, p. e249-e258, 2010.

SUNDD, P., GLADWIN, M T., & NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease** p 261 – 290, 2018.

TELEN, Marilyn J. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 810-819, 2016.

WEATHERALL, David J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. **Blood**, p. blood-2010-01-251348, 2010.

VILAS-BOAS, Wendell et al. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Annals of Hematology**, v. 89, n. 9, p. 877-882, 2010.

ZEMPSKY, William T. et al. Widespread Pain Among Youth With Sickle Cell Disease Hospitalized With Vasoocclusive Pain. **The Clinical Journal of Pain**, v. 33, n. 4, p. 335-339, 2017.

ZHONG, Hui; YAZDANBAKHSI, Karina. Hemolysis and immune regulation. **Current Opinion in Hematology**, v. 25, n. 3, p. 177, 2018.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA  
PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA



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 “Ensaio clínico randomizado duplo cego placebo para estudo da eficácia da L-arginina como coadjuvante a hidroxiuréia, na anemia falciforme”, que tem como objetivo principal analisar a eficácia e resposta da L-arginina juntamente com a hidroxiuréia no tratamento dos pacientes com anemia falciforme acompanhados no serviço do Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE). A hidroxiuréia é utilizada no protocolo de tratamento da anemia falciforme, e a L-arginina é um aminoácido que tem o papel de melhorar a circulação do óxido nítrico, resultando em melhor circulação sanguínea e redução de quadros de dor e internação e atua em quadros inflamatórios e de infecção. Pelo fato de ser um aminoácido, Este estudo apresentará dois grupos, divididos de maneira aleatória, onde o primeiro grupo vai receber L-arginina, enquanto o outro grupo receberá o placebo, com a finalidade de comprovar que o grupo que recebe a L-arginina terá uma redução de dor e de internações, além de melhora na circulação e aumento do óxido nítrico circulante. Dessa maneira, é possível modificar o protocolo de tratamento do HEMOCE, para que todos os pacientes com anemia falciforme recebam a L-arginina, juntamente com a hidroxiuréia.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento. Para participar do projeto haverá a coleta de 2 (duas) amostras de sangue no momento da coleta de rotina para que a pesquisa seja realizada. Esta coleta de sangue será realizada no Ambulatório de Anemia Falciforme do Hemocentro do Estado do Ceará. 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 e desconforto no momento da coleta. 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, utilizados apenas para a discussão dos professores e estudantes envolvidos no projeto e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecer dúvidas. O principal investigador é Renata Mirian Nunes Eleutério, endereço para contato: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Porangabussu, CEP 60430-370 - Fortaleza, CE – Brasil, Telefone: (85) 33668264.

Se o Senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Ceará Rua Coronel Nunes de Melo, 1000. Rodolfo Teófilo; Fone: (0xx)85 3366-8344.

Caso o Senhor (a) se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu 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:    /    /



---

Assinatura do responsável pela aplicação do TCLE    Data:    /    /

## ANEXO A – Parecer consubstanciado do CONEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO DUPLO CEGO PLACEBO PARA ESTUDO DA EFICÁCIA DA L-ARGININA COMO COADJUVANTE A HIDROXIURÉIA, NA ANEMIA FALCIFORME.

**Pesquisador:** Renata Mirian Nunes Eleutério

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 41553015.8.0000.5054

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.292.517

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo clínico randomizado duplo cego placebo para estudo da eficácia da L-arginina como coadjuvante no tratamento de anemia falciforme.

Casuística: Serão selecionados 50 pacientes com AF, em uso de 500 mg/dia ou mais de hidroxiuréia, em estado basal de acordo com Ballas et al. 2009, com a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em acompanhamento no Hemocentro do Estado de Ceará (HEMOCE). Os pacientes serão estratificados em dois grupos, sendo: Grupo I – 25 pacientes com AF em uso de HU (Hydrea® maior ou igual a 500mg/dia) associada com L-arginina (L-arginina 250 mg – 1vez ao dia). Grupo II – 25 pacientes com AF em uso de HU (Hydrea® maior ou igual a 500mg/dia) associada com placebo. A dose a partir de 500mg/dia foi selecionada por representar a dosagem utilizada pelos pacientes tratados com HU onde será realizada a pesquisa, resultando assim em resultados com maior confiabilidade. Locais de Estudo: O estudo será realizado no Hemocentro do Estado Ceará (HEMOCE) e no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) da Universidade Federal do Ceará. Serão selecionados 50 pacientes com AF, em uso de 500 mg/dia ou mais de hidroxiuréia, em estado basal de acordo com Ballas et al. 2009, em acompanhamento no Hemocentro do Estado de Ceará (HEMOCE).

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**Fax:** (85)3223-2903

**E-mail:** comepe@ufc.br

## ANEXO B - Double-Blind Clinical Trial of Arginine Supplementation in the Treatment of Adult Patients with Sickle Cell Anaemia.




### ARTIGO

Hindawi  
 Advances in Hematology  
 Volume 2019, Article ID 4397150, 6 pages <https://doi.org/10.1155/2019/4397150>



### *Clinical Study*

## **Double-Blind Clinical Trial of Arginine Supplementation in the Treatment of Adult Patients with Sickle Cell Anaemia**

Renata M. N. Eleutério ,<sup>1</sup> Francisco O. Nascimento,<sup>2</sup> Tamara G. Araújo,<sup>1</sup> Marilena F. Castro,<sup>3</sup> Tarc-sio P. Almeida Filho,<sup>3</sup> Pedro A. Maia Filho,<sup>3</sup> José Eleutério Jr ,<sup>4</sup> Darcielle B. D. Elias,<sup>3</sup> and Romélia P. G. Lemes ,<sup>1,3</sup>

*Graduate Programme in Development and Technological Innovation of Medicines, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil*<sup>1 2</sup>

*State Blood Centre of Ceara (HEMOCE), Fortaleza, Brazil*<sup>3</sup>

*Graduate Programme in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil*<sup>4</sup>

*Motherhood and Child Department, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil*<sup>1</sup>

Correspondence should be addressed to Romelia P. G. Lemes; [romeliagoncalves@gmail.com](mailto:romeliagoncalves@gmail.com)

Received 20 July 2018; Revised 22 December 2018; Accepted 15 January 2019; Published 3 February 2019

Academic Editor: Estella M. Matutes

Copyright © 2019 Renata M. N. Eleuterio et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background.** Sickle cell anaemia (SCA) is the most prevalent monogenic disease in Brazil. In SCA, haemoglobin S (HbS) is formed, which modifies red blood cell morphology. Intravascular haemolysis occurs, in which free Hb and free radicals degrade nitric oxide (NO) and release arginase, which reduces arginine levels. Because arginine is a substrate for NO formation, this decrease leads to reduced NO (vasodilator) synthesis. SCA treatment uses hydroxyurea (HU) to maintain high foetal haemoglobin (HbF) levels and reduces HbS to avoid haemolytic episodes. **Objective.** To analyse the efficacy of L-arginine as an adjuvant in the treatment of SCA patients. **Setting.** The State Blood Centre of Ceara, Brazil. **Methods.** This was a randomized double-blind clinical study of adults with SCA with

continuous use of HU at the State Blood Centre of Ceara. The clinical study enrolled 25 patients receiving HU + L-arginine (500 mg) and 25 patients receiving HU + placebo. The treatment was carried out over four months. Laboratory tests were performed to determine the levels of the following: (1) complete blood count; (2) nitrite + nitrate; (3) HbF; and (4) reticulocytes. The clinical experiments were performed by a haematologist. The main outcome measures were nitrite and pain. *Results.* Statistical analysis showed that the levels of NO were increased in the study group, and there was also a reduction in pain frequency using a pain frequency scale by day, week, and month. The levels of nitrite plus nitrate in the group receiving placebo plus HU did not change among the times evaluated ( $38.27 \pm 17.27$  mg/L,  $39.49 \pm 12.84$  mg/L,  $34.45 \pm 11.25$  mg/L,  $p > 0.05$ ), but in the patients who received supplementation with L-arginine plus HU, a significant increase in nitrite plus nitrate levels was observed between M0 and M4 ( $36.55 \pm 20.23$  mg/L versus  $48.64 \pm 20.63$  mg/L,  $p = 0.001$ ) and M2 and M4 ( $35.71 \pm 15.11$  mg/L versus  $48.64 \pm 20.63$  mg/L,  $p < 0.001$ ). It is important to note that the increase in nitrite plus nitrate levels occurred only in the fourth month of follow-up of patients in the treatment group, showing that at least 4 months of supplementation with L-arginine is necessary to show an increase in these metabolites in the serum. *Conclusion.* The use of L-arginine as a coadjuvant in the treatment of sickle cell anaemia may function as a potential tool for pain relief, consequently improving the life of patients.

## Introduction

Sickle cell anaemia (SCA) is a genetic disease caused by a point mutation in the beta globin gene in which a glutamic acid is replaced by a valine, resulting in the synthesis of a new haemoglobin, haemoglobin S (HbS), which forms polymers in the red blood cells at low oxygen tension. It also makes membranes more rigid, thus modifying membrane morphology and function [1]. In this way, the transport of oxygen is compromised, and a deposition of these red cells in the endothelial wall occurs, which can lead to chronic inflammation, difficult microcirculation, pain, hospitalization, and stroke [2, 3].

Arginine is an essential compound for the formation of nitric oxide (NO), which is a potent vasodilator. It is found in reduced levels in SCA patients, which may cause impairment in the microcirculation, recurrent pain, and hospitalization. Studies have shown that, with increased L-arginine availability, there is greater NO synthesis, which leads to improved microcirculation and patient clinical profiles [2–5].

This is because L-arginine is a substrate for NO production. During haemolysis, arginase, an enzyme that metabolizes L-arginine and contributes to a decrease in NO concentration in SCA patients, is released. Other studies have demonstrated that NO is a cofactor for the enzyme guanylate cyclase, which is responsible for the conversion of guanosine triphosphate (GTP) to cyclic guanine monophosphate

(cGMP). cGMP is responsible for smooth and vascular muscle relaxation and vasodilation [6–8].

Currently, to reduce haemolytic episodes, pain, and vessel occlusion, SCA treatment uses hydroxyurea (HU), which is used to maintain high foetal haemoglobin (HbF) levels and consequently reduce haemoglobin S (HbS) concentrations. Other positive effects associated with the use of hydroxyurea may be attributed to nitric oxide. There are several mechanisms involved in the production of nitric oxide from HU, such as the catalase-mediated pathway, urease-dependent formation, and NO production catalysed by horseradish peroxidase. More recently, the role of HU in inducing eNOS (NO endothelial synthetase) for NO production in endothelial cells has also been demonstrated [9–12]. In fact, this drug has been shown to be useful in relieving pain in patients with sickle cell anaemia, and the vasodilatation resulting from the formation of hydroxyurea-derived NO may be one more mechanism by which HU can benefit these patients [13]. Therefore, investigating whether L-arginine supplementation can enhance the effects of HU becomes mandatory since this amino acid plays an important role as a substrate for NO production.

In this context, the aim of this study was to analyse whether there is an increase in nitric oxide levels, measured by nitrite plus nitrate levels, in patients who use HU plus L-arginine as supplemental

treatment compared to the nitric oxide levels in patients using HU plus placebo.

## Materials and Methods

The clinical trial was a randomized, double-blind, and placebo-controlled study. The patients were randomized by the GraphPad prism program. Fifty adult patients of both sexes with a clinical and molecular diagnosis of SCA in their follow-up periods at the Blood Centre of the State of Ceara (HEMOCE) participated in the study. The inclusion criteria included adult patients using HU and baseline data according to the criteria of Ballas (2012): absence of painful episodes and/or intercurrent illnesses, such as infections and inflammations in the four weeks prior to the study; absence of hospital admissions in the last 2-3 days prior to study; and the absence of blood transfusion in the four months preceding the study [14]. The exclusion criteria were absence of a molecular diagnosis of SCA, pregnancy, presence of renal disease, not using HU, and a history of transfusion in the last six months.

Patients who participated in the study are seen at the haemoglobinopathies clinic regularly to continue their treatment with hydroxyurea. We use the moment when they returned to carry out the instruction and the trial.

The groups were separated in a randomized, doubleblind trial in which only the main author had the information regarding the groups and the respective patients. Therefore, there are no other names in contributorship statement/acknowledgements. The physician who cared for the patients is a coauthor of this article.

Patients were stratified into two groups: (1) the first group consisted of 25 subjects who used HU + L-arginine at a dose of 500 mg/day and (2) the second group consisted of 25 subjects taking HU + placebo (starch). The HU doses ranged from 500 to 1500 mg/day and were not modified during the trial. Biological samples were obtained at specific

timepoints: (1) before receiving supplementation with placebo or Larginine (M0); (2) two months after placebo or supplementation with L-arginine (M2); and (3) four months after placebo or supplementation with L-arginine (M4). The arginine dose was defined based on an earlier study performed by the same group [5]. The trial time was determined by the clinical staff of the Blood Centre of the State of Ceara. It was not possible to use a group that used only arginine because of the treatment protocol of the institution.

The outcome measures were the nitric oxide dose measured by nitrite plus nitrate levels using a nitrite/nitrate, colorimetric assay kit, Roche; foetal haemoglobin levels measured by HPLC; and reticulocyte and complete blood count. To measure pain frequency, a time scale was used to stratify the patients. The scale divided the patients into 5 pain categories: never (absence of pain), every day, every week, every month, and every year. As was done for pain assessment, a scale was created to measure the frequency of hospitalizations. The patients were stratified into the following: never hospitalized, hospitalized 5 years ago, hospitalized 3 years ago, and hospitalized this year. The other clinical and historical data of the patients were obtained from medical records.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS 21 Statistics. For the analysis of the normality of the data, the Shapiro-Wilk test was used. For the analysis of the quantitative variables, a Mann-Whitney test or two-way repeated measures ANOVA were used. For the analysis of categorical variables, the Pearson's chi-square test or Fisher's test was used. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

The study was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Ceara with number 1.292.517, and it was registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials with the number U1111-1201-6937. The patients were required to sign an informed consent form.

## Results and Discussion

*3.1. Patients.* The mean age of patients enrolled in the study was 28 years, and a similar mean was observed in both of the groups, the placebo group

Advances in Hematology and the treatment group. Most of the patients were female (52%), and the female-male ratio was approximately 1.1:1. Gender and age were matched between patients in the placebo and study groups. In addition, there was no difference in clinical manifestations or time of treatment with HU between the groups studied, showing that the baseline characteristics were similar between the groups (Table 1). The duration of HU use before the trial ranged from 2 to 180 months with a median of 48 months. No adverse effects were observed during the 4 months of the trial. There was no significant difference in the nitrite/nitrate levels in the serum based on the HU doses ( $p = 0.643$ ).

*3.2. Haematological Parameters.* In patients for whom haematological data were available, no significant difference was observed between patients in the placebo group and in the study group, showing that supplementation with L-arginine had no influence on the haematological parameters evaluated when compared to patients receiving placebo (Table 2).

*3.3. Measurement of Nitrite Plus Nitrate and Analysis of the Frequency Pain.* The levels of nitrite plus nitrate in the group receiving placebo plus HU did not change among the times the levels were evaluated ( $38.27 \pm 17.27$  mg/L,  $39.49 \pm 12.84$  mg/L,  $34.45 \pm 11.25$  mg/L,  $p > 0.05$ ), showing that placebo had no influence on nitrite plus nitrate levels. Patients who received supplementation with L-arginine plus HU showed a significant increase in nitrite plus nitrate levels between M0 and M4 ( $36.55 \pm 20.23$  mg/L versus  $48.64 \pm 20.63$  mg/L,  $p = 0.001$ ) and M2 and M4 ( $35.71 \pm 15.11$  mg/L versus  $48.64 \pm 20.63$  mg/L,  $p < 0.001$ ) (Figure 1). It is important to note that the increase in the nitrite plus nitrate levels occurred only

in the fourth month of follow-up of the patients in the treatment group, indicating that at least 4 months of supplementation with L-arginine is necessary to show an increase in these metabolites in the serum.

3

The chi-square test showed a reduction in pain frequency in the study group compared to that of the placebo group ( $p = 0.027$ ). Table 3 shows a reduction in the frequency of pain in patients in M4, showing that patients who presented pain every day started to have pain every week or every month. Interestingly, the change in pain frequency coincided with the increase in nitrite plus nitrate levels, suggesting a possible relationship between these two variables.

To the best of our knowledge, this is the first placebocontrolled double-blinded, randomized clinical trial that has tested the therapeutic potential of oral L-arginine supplementation over a four-month period in adult patients with SCA who are undergoing a classic treatment with basal HU. Our results suggest that this association may be beneficial for patients with sickle cell anaemia since a reduction in the frequency of pain was observed in patients who used HU plus L-arginine supplementation. This reduction was dependent on treatment time as observed from serum levels of nitrite plus nitrate, indicating a strong relationship between pain frequency and serum levels of these metabolites.

Nitrite and nitrate are stable products of NO metabolism that are accessible for quantification. They are present in both blood samples and urine samples. The measurement of nitrite and nitrate is considered the most adequate and practical

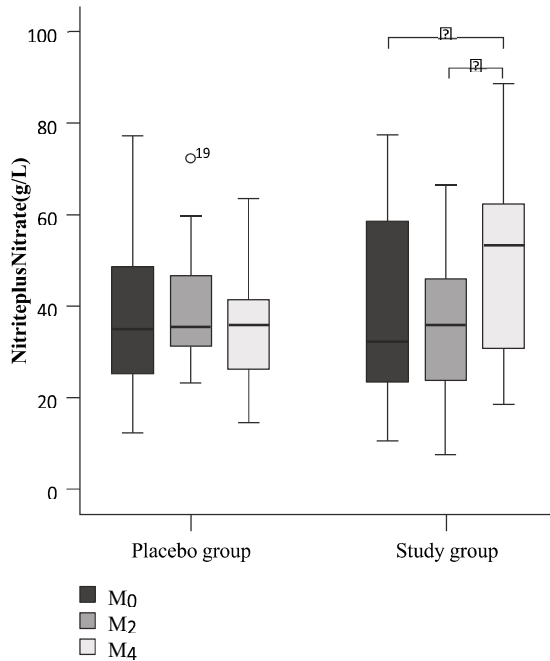


Figure 1: Comparison between the levels of nitrite plus nitrate in the different treatment groups and at the different moments evaluated. Two-way repeated measures ANOVA. \* $p \leq 0.001$  in the comparison between M0 and M4 and M2 and M4. M0 (timepoint before receiving placebo or L-arginine supplement); M2 (timepoint two months after receiving placebo or L-arginine supplement); M4 (timepoint four months after receiving placebo or L-arginine supplement).

way to evaluate the synthesis of NO in vivo. The colorimetric method used in our study is based on the Griess reaction, which involves the indirect

determination of NO through the spectrophotometric measurement of its stable decomposition products,  $\text{NO}^{2-}$  and  $\text{NO}^{3-}$  [15].

It was not possible to include a group not being treated with HU because the hospital in which the treatment was performed treats patients with SCA with HU. However, in an earlier study in the same city, but in another hospital, it was possible to determine that the mean nitrite/nitrate level of patients was 25.63 mg/L, which was well below the indices in our study [16].

Previous studies conducted by our research group have shown an increase in nitrite levels in patients using HU in combination with L-arginine; however, we did not evaluate the influence of L-arginine on the frequency of pain in these patients [5]. Lopez et al. (1996) showed that levels of nitric oxide metabolites were inversely correlated with pain scores in patients with SCA with vaso-occlusive crises, suggesting the role of NO in pain [17]. Another study using inhaled NO also showed a decrease in pain score in patients with SCA who inhaled NO, reinforcing their role in pain relief [18]. In 2013, in a randomized, placebo-controlled trial using oral or intravenous L-arginine hydrochloride as a source of NO, Morris et al. (2013) demonstrated a 54% reduction in opioid use in children with SCA. In this same trial, the reduction

Table 1: Baseline characteristics of the patients.

	Placebo Group		Study Group		p-value
<b>Gender (n/%)</b>					
Female	13	52,0%	13	52,0%	$>0.99^{9\alpha}$
Male	12	48,0%	12	48,0%	
<b>Age (Years)</b>	28		28		$0.84^{3\gamma}$
<b>HU doses (mg/day)</b>	1040		1070		
<b>Time of use of HU (months)</b>					
02 – 48	17	68,0%	14	56,0%	
49 – 96	6	24,0%	8	32,0%	$0.67^{8\alpha}$
>97	2	8,0%	3	12,0%	
<b>Hospitalization (n/%)</b>					
Never	9	36,0%	9	36,0%	

5 years	3	12,0%	2	8,0%	<b>0.910<sup>α</sup></b>
3 years	6	24,0%	5	20,0%	
This year	7	28,0%	9	36,0%	
<b>Vaso-occlusive crisis (n/%)</b>					
No	5	23%	7	28%	<b>0,741<sup>β</sup></b>
Yes	20	77%	18	72%	
<b>Osteonecrosis (n/%)</b>					
No	23	92%	23	92%	<b>&gt;0.99<sup>γβ</sup></b>
Yes	2	8%	2	8%	
<b>Leg lesion (n/%)</b>					
No	22	88%	24	96%	<b>0.60<sup>γβ</sup></b>
Yes	3	12%	1	4%	

<sup>α</sup> Chi-square test. <sup>β</sup> Fisher's test. <sup>γ</sup> Mann-Whitney test. HU: hydroxyurea.

Table 2: Haematological parameters of patients with SCA during the trial.

Haematological parameters	N (placebo; study)		Placebo Group			Study Group			p-value
			M0	M2	M4	M0	M2	M4	
Erythrocytes x 10 <sup>6</sup> (/mm <sup>3</sup> )	20	16	2.5	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	<b>0.378</b>
Hb (g/dL)	20	16	8.9	9.1	9.2	8.7	9.1	9.4	<b>0.525</b>
HbF (g/dL)	18	17	13.6	16.0	14.8	13.9	15.2	16.4	<b>0.455</b>
HbS (g/dL)	19	16	78.9	79.1	77.9	78.4	78.0	76.4	<b>0.882</b>
Haematocrit (%)	20	16	26.9	26.7	27.0	26.3	26.8	28.1	<b>0.304</b>
MCV (fL)	20	16	106.9	111.5	113.2	106.2	107.7	111.8	<b>0.480</b>
MCHC (%)	20	16	34.2	34.1	34.2	33.4	34.1	33.7	<b>0.661</b>
Platelets x 10 <sup>3</sup> (/mm <sup>3</sup> )	20	15	435	378	373	383	331	364	<b>0.551</b>
Reticulocytes (%)	18	18	11.6	11.8	8.9	9.1	9.1	7.4	<b>0.586</b>

Two-way repeated measures ANOVA: HbF (foetal haemoglobin), Hb (haemoglobin), HbS (haemoglobin S); MCV (mean corpuscular volume); MCHC (mean corpuscular haemoglobin concentration); SCA (sickle cell anaemia); M0 (timepoint before receiving placebo or L-arginine supplement); M2 (timepoint two months after receiving placebo or L-arginine supplement); M4 (timepoint four months after receiving placebo or L-arginine supplement).

Table 3: Frequency of pain in patients with SCA.

Frequency of pain	Placebo group			Study group			p-value
	M0	M2	M4	M0	M2	M4	
Never, n (%)	7 (28)	7 (28)	7 (28)	6 (24)	6 (24)	6 (24)	
Every year, n (%)	3 (12)	3 (12)	3 (12)	13 (52)	13 (52)	13 (52)	
Every month, n (%)	7 (28)	7 (28)	7 (28)	3 (12)	3 (12)	5 (20)	<b>0,027*</b>
Every week, n (%)	2 (8)	2 (8)	3 (12)	0 (0)	0 (0)	1 (4)	
Every day, n (%)	6 (24)	6 (24)	5 (20)	3 (12)	3 (12)	0 (0)	

Chi-square test: M0 (timepoint before receiving placebo or L-arginine supplement); M2 (timepoint two months after receiving placebo or L-arginine supplement); M4 (timepoint four months after receiving placebo or L-arginine supplement).

## Advances in Hematology

5

in pain scores in children was observed in the study group versus the placebo group [19]. Cox et al. (2018)

showed that arginine and citrulline treatment in children did show a benefit in measures of



endothelial function compared with the same measures at baseline [20].

Our results are consistent with previously published data indicating that the use of L-arginine may reduce the frequency of pain in patients with sickle cell anaemia, demonstrating that it is a potential tool for improving the quality of life of these patients. This may be partly due to the increased serum levels of nitrite plus nitrate, which reflects increased NO, a known lacking vasodilator in patients with SCA that is associated with pain [16, 21].

Despite the few studies using L-arginine as a source of NO in SCA, many studies have shown the benefits of NO. For example, it has been reported that NO can be produced by the vascular endothelium from L-arginine and is able to regulate normal vascular tone and inhibit platelet activation, haemostatic activation, and the expression of adhesion molecules such as VCAM-1, which is a marker of endothelial activation that is implicated in binding to  $\alpha 4\beta 1$  adhesion molecules present in sickle red blood cells [22, 23]. The adhesion of sickle red blood cells to the endothelium, in turn, has been implicated in the initiation and propagation of vaso-occlusive events, as demonstrated in previous studies using an in vitro adhesion assay or an ex vivo perfusion model in rats [24]. Additionally, NO has been shown to reduce the adhesive properties of neutrophils to the vascular endothelium in SCA, an important event for the development of vaso-occlusive crises [25, 26].

In addition, Villagra et al. (2007) also reported that sildenafil, a phosphodiesterase 5 inhibitor known to potentialize NO-mediated signalling, was able to reduce platelet activation, which supports a role for NO-based therapeutics since platelet activation may play an important role in the adhesion of sickle red blood cells to the vascular endothelium [27]. Interestingly, platelet activation has been found to be elevated in patients with steady-state SCA, and this elevation is even greater during vaso-occlusive crises [26]. Taken together, these reports suggest that

source-independent NO can benefit patients with sickle cell disease by acting on several cellular components involved in the genesis of vasoocclusive crises. Here, we used L-arginine as a source of NO; L-arginine is a safe and effective amino acid that is reported to have narcotic-sparing effects that may be a beneficial complement to the treatment of patients with SCA [19].

Relatively recent studies have shown that the decomposition products of NO, nitrite and nitrate, can be recycled in vivo for the production of NO, representing an alternative source of this gas. This process occurs mainly under conditions of hypoxia in which the activity of the oxygen-dependent NOS enzyme is compromised [28]. In this context, we hypothesized that supplementation with L-arginine may, in addition to serving as a substrate for NO production by the NOS-dependent pathway, increase the supply of nitrite and nitrate to function as a storage pool that is available for NO production in conditions of low oxygen tension, such as the conditions that occur during vaso-occlusive crises. The increased NO levels may not only prevent vaso-occlusive crises but also attenuate or even resolve them. It is important to note that, during our study, no patient receiving HU plus L-arginine supplementation experienced complications of the disease.

## Conclusions

In summary, our data indicate a strong relationship between increased levels of NO metabolites and decreased pain frequency in patients with SCA, which supports the use of L-arginine supplementation as an adjuvant in the treatment of these patients. These data are the first to demonstrate this relationship in adult patients with SCA; however, more studies are needed with a larger number of individuals and longer follow-up to evaluate the safety and efficacy of longterm supplementation with L-arginine.

## Data Availability

The data are available on the website of the Brazilian Register of Clinical Trials at [www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-2t56nz/](http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-2t56nz/).

## Conflicts of Interest

We declare no conflicts of interest.

## References

- [1] M. A. Sani, J. O. Adewuyi, A. S. Babatunde et al., "The iron status of sickle cell anaemia patients in ilorin, north central nigeria," *Advances in Hematology*, vol. 2015, Article ID 386451, 5 pages, 2015.
- [2] C. R. Morris, "Alterations of the arginine metabolome in sickle cell disease a growing rationale for arginine therapy," *Hematology/Oncology Clinics*, vol. 28, no. 2, pp. 301–321, 2014.
- [3] A. R. Belisario, C. M. Silva, C. Velloso-Rodrigues et al., "Genetic, laboratory and clinical risk factors in the development of overt ischemic stroke in children with sickle cell disease," *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, vol. 40, no. 2, pp. 166–181, 2018.
- [4] S. L. A. Yeung, S. L. Lin, H. S. H. S. Lam et al., "Effect of L-arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine on ischemic heart disease risk: A Mendelian randomization study," *American Heart Journal*, vol. 182, no. 54, pp. 54–61, 2016.
- [5] D. B. Elias, M. C. Barbosa, L. B. Rock et al., "L-arginine to an adjuvant drug in the treatment of sickle cell anemia," *British Journal of Haematology*, vol. 160, no. 3, pp. 410–412, 2013.
- [6] H. Tran, M. Gupta, and K. Gupta, "Targeting novel mechanisms of pain in sickle cell disease," *Blood*, vol. 130, no. 22, pp. 2377–2385, 2017.
- [7] C. R. Morris, E. P. Vichinsky, J. Van Warmerdam et al., "Hydroxyurea and arginine therapy: Impact on nitric oxide production in sickle cell disease," *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, vol. 25, no. 8, pp. 629–634, 2003.
- [8] K. J. Sullivan, N. Kissoon, E. Sandler et al., "Effect of oral arginine supplementation on exhaled nitric oxide concentration in sickle cell anemia and acute chest syndrome," *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, vol. 32, no. 7, pp. e249–e258, 2010.
- [9] C. Liu, N. Wajih, X. Liu et al., "Mechanisms of human erythrocytic bioactivation of nitrite," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, pp. 1281–1294, 2015.
- [10] V. L. Lockamy, J. Huang, H. Shields et al., "Urease enhances the formation of iron nitrosyl hemoglobin in the presence of hydroxyurea," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1622, no. 2, pp. 109–116, 2003.
- [11] R. L. Khade, Y. Yang, Y. Shi et al., "HNO binding in heme proteins: effects of iron oxidation state, axial ligand, and protein environment," *Angewandte Chemie International*, vol. 55, no. 48, pp. 15058–15061, 2016.
- [12] V. P. Cokic, B. B. Beleslin-Cokic, M. Tomic, S. S. Stojilkovic, C. T. Noguchi, and A. N. Schechter, "Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells," *Blood*, vol. 108, no. 1, pp. 184–191, 2006.
- [13] S. Charache, M. L. Terrin, R. D. Moore et al., "Investigators of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia," *New England Journal of Medicine*, vol. 332, no. 20, pp. 1317–1322, 1995.
- [14] S. K. Ballas, "More definitions in sickle cell disease: Steady state v base line data," *American Journal of Hematology*, vol. 87, no. 3, p. 338, 2012.
- [15] D. Tsikas, "Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids," *Free Radical Research*, vol. 39, no. 8, pp. 797–815, 2005.
- [16] D. B. Elias, L. B. Rocha, M. B. Cavalcante et al., "Correlation of low levels of nitrite and high levels of fetal hemoglobin in patients with sickle cell disease at baseline," *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, vol. 3, no. 4, pp. 265–269, 2012.
- [17] B. L. Lopez, "Nitric oxide metabolite levels in acute vaso-occlusive sickle-cell crisis," *Academic Emergency Medicine*, vol. 3, no. 12, pp. 1098–1103, 1996.
- [18] D. L. Weiner, P. L. Hibberd, P. Betit et al., "Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease," *Journal of the American Medical Association*, vol. 289, no. 9, pp. 1136–1142, 2003.
- [19] C. R. Morris, F. A. Kuypers, L. Lavrisha et al., "A randomized, placebo-controlled trial of arginine therapy for the treatment of children with sickle cell disease hospitalized with vaso-occlusive pain episodes," *Haematologica*, vol. 98, no. 9, pp. 1375–1382, 2013.
- [20] S. E. Cox, E. A. Ellins, A. I. Marealle et al., "Ready-to-use food supplement, with or without arginine and citrulline, with daily chloroquine in tanzanian children with sickle-cell disease: a double-blind, random order crossover trial," *The Lancet Haematology*, vol. 5, no. 4, pp. e147–e160, 2018.
- [21] N. Bakshi and C. R. Morris, "The role of the arginine metabolome in pain: Implications for sickle cell disease," *Journal of Pain Research*, vol. 9, no. 167, 2016.
- [22] G. J. Kato, R. P. Hebbel, M. H. Steinberg et al., "Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions," *American Journal of Hematology*, vol. 84, no. 9, pp. 618–625, 2009.
- [23] D. Manwani and P. S. Frenette, "Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies," *Blood*, vol. 122, no. 24, pp. 3892–3898, 2013.

- [24] D. K. Kau, E. Finnegan, and G. A. Barabino, "Sickle red cell endothelium interactions," *Microcirculation*, vol. 16, no. 1, pp. 97–111, 2009.
- [25] A. A. Canalli, C. F. Franco-Penteado, S. T. Saad et al., "Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation," *Haematologica*, vol. 93, no. 4, pp. 605–609, 2008.
- [26] D. Zhang, C. Xu, D. Manwani et al., "Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology," *Blood*, vol. 127, no. 7, pp. 801–809, 2016.
- [27] J. Villagra, S. Shiva, L. A. Hunter et al., "Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin," *Blood*, vol. 110, no. 6, pp. 2166–2172, 2007.
- [28] J. O. Lundberg, E. Weitzberg, and M. T. Gladwin, "The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, no. 2, p. 156, 2008.

