

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Suplementação com L-Arginina como terapia complementar aos pacientes  
com doença falciforme**

**Autora: Christina Matzenbacher Bittar**  
**Orientador: Sérgio Saldanha Menna Barreto**

**Porto Alegre**

**2009**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Suplementação com L–Arginina como terapia complementar aos pacientes  
com doença falciforme**

**Autora: Christina Matzenbacher Bittar**

**Orientador: Sérgio Saldanha Menna Barreto**

**Tese apresentada como pré-requisito  
para a obtenção do título de Doutora  
em Ciências Médicas pela  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul.**

**Porto Alegre**

**2009**

## **Agradecimentos:**

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Saldanha Menna Barreto, por ser meu professor durante 35 anos, por ter participado ativamente do rumo de minha vida profissional ao longo destes anos, por ter a paciência de esperar 32 anos para eu cumprir sua firme exigência da formação acadêmica e ainda por sugerir um estudo clínico, comum às especialidades de pneumologia e hematologia.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla pelo convite para participar do atendimento dos pacientes com anemia falciforme há 10 anos, estímulo para realizar a formação acadêmica e pelas valiosas contribuições para a qualidade científica deste estudo.

Ao Dr. João Ricardo Friedrich amigo e colega pela parceria no atendimento dos pacientes para a realização deste ensaio clínico.

Ao Serviço de Cardiologia que realizou os ecocardiograma Doppler transtorácicos.

À Dra. Maria Angela Fontoura Moreira do Serviço de Pneumologia pela realização das provas de função pulmonar.

À Dra. Mariana Coelho Gonçalves Meirelles, farmacêutica pela manipulação do fármaco e placebo.

Aos Dra. Rosane Bittencourt e Prof. Dr. Paulo de Tarso Roth Dalcin por aceitarem a tarefa de atuar no comitê de segurança.

Ao Serviço de Patologia Clínica pela amizade e cooperação na coleta, execução dos exames laboratoriais e em disponibilizar a dosagem de metahemoglobina.

À Ingrid Mito pela ajuda em informática

À Daniela Benzano, Mathias Azevedo Bressel e Vania Naomi Hirakata pela ajuda estatística.

Aos profissionais, pós-graduandos (em especial à Elvira Cordeiro e à Cíntia Cichowski) e aos estagiários (em especial a Diógenes Hickmann) do Serviço de Hematologia, pela amizade e ajuda.

Aos profissionais do Ambulatório de Hemoglobinopatias, zona 13 por facilitar o atendimento mais freqüente dos pacientes.

Ao HCPA que estimula seus funcionários a buscar educação continuada, formação acadêmica e oferece o indispensável apoio do GPPG.

Aos pacientes que participaram do ensaio clínico, pela compreensão, entusiasmo e esperança na busca de mais uma opção de tratamento para sua doença.

À Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda pela doação de 30 kg de Cloridrato de Arginina.

Ao Antônio, inseparável companheiro de 36 anos, pelo incentivo, auxílio com o banco de dados, correções e críticas.

A Camila pela ajuda, em muitas noites e muitos domingos, com o manejo do computador, na construção do banco dados e das figuras.

Ao Eduardo, o filho que está distante, pelo exemplo de buscar a formação acadêmica.

A Vó Nini, minha querida mãe, pelo carinho de sempre e compreensão dos muitos fins de semanas sem visita.

Ao PPGCM pela qualidade do ensino, pelo incentivo e apoio.

Rota  
a infrequentedada rota  
pode dar certo  
vai depender da tua disposição  
das tuas íntimas percepções  
das agudas certezas  
que orientam teus passos  
e das emocionadas batidas  
de teu lírico coração

Poema de Camilo Xavier  
2006

## Lista de Figuras:

Figura 1: Hemólise intravascular reduz a atividade do ON.....	16
Figura 2: Fenótipos da doença falciforme .....	18
Figura 3: Níveis plasmáticos de arginina e arginase em doença falciforme.....	20
Figura 4: O ciclo vicioso hemólise .....	21
Figura 5: Metabolismo da Arginina .....	44
Figura 6: Ciclo Uréia.....	45
Figura 7: Alteração no metabolismo da arginina na doença falciforme.....	47

### **Lista de Tabelas:**

Tabela 1: Proporção de nascidos vivos diagnosticados com DF pelo PNTN.....	23
Tabela 2: Proporção de nascidos vivos diagnosticados com o traço falciforme pelo PNTN .....	24

## Sumário:

<b>Agradecimentos:</b> .....	<b>3</b>
<b>Lista de Figuras:</b> .....	<b>6</b>
<b>Lista de Tabelas:</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Revisão de literatura</b> .....	<b>22</b>
2.1 Incidência e prevalência .....	22
2.2 Patogenia.....	24
2.3 Manifestações Clínicas .....	27
2.4 Estratégias de Tratamento.....	37
2.5 Sobrevida.....	39
2.6 Alternativas terapêuticas em estudo .....	40
2.6.1 L-Arginina .....	41
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>49</b>
3.1. Objetivo Geral.....	49
3.2. Objetivo Específico .....	49
3.3 Objetivos Secundários .....	49
<b>4. Referências da Revisão da Literatura:</b> .....	<b>50</b>
<b>5. Artigo</b> .....	<b>68</b>
<b>6. Considerações finais</b> .....	<b>98</b>



## Abreviaturas e siglas

ACTH	Corticotrofina
ACV	Acidente vascular cerebral
CAT	Molécula transportadora de amonoácidos catiônicos
DF	Doença falciforme
DNA	Ácido desoxiribonuclêico
ECDT	Ecocardiograma Doppler transtorácico
FDA	Food Drug Administration
GMP cíclico	3,5 monofosfato de guanosina cíclico
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
Hb	Hemoglobina
HU	Hidroxiuréia
LDH	Desidrogenase láctica
ON	Óxido nítrico
PAD	Pressão no átrio direito
PSAP	Pressão sistólica na artéria pulmonar
PSVD	Pressão sistólica do ventrículo direito
PVC	Pressão venosa central
SON	Sintetase do óxido nítrico
VFRT	Velocidade do fluxo de regurgitação da válvula tricúspide

## Resumo

A doença falciforme (DF), nas duas últimas décadas, tornou-se um problema de saúde global crescente, pela alta incidência (276.168 nascimentos/ ano global e 3.000/ano no Brasil, informe do Programa Nacional de Triagem Neonatal), por apresentar alta morbi-mortalidade e baixa qualidade de vida, mesmo com o atual aumento na sobrevida. A melhora nas curvas de sobrevida, observada em países desenvolvidos, é devida ao diagnóstico precoce, através da triagem neonatal, ao início de tratamento já nos primeiros meses de vida e ao acompanhamento por equipes multiprofissionais especializadas. Uma população grande, desde o nascimento até a idade mais avançada, precisa ser assistida, com o objetivo de prevenir e tratar as complicações da doença, com o firme propósito de minimizar as complicações tardias. A hipertensão arterial pulmonar (HAP) secundária está entre as complicações tardias mais severas e talvez possa ser evitada. Recursos precisam ser alocados, para que os países em desenvolvimento e subdesenvolvidos possam copiar os modelos bem sucedidos das políticas em saúde para DF, para a pesquisa clínica e básica. A Organização Mundial da Saúde incluiu, em 2006, a DF na lista de prioridade em saúde pública. Nas duas últimas décadas vêm sendo desvendados os complexos mecanismos envolvidos na patogenia da DF, que determinam os eventos vaso-oclusivos recorrentes, a lesão de isquemia/reperfusão, com a superprodução de espécies reativas de oxigênio, a ativação endotelial e a hemólise. A baixa biodisponibilidade tanto do óxido nítrico (ON), agente que regula a vasodilatação, como de seu precursor, a arginina está presente no fenótipo hemolítico da DF, e tem sido responsabilizada pelas manifestações clínicas predominantemente decorrentes de vasculopatia crônica, como HAP, úlceras de perna, priapismo, acidente vascular cerebral (AVC) e inclusive morte súbita. A HAP é definida pela velocidade do fluxo

de regurgitação da válvula tricúspide (VFRT) como  $\geq 2,5\text{m/s}$  em repouso pelo ecocardiograma Doppler transtorácico (ECDT), que apresenta boa correlação com dados de cateterismo cardíaco direito. É encontrada em quase 30% dos adultos e crianças, e é considerado o principal fator de risco de morte entre os adultos, mesmo com níveis limítrofes ou discretamente aumentados, e com sintomas clínicos ausentes ou pouco específicos. A administração de L-Arginina, o substrato do ON e que está com seu metabolismo alterado na hemólise crônica, é uma estratégia para aumentar a produção do ON, reduzir a hemólise, o dano oxidativo e a disfunção endotelial que levam a HAP.

Objetivo: Avaliar o efeito da suplementação de L-Arginina na dose de  $0,1\text{g/kg/dia}$  por 6 meses na pressão arterial pulmonar, estimada pela velocidade do fluxo de regurgitação tricúspide medida por ECDT e no grau de hemólise, estimada pelo nível sérico da desidrogenase láctica.

Métodos e resultados: Ensaio clínico randomizado, duplo-cego foi conduzido em 40 pacientes com DF de uma coorte do Serviço de Hematologia do HCPA, 20 receberam placebo (Manitol) e 20 receberam L-Arginina na dose  $0,1\text{g/kg/dia}$  por 6 meses. Os grupos eram comparáveis quanto a sexo, idade, genótipo, grau de anemia, grau de hemólise, esquema terapêutico concomitante e complicações da doença, apenas o nível de creatinina foi significativamente diferente, mas em ambos os grupos dentro dos limites da normalidade. As variáveis: velocidades do fluxo de regurgitação tricúspide (VFRT), como estimativa da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) e da pressão sistólica da artéria pulmonar (PSAP) por ECDT, peso, pressão arterial sistêmica, hemograma, hemoglobina fetal (HbF), metahemoglobina, níveis séricos de desidrogenase láctica (LDH) e creatinina foram avaliadas antes e ao final do tratamento. A avaliação da função pulmonar foi realizada conforme as

diretrizes de 2002 da Sociedade Brasileira de Pneumologia e o exame radiológico de tórax foram realizados em data próxima ao estudo. Ao final do tratamento os pacientes que receberam L-Arginina apresentaram uma redução estatisticamente significativa do nível da LDH ( $p=0,03$ ), com concomitante discreto aumento da hemoglobina sem significância estatística ( $p=0,65$ ). Onze pacientes apresentavam HAP,  $VFRT \geq 2,5\text{m/s}$  (27,5%), destes seis receberam L-Arginina, e cinco Placebo, sendo que um paciente do grupo Placebo não realizou a avaliação final da PAP. Houve uma pequena redução da VFRT no grupo tratado com L-Arginina, enquanto que nos quatro, que receberam Placebo, houve pequeno aumento da VFRT, sem significado estatístico ( $p= 0,29$ ). Não houve diferença no peso, no nível de hemoglobina, na hemoglobina fetal, no número de hospitalizações durante o tratamento, nem na impressão de melhora subjetiva pelos pacientes, ao final do tratamento, que foi bem tolerado.

**Conclusões.** A suplementação com L-Arginina, na dose administrada por seis meses, promoveu significativa redução da hemólise avaliada em 19 pacientes através da dosagem da LDH e uma tendência à redução da VFRT no pequeno grupo de seis adultos com HAP sem significado estatístico.

**Descritores:** Doença falciforme, hemólise, L-Arginina, óxido nítrico, endotélio, hipertensão arterial pulmonar, LDH.

## 1. Introdução

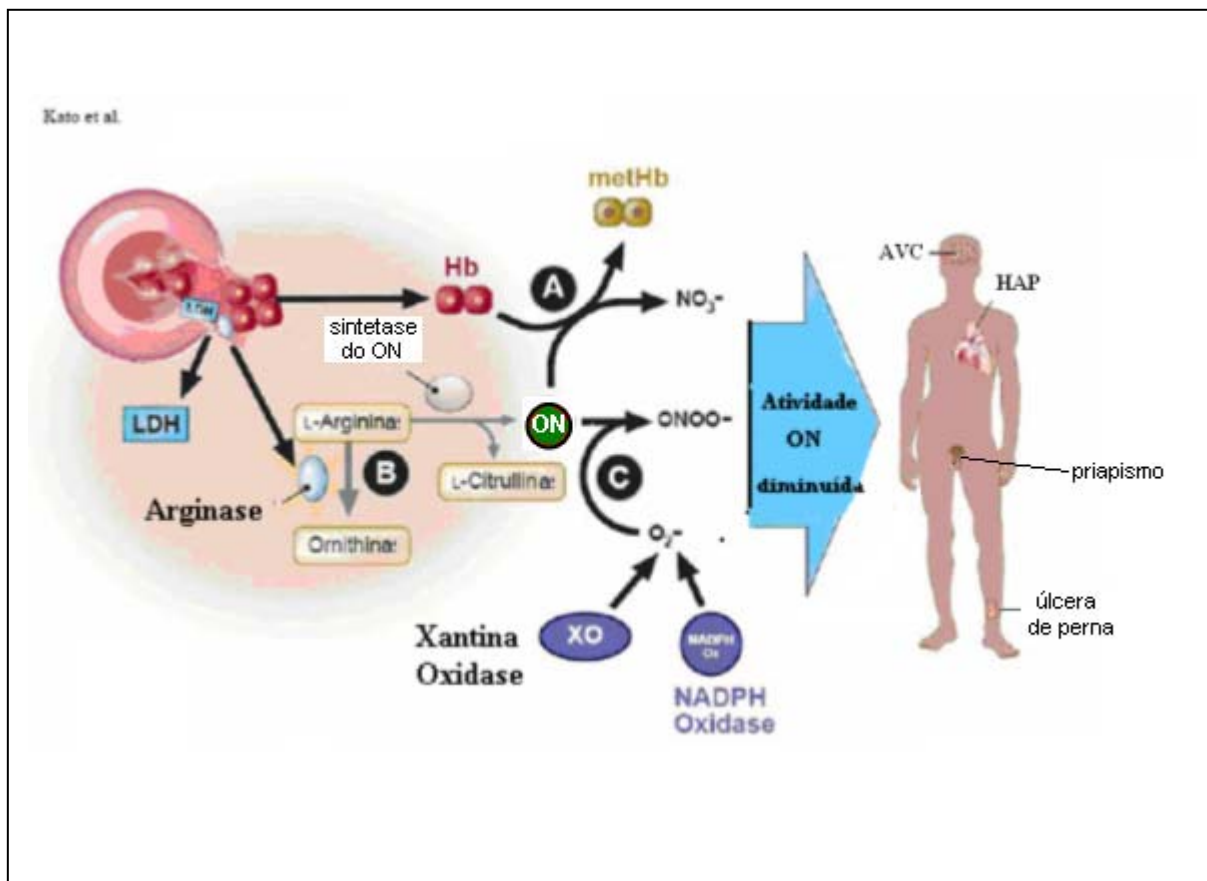
A doença falciforme (DF) é uma hemoglobinopatia grave, doença hereditária monogênica, decorrente de uma mutação pontual no gene que codifica a molécula  $\beta$  globina, de herança autossômica recessiva. A mutação determina a base molecular da doença, onde a substituição de um único aminoácido na cadeia  $\beta$  globina dá origem à hemoglobina S (HbS ou HBB: glu6val), que quando desoxigenada, no citoplasma dos eritrócitos, polimeriza provocando enrijecimento dos eritrócitos (1). Tem elevada prevalência na população mundial, sendo maior em regiões tropicais da África, mas que como consequência do tráfico de escravos e imigrações pode ser encontrada em qualquer parte do mundo (2, 3). No Brasil dados do Data SUS Ministério da Saúde estima o nascimento de 3.000 crianças com DF ao ano, a partir de dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal de 12 estados brasileiros. A DF é a doença hematológica hereditária mais freqüente no Brasil, e estamos vivendo uma transição epidemiológica, com bebês sendo diagnosticados ao nascimento, necessitando tratamento precoce, acompanhamento e tratamento eficaz para toda vida, buscando minimizar as complicações agudas e crônicas. A DF, agora, tem aumento da visibilidade, exige recursos financeiros adequados e torna-se um problema de saúde pública (4).

Os indivíduos homozigotos (SS) ou duplo heterozigotos para outras  $\beta$  hemoglobinopatia (SC, S $\beta$ talassemia) são os que apresentam os sintomas da doença. A DF é caracterizada por anemia, dores episódicas severas, complicações com risco de vida e dano tecidual crônico(1). A falta de deformabilidade dos eritrócitos pela polimerização da hemoglobina S desoxigenada, por muitos anos, foi considerada a causa da vaso-oclusão e isquemia recorrentes (5). Estudos clínicos, *in vitro* e em camundongos transgênicos, com início nos anos 90, na tentativa de

explicar a variabilidade de sintomas e manifestações clínicas, nos levam ao melhor entendimento dos complexos fenômenos associados e envolvidos na patogenia da DF.

A presença de hemólise representa um novo paradigma da DF. Os polímeros de HbS e a maior auto-oxidação da HbS provocam a hemólise e a vaso-oclusão, mas não há apenas a formação de tampões de eritrócitos seqüestrados na microcirculação, causando hemólise e isquemia. Os dois fenômenos, a polimerização da HbS e a hemólise, desencadeiam uma cascata de eventos que consomem o ON provocando vasoconstrição, lesão isquemia/reperfusão, produção de radicais livres de oxigênio, inflamação local e sistêmica, resultando em disfunção endotelial com secreção de endotelina-1, mais consumo de ON, ativação de moléculas de adesão, e ativação da coagulação (6), com a conseqüente lesão tecidual aguda e crônica (7). O ON é produzido pelas células endoteliais a partir da arginina, tem a função de regular a vasodilatação, através da ativação da guanilato ciclase solúvel que produz o 3'5' monofosfato guanosina cíclico nas células da musculatura lisa vascular, responsável pela vasodilatação (8-10). Também é um agente anti-oxidante (11), anti-inflamatório, modulador da expressão de moléculas de adesão (12), anticoagulante (10) e inibidor da proliferação endotelial (13) e é apontado como indutor da síntese de hemoglobina fetal(14). O ON aparece como um fator central na patogenia da vasculopatia da DF (Figura 1), onde está diminuído (15). As reações que provocam esta redução são não enzimáticas: efeito da química Fenton, devido a presença de hemoglobina e de ferro livres o ON é metabolizado a nitrato e nitrito e transforma hemoglobina em metahemoglobina (16), e enzimáticas: ON é degradado a peróxido de nitrito pela ação das enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase, liberadas por células endoteliais e neutrófilos hipóxicos, ou ainda

pela ação da sintetase do ON não ligada a arginina, devido a deficiência de arginina que é degradada em ornitina, pela arginase liberada na lise eritrocitária. Este estado de deficiência relativa de ON e disfunção endotelial na circulação pulmonar provocando vasoconstrição e remodelamento vascular (17) está relacionado ao desenvolvimento de HAP (18, 19). Também está presente em camundongos transgênicos com DF (20) e em outras doenças hemolíticas crônicas, como na  $\beta$  talassemia maior e intermédia, na esferocitose congênita, na hemoglobinúria paroxística noturna e anemia hemolítica microangiopática (21, 22). HAP primária e a HAP secundária associada a colagenoses compartilham a mesma patogenia (17). (Figura 1)



**Figura 1:** Hemólise intravascular reduz a atividade do ON adaptado de Kato, GJ(15). Hemólise libera hemoglobina, arginase e LDH, limitando a biodisponibilidade do ON tanto diminuindo a sua síntese como a sua destruição. ON reage com hemoglobina formando metahemoglobina e nitrato(A). Arginina, o substrato para a síntese de ON pela sintetase do ON, é degradada a ornitina enzimaticamente pela arginase plasmática(B).LDH é um indicador do grau de hemólise: quantidade de hemoglobina e arginase liberadas. ON é inativado pelos radicais livres de oxigênio produzidos pela xantina oxidase, NADPH oxidase e sintetase do ON não acoplada a arginina produzindo peroxinitrito ONOO<sup>-</sup> (C). Redução da biodisponibilidade do ON na DF está associada com as manifestações HAP, priapismo, úlcera de perna e possivelmente AVC isquêmicos(23)

A suplementação com L-Arginina promove aumento de ON (24), com redução da hemólise e do dano oxidativo, revertendo o estado de deficiência de ON e de resistência ao ON (20, 23).

Na DF os pacientes apresentam anemia hemolítica crônica, crises dolorosas episódicas e severas, sepse, síndrome torácica aguda, seqüestro esplênico, acidente vascular cerebral, danos agudos e crônicos em múltiplos órgãos levando à doença pulmonar crônica e à HAP, determinando baixa qualidade de vida e baixa expectativa de vida (1). As manifestações clínicas são muito variáveis e são



influenciadas por fatores ambientais, sócio-econômicos e alterações epigenéticas associadas (25, 26). Mutações adicionais atuam como agravantes ou atenuantes das manifestações clínicas e complicações. A mutação no gene da peroxidase (27) pode provocar mais infecção, no gene da UDP glicoroniltransferase (28), maior níveis de bilirrubinemia não conjugada (28), no gene da cadeia  $\gamma$  globina maior produção de Hb F, que é o inibidor natural da polimerização da HbS (29-32), no gene da haptoglobina, maior síntese de haptoglobina e maior capacidade de neutralizar a hemoglobina livre (33). Algumas destas mutações podem ser analisadas como múltiplos polimorfismos de 1 nucleotídeo: *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) já descritos na HAP (25).

O maior entendimento dos mecanismos vaso-oclusivos e das lesões provocadas pela hemólise intravascular crônica permitem identificar dois fenótipos distintos na DF, onde há predomínio de um ou de outro fenômeno, mas também situações intermediárias com superposição variáveis dos dois fenótipos. Nos indivíduos com o fenótipo vaso-oclusivo, as crises algicas, a síndrome torácica aguda e a osteonecrose são mais freqüentes. Os pacientes apresentam leucocitose e menor grau de anemia. No fenótipo hemolítico, a HAP, as úlceras de perna, a colelitíase, o priapismo e o AVC são mais freqüentes. Os pacientes apresentam maior grau de anemia, de hiperbilirrubinemia e de disfunção endotelial (Figura 2).



**Figura 2:** Modelo de sobreposição de subfenótipos na DF adaptado de Kato,GJ (15). Pacientes com DF e altos níveis de hemoglobina apresentam maior frequência de complicações relacionadas aos fenômenos vaso-oclusivos por maior viscosidade, falciformação e adesividade: crises algicas vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e osteonecrose. Em oposição, pacientes que apresentam maior grau de disfunção endotelial pela hemólise, provocando vasculopatia proliferativa e vasoconstrição desenvolvem úlceras de perna, priapismo, HAP e possivelmente AVC não hemorrágico têm níveis mais altos dos marcadores de hemólise: maior grau de anemia, reticulocitose, LDH e arginase elevados. O espectro de prevalência e de severidade de cada um destes subfenótipos podem ser sobrepostos. Pacientes com traço  $\alpha$  talassêmico tendem a apresentar menos hemólise e mais fenômenos vaso-oclusivos. O efeito do aumento da HbF reduz tanto a hemólise como a vaso-oclusão.

Nos países desenvolvidos pacientes com DF apresentam melhor sobrevida. Consequente da melhora no manejo clínico, do diagnóstico precoce através da triagem neonatal, do uso de penicilina profilática (34), das imunizações especiais, e do melhor treinamento na identificação precoce dos sinais de complicações graves, como síndrome torácica aguda e seqüestro esplênico (35). Também pelo desenvolvimento de centros especializados, com o pronto atendimento por equipes de saúde treinadas e a administração de hidróxiuréia (HU)(36). Nos países onde estas medidas ainda não foram implementadas, como em alguns países africanos

ainda não há dados definitivos, mas é provável que a sobrevida média seja ainda de 5 anos (37).

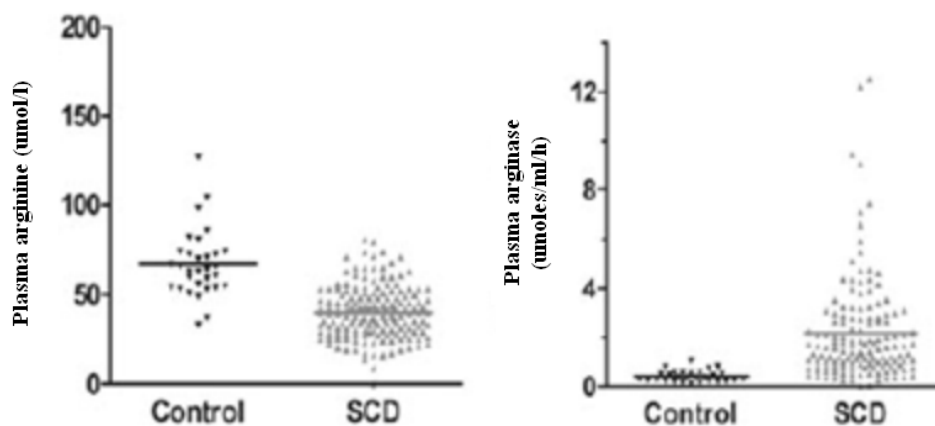
A melhor compreensão da patogenia da doença permite a procura por uma terapêutica mais eficaz, antagonista dos fenômenos, que determinam o comprometimento multi-sistêmico, como aumento da viscosidade sanguínea, vaso-oclusão, hipóxia, dano oxidativo, lesão de isquemia/reperfusão, hemólise, inflamação aguda e crônica, neoformação vascular e fibrose. O tratamento deve ser instituído precocemente e com segurança para evitar as lesões tardias. Devido ao aumento da sobrevida, um número maior de pacientes desenvolve HAP. A hipertensão arterial pulmonar está associada à maior risco de morte (38, 39) e ainda com poucas opções de tratamento.

Em nosso estudo a estimativa da HAP foi analisada pela velocidade do fluxo de regurgitação tricúspide (VFRT). A VFRT é determinada pelo método não invasivo ECDT, permite calcular a pressão sistólica arterial pulmonar através da equação modificada de Bernoulli  $PSAP=(4V^2+5)$  onde 5 mm é o valor da pressão venosa central estimada para todos os pacientes, sem estenose pulmonar (40). A estimativa da PSAP pela VFRT apresenta boa correlação com o método invasivo de cateterismo cardíaco direito (41, 42). Foi validada em pacientes com DF e níveis  $\geq 2,5$  m/s, que está acima de dois desvios padrão da normalidade, pode ser usado como biomarcador de severidade da doença (38).

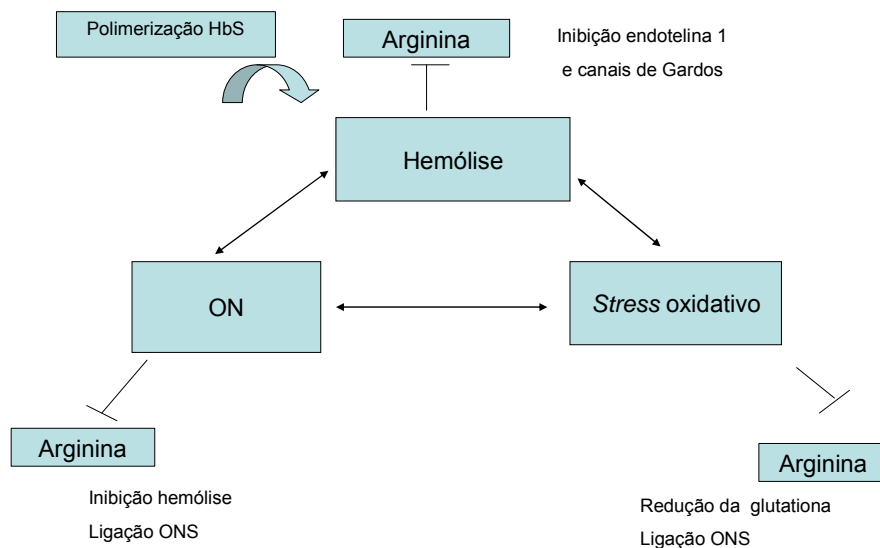
A exemplo de muitas patologias humanas, a associação de múltiplas medidas terapêuticas provavelmente é a melhor estratégia de tratamento (43). Medidas educacionais de pacientes, através do auto cuidado, aos cuidadores e à equipe multiprofissional, associadas à medicação, terapia transfusional (44, 45) e em alguns

casos com transplante de células tronco (46) fazem parte do tratamento atual e novos medicamentos estão sendo testados (47).

O objetivo desta tese foi testar a eficácia da L-Arginina comparada a placebo em ensaio clínico randomizado e duplo cego. L-Arginina foi associada ao tratamento padrão para DF, administrada via oral, na dose de 0,1g/kg/dia, três vezes ao dia. Adultos com DF têm níveis séricos de arginina baixos e durante crises vaso oclusivas tanto adultos como crianças apresentam-se depletados de arginina. A arginina é metabolizada a ornitina pela ação da arginase liberada na hemólise (48, 49) (Figura 3). Esta suplementação procura: promover a síntese do ON: revertendo o estado de vasoconstrição (24); diminuir a ativação dos canais de Gardos via endotelina-1 (50, 51) impedindo hemólise e por fim diminuir o *stress* oxidativo, pois, aumenta a síntese de glutathione e evita que a sintetase do óxido nítrico desocupada vá formar superóxido a partir do ON (52, 53) (Figura 4).



**Figura 3: Níveis plasmáticos de arginina e arginase em 288 pacientes adultos com DF: níveis plasmáticos mais baixo de arginina e atividade de arginase aumentada em relação a 36 controles normais, adaptada de Morris C(49).**



**Figura 4:** O ciclo vicioso hemólise, resistência ao óxido nítrico, *stress oxidativo* é interrompido pela suplementação de Arginina, adaptado de Krajewski ML (54). Na DF a HbS polimerizada leva a hemólise, redução do ON e dano oxidativo. Hemoglobina livre no plasma provoca consumo de ON e aumento de radicais livres. Hemólise libera arginase, que degrada a arginina. Hemoglobina livre causa *stress oxidativo* por peroxidação e efeito Fenton, produzindo NO<sub>2</sub> e nitrogenação de proteínas. Resistência ao NO é agravada por mais consumo de NO pela produção de superóxido pela ação das enzimas xantina oxidase e ADPH oxidase. O *stress oxidativo* perpetua o ciclo danificando mais eritrócitos e provocando hemólise. A suplementação com Arginina atinge esta tríade patogênica aumentando a formação de ON, reduzindo a hemólise e o *stress oxidativo*.

Dois ensaios clínicos prévios (55, 56) e duas jovens com DF e HAP foram o estímulo para a realização deste ensaio.

A primeira parte constituiu-se na revisão da literatura sobre DF com foco na prevalência e incidência, patogenia, manifestações clínicas e tratamento.

Na segunda parte é constituída pelo artigo.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Incidência e prevalência

No mundo há estimativa de 250.000 nascidos/ano com DF, a grande maioria na África (4, 57, 58). Há 60.000 pacientes nos Estados Unidos da América do Norte e 10.000 na Inglaterra (57). Há alta frequência do gene da HbS na África tropical, nas nações que participaram do tráfico de escravos africanos, principalmente nas Américas, e em menor frequência na bacia do Mediterrâneo, na Arábia Saudita e em partes da Índia (59, 60), e devido a imigrações recentes, nos últimos 15 anos, tem frequência crescente em países da Europa (37, 61). O gene HbS confere vantagem genética, protege o portador heterozigoto de formas graves de malária pelo *Plasmodium falciparum* (62).

Doença falciforme pode apresentar-se com o genótipo SS: forma homozigótica, a mais grave, também denominada anemia falciforme, ou com as formas heterozigóticas: combinações da hemoglobina S com outras variantes hemoglobínicas. Os tipos mais frequentes em nosso meio são a hemoglobinopatia SC, combinação heterozigótica S:  $\beta$  6glu $\Rightarrow$ val, com a hemoglobina C:  $\beta$  6glu $\Rightarrow$ lis (outra mutação pontual no gene da molécula  $\beta$  globina) e a S  $\beta$ -talassemia, combinação heterozigótica com  $\beta$ -talassemia, onde um dos genes  $\beta$  globina apresenta deleções com graus variáveis de diminuição da síntese desta globina, podendo ser identificada como S  $\beta$ + -talassemia o S  $\beta$ 0 -talassemia, dependendo da quantidade cadeias  $\beta$  produzidas. Existem 5 haplótipos da HbS: Senegal, Benin, Bantu, Camarão e Arab-India (63, 64), no Brasil, as mutações africanas são predominantes (65, 66).

A incidência da DF em recém nascidos varia de 0,1/1000 em regiões não endêmicas a 20/1000 em partes da África (67). Em Porto Alegre, um estudo piloto determinou a incidência do traço falciforme em 1 em cada 69 recém-nascidos(68). O Laboratório de Rastreamento Neonatal da Faculdade de Farmácia - UFRGS, Porto Alegre, identificou no ano de 2002, 13 casos de DF em nosso Estado, 1 / 9017 recém-nascidos, e obteve o mesmo índice de prevalência do traço falciforme do estudo piloto já citado (69).

Nos Estados Unidos da América do Norte a incidência de DF é de 1 para cada 600 afro-descendentes (70, 71).

No Brasil, segundo os dados do Data-SUS Ministério da Saúde, nascem 3000 crianças/ano com DF e a incidência de DF e do traço falciforme, obtidos em 12 estados brasileiros, através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) estão representados nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

**Tabela 1: Proporção de nascidos vivos diagnosticados com DF pelo PNTN**

Estados	Proporção/ Nascidos Vivos
Bahia	1: 650
Rio de Janeiro	1: 1.200
Pernambuco, Maranhão, M Gerais, Goiás	1: 1.400
Espírito Santo	1: 1.800
São Paulo	1: 4.000
Mato Grosso do Sul	1: 5.800
Rio Grande do Sul	1: 11.000
Santa Catarina e Paraná	1: 13.500

Data-Sus Ministério da Saúde 2008

**Tabela 2: Proporção de nascidos vivos diagnosticados com o traço falciforme pelo PNTN**

Estados	Proporção/Nascidos Vivos
Bahia	1: 17
Rio de Janeiro	1: 21
Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais	1: 23
Espírito Santo, Goiás	1: 25
São Paulo	1: 35
Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina	1: 65

Data-Sus Ministério da Saúde 2008

No centro de atenção global aos portadores de hemoglobinopatias do HCPA 160 pacientes com DF recebem atendimento especializado regularmente.

## **2.2 Patogenia**

A base molecular da DF é conhecida há mais de 50 anos, é considerada a primeira doença molecular descrita em humanos, por Linus Pauling em 1948 (72), a compreensão da patogenia da DF progrediu nos últimos 20 anos, assim como o seu tratamento evoluiu nos últimos 28 anos.

A presença da hemoglobina S é a responsável pela patogenia da doença. A hemoglobina S ocorre por uma mutação pontual no gene da cadeia  $\beta$  globina, localizado no cromossomo 11. Esta mutação é determinada pela troca de um nucleotídeo, a timina que é substituída por adenina no sexto códon do gene da  $\beta$  globina, levando a uma alteração na codificação de um único aminoácido, o ácido glutâmico é trocado por valina. Esta pequena alteração estrutural da molécula de hemoglobina é a responsável pelas marcadas alterações de estabilidade e de solubilidade desta molécula (73), provocando sua polimerização quando desoxigenada, através de pontes de contatos hidrofóbicos entre a valina mutante de uma molécula globínica S com alanina, fenilalanina e leucina outra molécula globínica adjacente (74). Esta polimerização se desfaz rapidamente após a



reoxigenação, no entanto pode ser irreversível nos eritrócitos severamente desidratados e danificados pelo *stress* oxidativo (75).

A polimerização da hemoglobina S desoxigenada, também em camundongos transgênicos, comprovadamente é o evento primário (76), que vai provocar alteração da reologia dos eritrócitos, isto é, do comportamento mecânico destas células, que vão apresentar diminuição da sua capacidade de deformação, determinando a falciformação ou falcização das mesmas (77). Os eritrócitos falciformados desenvolvem lesão de membrana decorrente da oxidação dos lipídios. A presença da Hb S, que sofre mais auto-oxidação, aumenta a concentração de espécies reativas de oxigênio intra-eritrocitário (78). Como consequência ocorre o dano oxidativo, com a peroxidação dos lipídios da membrana e das proteínas do citoesqueleto, podendo causar dano irreversível e provocar a lise. Os eritrócitos falciformados têm a permeabilidade de membrana aumentada, perdem potássio, recebem cálcio e são mais densos, os canais de Gardos estão ativados, provocando desidratação e intensificando a falciformação (79-82). Os eritrócitos, no estado basal, tem a sobrevida média encurtada para 35,4 dias, que cai para 16,6 dias durante as crises vaso-oclusivas (83). Estes fenômenos ocorrem durante o trânsito em capilares e os eritrócitos deformados são seqüestrados na porção venosa da microcirculação.

Os eritrócitos falciformados, irreversivelmente, rompem na circulação, hemólise intravascular, liberando hemoglobina livre no plasma (diariamente 10% dos eritrócitos hemolisam e 30g de hemoglobina é liberada no plasma) (84), ou são fagocitados pelos monócitos e macrófagos principalmente do baço e do fígado (85), hemólise extravascular.

A liberação de hemoglobina livre na corrente sanguínea, que possui menor defesa contra os radicais livres, do que no ambiente intra-eritrocitário, onde a presença de alta concentração de glutathione confere a proteção anti-oxidativa, determina um desbalanço da homeostase oxi/redução, com consumo de ON, radical livre e difusível, e conseqüente vasoconstrição arteriolar. Há maior dano oxidativo, atingindo também as células endoteliais, alterando seu fenótipo, determinando a lesão de reperfusão, ou lesão de cisalhamento (13). No processo hemolítico a arginase intraeritrocitária é liberada na circulação (84), provocando diminuição da disponibilidade da arginina, com menor geração de ON, contribuindo ainda com mais um mecanismo para aumentar a lesão isquêmica. Nos locais de lesão por reperfusão há reações de adesão destes eritrócitos falciformados com as células endoteliais danificadas, plaquetas ativadas, leucócitos ativados, fatores de coagulação ativados, moléculas plasmáticas e da matriz extracelular exposta pela lesão endotelial, com diminuição de prostaciclina, aumento de endotelina-1 e prostaglandinas (86), além de aumento de fatores angiogênicos (87). A partir de 1997 os modelos experimentais, com a segunda geração de camundongos transgênicos *knockout*, expressando exclusivamente globinas humanas, permitiu o melhor entendimento da patogenia da DF (88).

Os eventos mecânicos e moleculares ocorrem em ciclo vicioso, determinam obstrução em vênulas com isquemia tissular (89-93), disfunção endotelial, gera espécies de oxigênio reativo (7) desencadeando um estado inflamatório permanente (94, 95) com danos agudos e crônicos aos tecidos e órgãos, responsáveis pelas manifestações clínicas e por lesões silenciosas, denominados eventos hipóxicos subclínicos, detectados especialmente no cérebro em imagens de ressonância

magnética (96) e nos outros órgãos, na maioria das vezes, somente em necropsias (97).

### **2.3 Manifestações Clínicas**

A DF é heterogênea na sua apresentação, com graus diferentes de severidade das complicações, mesmo dentro de genótipos idênticos, sugerindo interações de outros genes modulando a sua fisiopatologia, assim como fatores ambientais (15). Os efeitos das lesões orgânicas crônicas devem ser procurados precocemente, sem esperar por manifestação clínicas, para orientar a terapêutica mais adequada, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida e a sobrevida (98).

Na DF ainda não há um modelo robusto capaz de prever, precocemente, os efeitos adversos como morte, hospitalizações freqüentes, síndrome torácica aguda. Dispomos da eco Doppler transcraniana capaz de prever o risco de AVC (44), os demais marcadores de gravidade como os sugeridos pelo Grupo Cooperativo de Doença Falciforme Dallas, Texas, USA, que leva em consideração datilite no primeiro ano, anemia severa  $< 7\text{g/dL}$  ou leucocitose  $> 20.000/\text{uL}$  em crianças durante o segundo ano de vida e em períodos sem crises, não tem a capacidade de prever como será a evolução desta complexa doença (99). A desidrogenase láctica (LDH) é considerado um biomarcador de hemólise intravascular, apresenta boa correlação com níveis plasmáticos de hemoglobina livre, arginase e de moléculas de adesão solúveis secretadas por células endoteliais. Níveis elevados de LDH está associado ao subgrupo de pacientes com DF e o fenótipo de disfunção endotelial, com maior incidência de úlcera de perna, hipertensão arterial pulmonar, priapismo, anemia hemolítica severa e resistência ao óxido nítrico (100). Os níveis de LDH também correlacionam com doença vascular cerebral (101). A grande variabilidade das

manifestações clínicas também é devida a outros polimorfismos genéticos, como determinantes, por exemplo, do nível de hemoglobina fetal (29-32) e de haptoglobina (33).

As manifestações clínicas da DF iniciam-se geralmente aos 3 meses de idade quando diminui fisiologicamente a concentração de hemoglobina F (102-108), são decorrentes destas, freqüentes crises vaso-oclusivas em qualquer tecido ou órgão, acompanhadas de intensa dor, principalmente nos ossos, tórax e abdome. Esta isquemia compromete a função e, muitas vezes, determina dano irreversível aos órgãos (109).

As manifestações clínicas mais características são listadas a seguir:

1. Síndrome Mão Pé: episódios de dactilite em mão e pés ocorrem em crianças a partir dos 6 meses até os 3 anos de idade. Consiste de edema, não eritematoso e doloroso, principalmente das articulações dos pequenos ossos dos pés e mãos. Pode ser acompanhada de febre e leucocitose. As alterações radiológicas são: edema de partes moles e afinamento do osso cortical, que pode progredir para a destruição dos ossos metacarpianos, metatarsianos e falanges (107).
2. Crise Hemolítica: súbito aumento da anemia sem fenômenos vaso-oclusivos, causando insuficiência cardíaca e morte em poucas horas.
3. Crises Dolorosas em Ossos e Articulações: a circulação sinusoidal da medula óssea é um local ideal para a falciformação dos eritrócitos provocando isquemia. Após o primeiro ano de vida ocorrem crises dolorosas em ossos longos, coluna, costelas e articulações. Pode ocorrer infarto ósseo e edema de articulações. Complicação freqüente é

a necrose asséptica de colo de fêmur e de úmero, uni ou bilateral, que muitas vezes requer a substituição por próteses (110-115).

4. Crise de Dor Abdominal: causada por pequenos infartos mesentéricos e de vísceras abdominais, colecistite, seqüestro esplênico e infecção urinária (116).
5. A crise de Seqüestro Esplênico: com alto risco de vida é caracterizada por súbito aprisionamento de sangue no baço, com marcada anemia (queda de 2g/ dl na hemoglobina) e aumento agudo do baço. Ocorre em crianças pequenas de 6 meses a 2 anos, antes da asplenia provocada por infartos e fibrose. Estas crises geralmente são concomitantes a infecções respiratórias, e tendem a ser recorrentes (117). Há choque hipovolêmico e pode levar a morte em horas (118). Os múltiplos infartos esplênicos recorrentes determinam asplenia, após os primeiros anos de vida.
6. Síndrome Torácica Aguda: caracterizada por febre, taquipnéia, dor torácica, leucocitose e infiltrado pulmonar, é a segunda causa mais freqüente de morbidade e a mais comum de mortalidade, há dificuldade de determinar o componente embólico, isquêmico e infeccioso, estando geralmente todos envolvidos na etiologia desta síndrome (119).
7. Doença Pulmonar Crônica: relacionada aos repetidos episódios de trombozes, infartos, embolias gordurosas, vasculopatia e infecções. É caracterizada pela diminuição da radiotransparência, por fibrose, espessamento da íntima, proliferação dos músculos lisos dos vasos; todas estas alterações acabam provocando diminuição moderada a severa da função pulmonar, determinando doença pulmonar restritiva,

obstrutiva ou combinada, com diminuição da capacidade vital, das trocas gasosas, hipoxemia (120-122) e HAP. Anormalidades dos testes de função pulmonar pode ser o primeiro sinal objetivo de doença pulmonar crônica em DF (123). A partir de 1990 estudos ecocardiográficos mostram que muitos pacientes com DF desenvolvem HAP (63). Anteriormente, a maioria dos dados eram obtidos apenas em exames de necrópsia. A HAP é acompanhada de sintomas como dispnéia aos esforços, cansaço, dor torácica e até síncope. A doença crônica pulmonar e a HAP são as duas principais causas de morte em pacientes com DF (38, 124-126) e a segunda está associada à morte súbita (127). A sobrevida média de pacientes com hipertensão arterial pulmonar é de 26 meses (124). A maioria dos pacientes apresentam discreto aumento na pressão da artéria pulmonar (128), provavelmente nestes pacientes o sistema cardiovascular já está nos limites de compensação, e não sobrevivem até desenvolver níveis pressóricos mais elevados. HAP é uma complicação de outras anemias hemolíticas como talassemia intermediária ou maior e esferocitose hereditária (22). A hemólise intravascular, através do efeito de consumir o ON, tem um papel importante no desenvolvimento de HAP, tanto em adultos como em crianças a partir de 10 anos (100, 129). Pacientes com HAP nem sempre apresentam crises dolorosas freqüentes ou significativas (130). Durante as crises falcêmicas e o exercício a HAP pode aumentar agudamente, causando insuficiência ventricular direita e arritmias (127). O ECDT é recomendado a todos os pacientes com DF periodicamente, durante a vida e nas crises vaso-oclusivas especialmente aqueles com

HAP prévia (126). A dosagem NT-proBNP (fragmento amino terminal do Peptídio Natriurético tipo B) sérico apresenta boa correlação com HAP (131, 132).

8. Crise de Seqüestro Hepático: é menos freqüente do que a crise do seqüestro esplênico, também é caracterizada por súbito aumento do fígado por aprisionamento de sangue nesta víscera, com marcada anemia (queda de 2g/dl na hemoglobina). Determina choque hipovolêmico e pode levar a morte em horas (133).
9. Doença Hepática Crônica: aumento moderado do fígado está presente a partir do primeiro ano de vida e persiste na vida adulta. Há diminuição da função hepática e medicações metabolizadas pelo fígado devem ser usadas com cuidado, devido a infartos sub-capsulares, intra-parenquimatosos. São freqüentes também colédoco e colelitíase (134, 135). Hepatites virais podem ocorrer devido à hemoterapia. A hepatite C pode estar presente em 21% dos pacientes (136) e muitos apresentam hepatite crônica e cirrose, com necessidade de transplante hepático (137).
10. Gastrointestinais: pacientes com DF não apresentam maior incidência de úlcera duodenal. Colite isquêmica grave é rara, bem como pancreatite (138-143).
11. Sistema Cardiovascular: há cardiomegalia devido à sobrecarga cardíaca pela anemia crônica, oclusões recorrentes das arteríolas pulmonares e hemossiderose cardíaca. Estes fatores provocam dilatação e hipertrofia de ambos os ventrículos e insuficiência valvulares em crianças e adultos. Geralmente não apresentam doença aterosclerótica, mas

podem apresentar infarto do miocárdio e fibrose do miocárdio. Insuficiência cardíaca congestiva, geralmente ocorre como complicações extra- cardíacas. O desempenho físico é gravemente comprometido, com a capacidade de trabalho reduzida em 50% (144-146).

12. Sistema Nervoso Central: acidentes vasculares cerebrais (AVC) isquêmicos e hemorrágicos em grandes e pequenos vasos são freqüentes. Nas crianças com DF o risco de AVC é 200 vezes maior do que em crianças sem DF. Aos 8 anos de idade, um terço apresenta evidência de infartos cerebrais em imagens de ressonância magnética (96, 147, 148). Na infância são mais comuns os eventos isquêmicos, podendo ser sintomáticos e assintomáticos, já os eventos hemorrágicos são mais freqüentes na vida adulta (149). Decorrente destes AVCs, crianças e adultos apresentam deformidades físicas e neuropsíquicas, com baixo rendimento escolar (150). Dados preliminares de um estudo (Vichinky, E não publicado) em andamento, onde 200 adultos são comparados a 50 indivíduos normais, mostra que 40% apresentam alterações volumétricas em imagens cerebrais de ressonância magnética: atrofia do lobo frontal, temporal, lacunas sub-corticais e diminuição de volume do hipocampo associados com alterações neuropsicológicas, que comprometem o comportamento, a memória e a cognição.

13. Rins: Alterações da função renal podem ser causadas por infartos corticais, depósito de hemossiderina no epitélio dos túbulos convolutos proximais e ainda esclerose. Pode ocorrer necrose de papila. Apresentam hiposternúria, devido à incapacidade de concentrar urina,



os doentes ingerem grande quantidade de líquido. Enurese é uma queixa freqüente em crianças. Apresentam também diminuição da capacidade de excretar o íon hidrogênio, acidose tubular distal, diminuição da excreção de potássio com conseqüente hipercalemia e ainda aumento da reabsorção de fosfato. Hematúria é comum, em episódios curtos ou prolongados devido a ulcerações na pélvis renal, nos locais de infarto da papila. Pode ocorrer obstrução ureteral por coágulos. Síndrome nefrótica não é freqüente, mas ocorre em adolescentes e adultos, e pode evoluir para insuficiência renal. Microalbuminúria ocorre em 46% das crianças(151). Hipertensão arterial ocorre raramente. Pacientes com AF apresentam níveis de pressão arterial inferiores à população em geral. Insuficiência renal crônica ocorre em 4% destes pacientes, com a idade media de 23 anos, necessitando tratamento dialítico e indicação controversa de transplante renal (152, 153).

14. Olhos: a retina é um local vulnerável a oclusão vascular com danos irreversíveis, com hemorragias, proliferação de vasos e formação de anastomoses arteriovenosas. Podem ocorrer também hemorragias vítreas, hemorragias na câmara anterior e descolamento de retina. Estas lesões podem culminar com perda da visão às vezes súbita ou de instalação lenta (154).

15. Úlceras de Perna: o rompimento da pele das porções distais das pernas e região maleolares é um problema recorrente em adultos, sendo mais comum em homens. É causada pela estase do sangue em pequenos

vasos, impedindo a correta cicatrização às mínimas escoriações traumáticas. Pode afetar 75% dos pacientes (155).

16. Crise Aplástica: complicação freqüente, como nas outras doenças hemolíticas crônicas. Ocorre geralmente após um episódio infeccioso, preferencialmente em crianças. Está relacionada à infecção pelo parvovirus humano B19, pelo seu efeito citotóxico direto nos precursores eritróides. Há rápida queda na hemoglobina. Estes episódios são auto-limitados, com recuperação espontânea da hematopoese em 10 dias. Geralmente leucócitos e plaquetas permanecem inalterados, mas pode haver concomitante pancitopenia (156).

17. Crise Megaloblástica: há súbita parada da eritropoese por deficiência de folato devido ao consumo aumentado pela hiperplasia eritróide crônica, associada à baixa ingestão de alimentos, etilismo, ou em situações onde há maior necessidade de folato, como na gravidez e na fase de crescimento (157).

18. Infecções: as bases fisiopatológicas para a grande suscetibilidade a infecções agressivas é a falta da função esplênica (158), a diminuição dos níveis séricos de imunoglobulina M (159), alterações na função de neutrófilos e linfócitos e na ativação do complemento, mas ainda estão em estudo. Em pacientes com DF, a partir dos 6 meses de idade, infecção generalizada pode ser a primeira manifestação de anemia falciforme. Infecção aguda é a causa mais comum de hospitalização, embora não seja a principal causa de morte nos primeiros anos de vida, como nas décadas anteriores, graças ao uso profilático de antibióticos. O agente infeccioso mais prevalente destas infecções severas é o

*Streptococcus pneumoniae* encontrado tanto na corrente sangüínea, como no líquido. A incidência é aproximada de 7/100 nas crianças com menos de 5 anos, sendo 30 a 100 vezes mais freqüente do que em crianças normais, na mesma faixa etária. Mais de 70% das meningites são causadas por *Streptococcus pneumoniae*. O índice de mortalidade na sepse por este agente é de 35%. Por este motivo a prevenção com antibiótico profilático, imunização especial e início de tratamento correto contribuem definitivamente para diminuir o risco de infecção invasiva. Contudo, já há relatos de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina (160-166). A partir dos 5 anos, diminui a incidência das infecções generalizadas e surgem aquelas recorrentes causadas por germes gram- negativos como *Escherichia coli*, associadas às infecções do trato urinário. A osteomielite é outra infecção freqüente e, nestes pacientes, o agente etiológico mais comum é a *Salmonella*, devido aos micro-infartos da mucosa intestinal, mas também podem ser causadas por *Staphylococcus* (167-169). Pacientes com DF também são suscetíveis à infecção pelo Parvovirus Humano B19, que provoca além da aplasia de células vermelhas, crise aplásica, glomerulonefrite, com síndrome nefrótica e insuficiência renal, infecções pulmonares e encefalites (170). Pacientes com DF apresentam boa resposta imunológica à vacinação contra *Haemophilus influenzae* e *S. pneumoniae* (171, 172).

19. Deficiência no Crescimento e Desenvolvimento: as crianças são normais ao nascimento, mas as curvas de crescimento progressivamente ficam abaixo das curvas de crianças normais. A puberdade ocorre mais

tardamente, a menarca ocorre 2 a 3 anos mais tarde do que em meninas normais. Ao chegar à vida adulta, estes pacientes tendem a ter peso e altura quase sempre nos limites inferiores da normalidade. Os níveis de hormônios de crescimento, tireoidianos, ACTH, e cortisol foram normais em uma série de pacientes estudados. O atraso de crescimento e desenvolvimento parece estar associado mais a fatores constitucionais, do que a hipopituitarismo ou mesmo a hipogonadismo, ainda que presente transitoriamente na puberdade (173-177). A hipótese mais provável desta deficiência de desenvolvimento e crescimento é a hemólise crônica, que determina alto consumo de proteínas e aumento do metabolismo basal, não compensados adequadamente por ingestão protéica e calórica. Estudos sugerem que as necessidades de zinco, riboflavina, vitamina B6, ácido ascórbico, vitaminas A e E estão aumentadas (178-189). A deficiência de zinco está associada à hipogonadismo em adultos com DF, e a suplementação de zinco pode promover o crescimento em adolescentes (190, 191).

20. Priapismo: é uma complicação freqüente em pacientes com DF, 5 a 45% apresentam episódios de priapismo, tanto na fase pré-puberal como pós-puberal (192). Pode ocorrer durante ereção normal ou durante o sono. O sangue fica aprisionado nos sinusóides e corpos cavernosos do pênis. Geralmente é auto limitada e de curta duração, mas pode se tornar recorrente e precisar tratamento clínico ou cirúrgico. Estes episódios podem levar a fibrose e a impotência sexual (193).

## 2.4 Estratégias de Tratamento

As estratégias atuais de tratamento previnem parcialmente ou minimizam as manifestações clínicas da DF e existem duas opções curativas, o transplante de células tronco e a terapia gênica.

Medidas educacionais para os pacientes, seus pais ou cuidadores, professores, profissionais da saúde tem papel central na prevenção de complicações, identificação de sinais precoces de complicações graves como sepse e seqüestro esplênico (71).

A inclusão da pesquisa de DF na triagem neonatal , levou a diminuição da morbidade e mortalidade. O diagnóstico através da triagem neonatal permitiu: 1 O início precoce da penicilinoterapia profilática (194, 195), 2 Imunização especial contra *Streptococcus pneumoniae*, meningite meningocócica C e vírus da influenza, (196-198).

Ainda em relação ao tratamento já padrinizado temos o uso de hidroxiuréia (HU) e a hemoterapia.

A HU hidroxiuréia ou hidroxycarbamida, uma droga citotóxica, específica da fase S não DNA hipometilante (199) que reduz a produção de eritrócitos contendo Hb S e que estão em proliferação aumentada. Favorecendo a produção de eritrócitos com maior quantidade de HbF, proveniente de precursores eritróides com menor índice de proliferação. Esta terapêutica tem efeitos benéficos comprovados (36, 200), pela ação de aumentar o conteúdo de HbF (201), produzindo o aumento dos tetrâmeros  $\alpha_2\gamma\beta_S$ , que não polimerizam, sendo um antipolimerizante natural. Os eritrócitos formados sob ação da HU são maiores, com densidade normal, diminuindo a viscosidade sangüínea, sendo também menos aderentes ao endotélio. Recentemente foram demonstrado outros efeitos independentes do aumento da

HbF, é observado a diminuição do nível e da atividade da arginase (202) e com maior geração de ON intravascular e intra-eritrócitário (203), com ação vasodilatadora. O uso de HU reduz o número de crises álgicas, de hospitalizações e necessidade de transfusões sangüíneas. Além disto promove aumento de peso, melhora a capacidade física, sendo bem tolerada por crianças e adultos (204-217). Omo efeito adverso observa-se neutropenia leve, mas que também tem o efeito benéfico de diminuir a viscosidade sangüínea e menor reposta inflamatória, mas é um fator dose limitante (218). Em 1998 foi aprovada pelo FDA para uso em adultos. Ainda não foi observado efeito carcinogênico (218), ou teratogênico (219), mas observação cuidadosa deve ser mantida, quanto a possíveis efeitos mutagênicos ao longo do tempo. Marcadores de danos em DNA tem sido avaliados, inclusive pelo nosso serviço, mostrando uma correlação diretamente proporcional a dose, em ensaios de migração do DNA e de formação de micronúcleos (220, 221). O primeiro paciente a usar HU se mantém em tratamento após mais de 24 anos e não há evidência de piora aguda com a interrupção abrupta da droga (200).

Infelizmente, cerca de 40% dos pacientes não respondem a HU e até apresentam progressão do dano a órgãos (36, 222, 223).

A hemoterapia é indicada para casos específicos: crises hemolíticas, seqüestro esplênico, AVC isquêmicos, em crianças com aumento do fluxo sangüíneo em artérias cerebrais, com uma velocidade igual ou maior do que 200 cm por segundo, detectado ao exame eco Doppler transcraniano (44, 45, 224, 225), crises de aplasia de células vermelhas e síndrome torácica aguda. A maioria dos pacientes recebe ex-sangüíneo transfusão parcial, para evitar o aumento da viscosidade sangüínea e a sobrecarga de ferro. Os pacientes, que desenvolvem AVC isquêmico, permanecem em programa de ex-sangüíneo transfusão parcial,

periódicas, por tempo ainda indefinido, mantendo um nível de hemoglobina S inferior a 30%, com a recomendação de nunca ultrapassar 11g/dl de hemoglobina (226, 227). A correção de anemia por transfusão só é recomendada em situações bem definidas, como seqüestro esplênico e hepático, crise aplásica, síndrome torácica aguda, crise álgica refratária e com indicação ainda controversa no pré-operatório e durante a gestação em pacientes com história de complicações severas. A anemia é um fator protetor para crises vaso-oclusivas, a viscosidade sanguínea na DF é diretamente proporcional a concentração de hemoglobina. Os pacientes politransfundidos podem desenvolver sobrecarga de ferro, quando isto ocorre devem ser submetidos a regimes de quelação do ferro (228). Atualmente dispomos de quelante oral efetivo (229, 230). A transfusão de troca têm o seu papel assegurado no manejo de anemia sintomática, HAP, retardo de crescimento, úlcera de perna, priapismo, seqüestro esplênico, dor crônica incontrolável e especialmente como prevenção de AVC (44, 231-233).

Colecistectomia eletiva é indicada a todos os pacientes que apresentam cálculos biliares (234).

## **2.5 Sobrevida**

A estatística de 1994 do “National Institute of Health” USA, estimou a sobrevida média para homens em 42 anos e para mulheres em 48 anos (235). A mortalidade infantil contribui significativamente para este baixo índice de sobrevida(236). Em países desenvolvidos, há 30 anos apenas 50% das crianças com DF chegavam à idade adulta (237). O seguimento de uma coorte de 711 pacientes diagnosticados ao nascimento e acompanhadas por 18 anos no Children’s Medical Center Dallas USA, 25 morreram de complicações relacionadas à DF: 0,59/100 com a idade média de 5,6 anos (238). Em Londres, de uma coorte de 252 crianças, diagnosticada pela

triagem neonatal e acompanhadas de 1983 a 2005, 2 morreram 0,27/100 (239). Este menor índice de mortalidade está relacionado, como já mencionado, à detecção precoce da doença, cuidados médicos, educação dos pais, cuidadores e professores, uso de penicilina profilática e hidroxiuréia e, em determinados casos, programas de ex-sangüíneo-transfusão crônica e transplante alogênico de medula óssea (36, 196, 240-243).

## **2.6 Alternativas terapêuticas em estudo**

Vários novos agentes terapêuticos estão sendo testados como: 1. ácido valpróico (223), 5-azacitidina (244), pomalidomine e lenalidomina (245) por promoverem a síntese de HbF; 2. clotrimazol (246), senicapoc (ICA-17043) (247) que bloqueiam os canais de Gardos e inibem a desidratação celular; 3. sulfazalazina (248) e Ácido 5-Aminosalicílico (249) inibem a ativação endotelial com ação também antiinflamatória e anti-oxidante; 4. Poloxamer 188 (250), que melhora o fluxo na microcirculação; 5. magnésio, um inibidor do co-transporte  $Ca^{++}$ :  $Cl^{-}$  parece promissor (248, 251-253), o estudo de fase I com pidolato de magnésio associado à hidroxiuréia foi bem tolerado (254); 6. Cloroquina demonstra ação inibitória da arginase testada in vitro (255); 7. glutamina, precursora do glutamato, aumenta a produção de glutathione, ambos diminuídos na DF, com efeito de proteção contra a hemólise e dano oxidativo (52); 8. estatinas pela sua ação antiinflamatória (256). Apesar de haver consenso sobre o estado de hipercoagulabilidade, o benefício do uso de anti-agregante plaquetário, anticoagulante oral ou parenteral ou de agente trombolíticos ainda está para ser determinado (251, 257-259). O uso de sildenafil, pela sua propriedade de potencializar os efeitos vasodilatadores do ON através da inibição da degradação do cGMP pela 5-fosfodiesterase, também já foi testado



(260). O uso de bosentan, inibidor da endotelina-1, foi usado com sucesso para tratar úlcera de perna refratária (261).

Além dos fármacos acima citados, temos os estudos com as terapêuticas curativas com o transplante de células tronco e terapia gênica. Transplantes alogênicos de células tronco de medula óssea ou de sangue de cordão umbilical (58, 262) são limitados a pacientes jovens e com doador relacionado compatível. Os resultados em 5 anos mostram que, 85% dos pacientes apresentam uma probabilidade de sobrevida livre de doença e 97% de sobrevida global, com baixos índices 10% e 22% de doença do enxerto contra hospedeiro aguda e crônica respectivamente (263, 264). A terapia gênica para DF, atualmente eficiente em modelos experimentais em camundongos e em células humanas *in vitro*, ainda não apresenta condições técnicas para aplicação em humanos, pois a modificação genética de células tronco, de forma efetiva, ainda esbarra na biologia desta célula, sobretudo, na propriedade de auto-renovação (265). No momento, os testes com as drogas citadas acima, embora alguns promissores, ainda requerem mais estudos (47).

### **2.6.1 L-Arginina**

O novo fármaco que propomos neste estudo, duplo-cego e randomizado, é adicionar, ao tratamento já estabelecido para os nossos pacientes, a suplementação oral de L-Arginina, um aminoácido, com o objetivo de aumentar a síntese de ON, promover a vasodilatação através da ativação, pelo ON, da guanilato ciclase e produção de 3'5' monofosfato guanosina cíclico (GMP cíclico), com o objetivo de prevenir e tratar a mais grave das complicações cônicas da DF, que é a hipertensão pulmonar e também as outras manifestações clínicas decorrentes da disfunção endotelial já mencionada. Estudos em pacientes, com e sem DF, já demonstraram o

benefício, da administração deste aminoácido por via oral ou parenteral no tratamento de hipertensão pulmonar e aumentar a proteção contra o dano oxidativo pela capacidade de promover aumento da glutathiona intra-eritrocitária (24, 49, 55, 56, 266-268). A infusão de L-Arginina em recém nascidos com HAP, mas sem DF diminui a resistência vascular pulmonar e melhora a oxigenação. (269).

A infusão de L Arginina também provoca aumento de secreção de insulina, que também tem efeito vaso ativo (270-272).

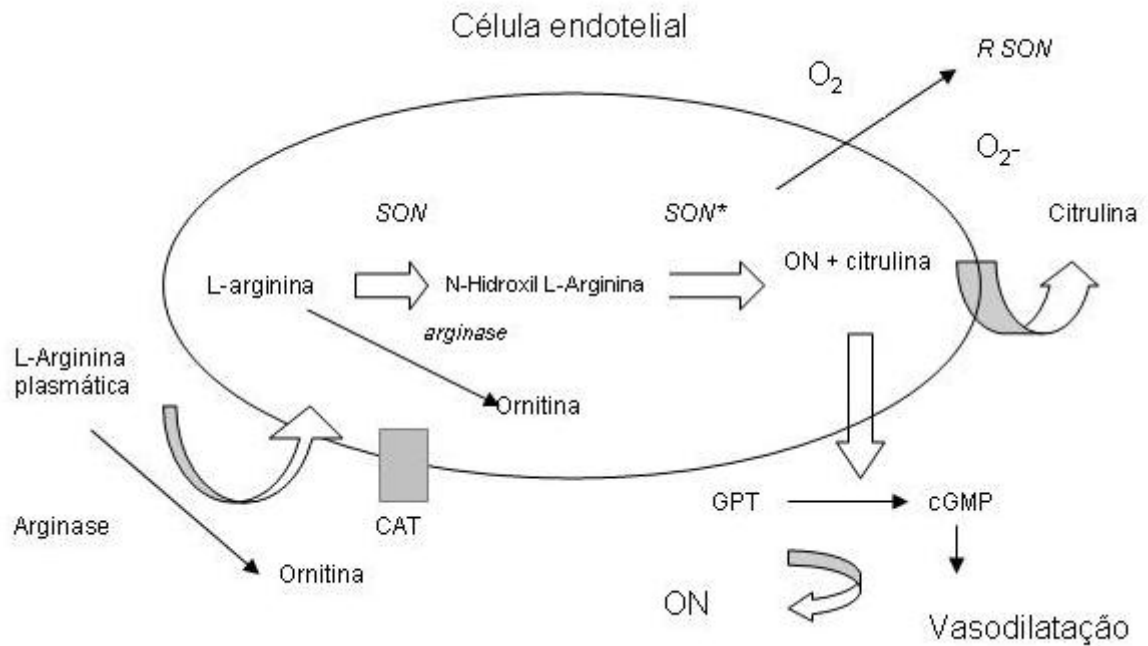
ON por via inalatória também reduziu a pressão arterial pulmonar em crianças e adultos com hipertensão pulmonar primária (273), bem como em crianças com síndrome torácico agudo (274-276).

Os dois estudos que serviram de estímulo para este ensaio clínico demonstraram a ação da L-Arginina como droga hipotensora arterial pulmonar são dois estudos clínicos: 1. Ensaio clínico randomizado duplo-cego com placebo: 10/9 pacientes com HAP primária ou secundária dose 0,5g/10 kg: diminuição da PSAP de  $53 \pm 4$  a  $48 \pm 4$  mm Hg em 1 horas após a primeira dose,  $p < 0,05$  (55), medidas por cateterismo cardíaco. L-Arginina foi mantida por 1 semana para avaliação do teste do pico de consumo de  $O_2$ , que mostrou aumento significativo. 2. Ensaio clínico 10 pacientes com DF tratados com dose de 0,1g/kg/dia dividida em três tomada, por 5 dias, apresentou redução de 15,2% da pressão em arterial pulmonar calculada:  $(PSAP = 4V^2 + \text{pressão no átrio D(PAD) ou pressão venosa central( PVC)})$ , onde a velocidade do jato de regurgitação tricúspide foi medida por ECDT e usada para calcular o gradiente pressórico através da válvula tricúspide de acordo com a equação simplificada de Bernoulli ( $p = 4V^2$ ) acrescida de 14 mm Hg considerada a pressão do átrio direito ou pressão venosa central em todos os pacientes, houve concomitante aumento de metahemoglobina, sugerindo aumento de produção de

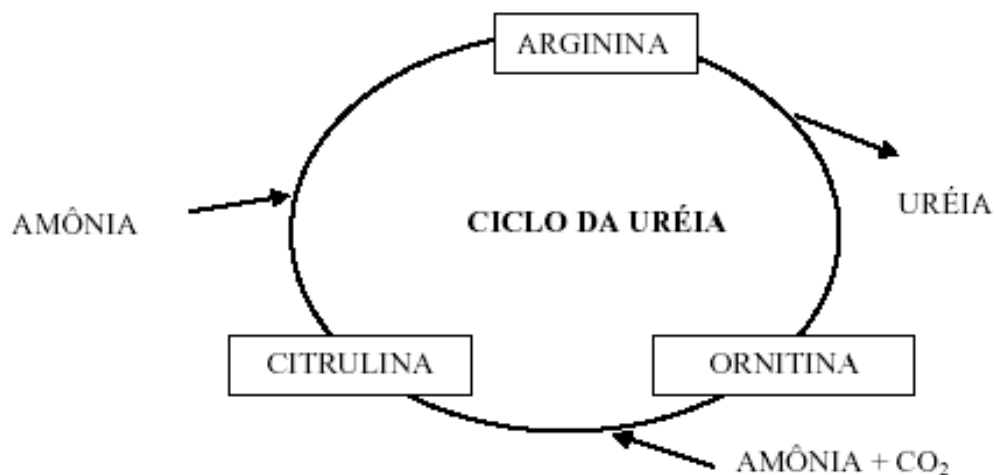
ON (24, 48, 56). A produção de ON foi maior em 5 pacientes que usavam HU (266). Esta nova abordagem terapêutica estava em 2005, segundo informação pessoal de Dra. Claudia R Morris, médica do Children's Hospital Oakland, Oakland Califórnia USA, sendo administrada a crianças e adultos com DF. Dra. Claudia R Morris atualmente coordena vários estudos randomizados, em diferentes centros nos Estados Unidos da América do Norte.

A arginina é um aminoácido condicionalmente essencial, naturalmente presente na dieta protéica, em humanos é sintetizado a partir da citrulina(277). No entanto em situações de alto catabolismo, sua síntese está prejudicada e se torna essencial obter arginina da dieta. Tem grande importância biológica com propriedades nutritivas e terapêuticas (278, 279).

Em 1988 foi descoberto, através de ensaio com radioisótopo, que a arginina é o substrato, o doador do nitrogênio, para a síntese enzimática do ON em mamíferos e que além da produção de ON na célula endotelial (Figura 5), tem outras funções importantes, como precursor de proteínas, creatina, agmatina e também participa do ciclo da uréia (8), metabolizando a amônia produzida no catabolismo protéico produzindo uréia, menos tóxica, e excretada pelo rim (Figura 6).



**Figura 5:** Metabolismo da Arginina adaptado de Morris, C (56). Arginase compete com a sintetase do óxido nítrico (SON), pelo substrato L-arginina. L-arginina produz ON e citrulina pela ação da SON. A liberação de ON causa vasodilatação através da ativação da ciclase guanilato solúvel(GPT) em: ciclase guanilato mensageiro intracitoplasmático (cGPT)(10, 278). Arginase transforma L-arginina em ornitina e uréia(280). Tanto L-arginina como ornitina usam a mesma molécula transportadora de aminoácidos catiônicos (CAT), para penetrar na célula(281). Ornitina pode competir com L-arginina neste transporte, limitando a quantidade do substrato para a produção de ON. L-arginina N-hidroxi-L-arginina é um produto intermediário na rota L-arginina/ON e é um inibidor potente da arginase(282). O acúmulo deste intra ou extracelular promove mais síntese de ON, por proteção contra a a degradação da L-Arginina pela arginase. Em situações de baixas concentrações de L-arginina a SON\*, sem o substrato L-arginina, atua no O<sub>2</sub> transformando-o em superóxido de oxigênio (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ao invés de produzir ON(283). O ON reage rapidamente com O<sub>2</sub><sup>-</sup> formando SON reativa (RSON) que promove oxidação e dano celular (284).



**Figura 6:** Ciclo Uréia, adaptado de Lehninger , AL(285). Amônia é transformada em uréia menos tóxica através da transformação da arginina a ornitina e citrulina.

O ON é um potente vasodilatador, anticoagulante, inibe agregação plaquetária e tem propriedade anti – adesividade (9) e que, como já citado, está com sua biodisponibilidade diminuída em pacientes com DF (286).

As propriedades do ON como vasodilatador são conhecidas desde 1987 e foi relacionado ao fator relaxante derivado do endotélio, já descrito em 1927. Foi demonstrado que, na hemólise intravascular, a presença de hemoglobina livre no plasma consome ON (84).

ON, além da ação vasodilatadora, funciona como mediador da resposta imune, atua como anti-inflamatório impedindo a liberação de histamina, funciona também como neurotransmissor, como radical livre citotóxico e como molécula de sinalização em todo organismo (278, 287). ON normalmente suprime a expressão de molécula de adesão do endotélio vascular-1(VCAM-1), molécula de adesão intracelular-1(ICAM-1) e E-selectina (288) e que estão aumentadas na DF associadas à HAP e maior risco de morte (289).

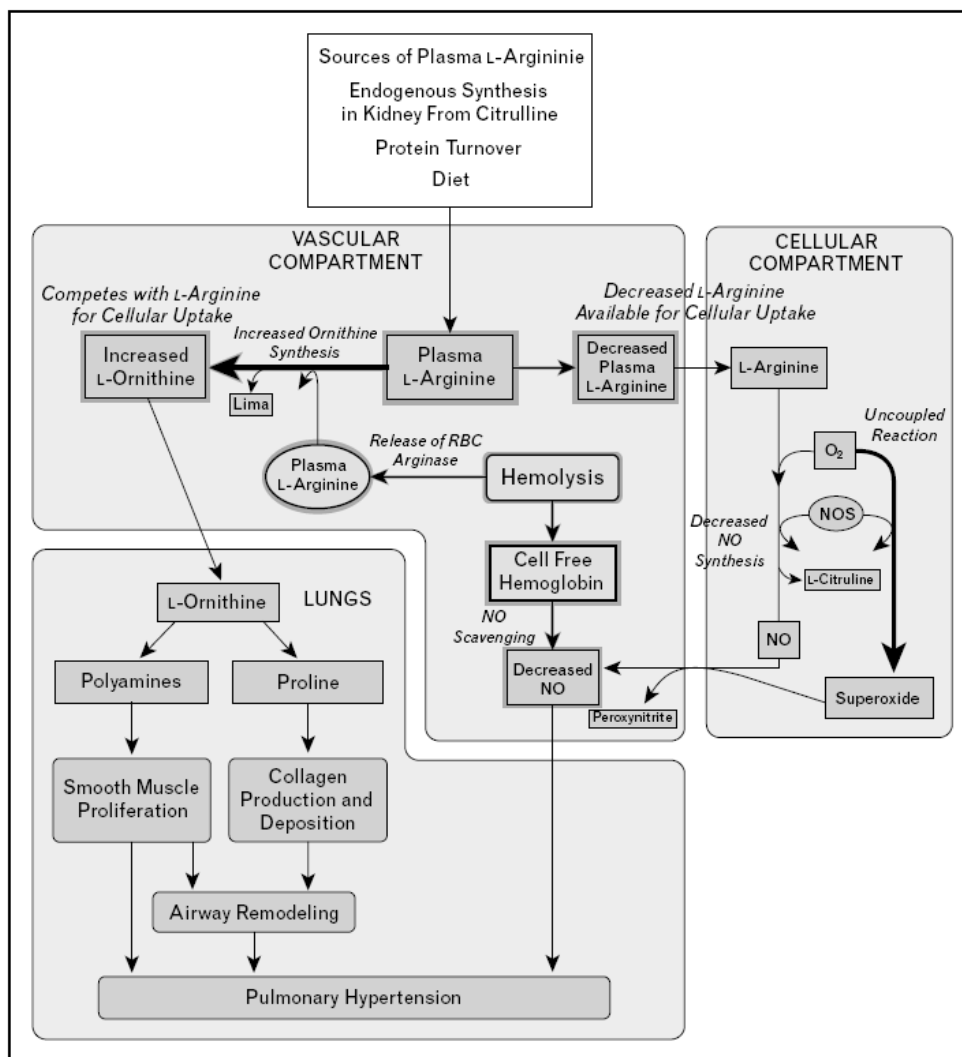
Nos últimos 18 anos, muitos estudos estão sendo realizados para buscar o papel nutritivo e terapêutico da L-Arginina (278) e seus catabólitos: ornitina, prolina e

poliaminas em muitas patologias associadas à deficiência de arginina ou de baixa biodisponibilidade do ON (279, 290) e foi demonstrado que o aumento de ON diminui a pressão na artéria pulmonar (24, 56).

A arginina é um suplemento alimentar com baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais. Doses de até 30 a 60g/dia são bem toleradas. Também em estudo experimental a L-Arginina administrada a camundongos transgênicos, com DF, induziu a produção de ON e houve diminuição da densidade dos eritrócitos por inibição dos canais de Gardos (51). A administração de Butirato de Arginina promoveu a cicatrização em úlceras de perna (291).

Em nosso estudo a administração de Arginina visa repor a baixa biodisponibilidade de Arginina, pois sabemos que adultos com DF são deficientes em arginina (48, 266), assim como em crianças com DF os níveis são mais baixos durante as crises vaso-oclusivas e na síndrome torácica aguda (290). Os motivos para isto são: elevada atividade de arginase (266, 292) e a presença de altas concentrações de metilarginina, produzida na disfunção endotelial (293-295), que compete pelo seu transporte intra celular da Arginina e pela sintetase do ON (296).

Estudos recentes *in vitro* e experimentais em animais indicam que a sintetase de ON (SON) pode ter papel importante na patogenia da DF. Há dados sugerindo que a HU aumenta a síntese de ON e a deficiência de arginina, nestes pacientes, pode limitar o benefício terapêutico da HU (203, 297). A alteração do metabolismo da Arginina na DF está esquematizado na figura 7.



**Figura 7:** Alteração no metabolismo da arginina na DF e em outras situações com hemólise. Morris, C(49). Arginina é sintetizada endogenamente a partir de citrulina no rim, via eixo intestinal-renal (277, 298). Arginase e sintetase do ON competem pela arginina, o substrato comum(49). Na DF a biodisponibilidade da arginina e do On estão reduzidos, por vários mecanismos ligados a hemólise. A arginase liberada pela lise dos eritrócitos falciformados, desvia o metabolismo para a formação de ornitina, diminuindo a síntese de ON(49). Há ainda menor biodisponibilidade de arginina, pois a ornitina compete com a arginina pelo mesmo sistema de transporte para dentro das células(299). Síntese endógena de arginina a partir da citrulina pode estar prejudicada por disfunção renal, comum em DF(49). A síntese de ON está prejudicada na DF por falta do substrato arginina(48, 286). ON é consumido pela hemoglobina liberada na hemólise(84) e pelos radicais livres, como superóxido (283, 300), Na DF há aumento de superóxido(301) devido a baixa atividade da superóxido dismutase e alta atividade da xantina oxidase(300), e ainda pela presença de sintetase do ON não ligada a arginina pela baixa concentração de arginina(283). A disfunção endotelial é determinada pela depleção de ON produzindo vasoconstrição e pelo aumento dos produtos do metabolismo da ornitina: poliamina e prolina(49, 277) que contribuem proliferação da musculatura lisa dos vasos, produção e deposição de colágeno remodelando as vias aéreas e vasos pulmonares contribuindo na patogênese da fibrose pulmonar e da HAP(290).

Os aspectos farmacológicos da L-Arginina mostra que é bem absorvida por via oral na forma de hidrocloreto de Arginina, tanto em animais como em humanos, a concentração plasmática atinge o pico máximo, em humanos, após 2 horas da administração (302). É metabolizado em 4 a 6 horas, por este motivo são necessárias pelo menos três doses diárias (303). Arginina é metabolizada pelo fígado e após filtração renal é reabsorvida pelos túbulos distais. A utilização da Arginina plasmática depende do estado do indivíduo, o *stress*, a atividade física ou estado inflamatório aumentam a necessidade de Arginina. A sua biodisponibilidade pode estar limitada em estados com arginase aumentada (304, 305). Reações adversas são raras, leves e dose dependente (302). O uso oral por longos períodos provoca apenas mal estar epigástrico e cefaléia. É recomendado monitorar a função renal e hepática. Dose alta de Arginina pode inibir a absorção de lisina, por competir pelo mesmo sistema de absorção intestinal, o que teoricamente consiste em reação adversa, pois lisina é um agente anti-viral potente (306). Não há relato de efeito adverso com o uso de hidrocloreto de Arginina em pacientes com DF (268).



### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Demonstrar o efeito terapêutico da L-Arginina em pacientes com DF.

#### **3.2. Objetivo Específico**

Avaliar o impacto da L-Arginina sobre diminuição da pressão arterial pulmonar.

#### **3.3 Objetivos Secundários**

Avaliar alteração no peso, na pressão arterial sistêmica, no grau de anemia , no grau de hemólise, na produção de hemoglobina fetal e de metahemoglobina, na creatinina, no número de atendimentos hospitalares e avaliar a impressão subjetiva de melhora ao final do tratamento.

#### 4. Referências da Revisão da Literatura:

1. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1997 Sep 11;337(11):762-9.
2. Steinberg M. Disorders of hemoglobin. New York: Cambridge Unpolimerização de hemoglobina S deoxigenada no interior dos eritrócitosiversity press; 2001.
3. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):704-12.
4. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* 2008 Jun;86(6):480-7.
5. Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood.* 1985 Jan;65(1):183-9.
6. Raghavachari N, Xu X, Harris A, Villagra J, Logun C, Barb J, et al. Amplified expression profiling of platelet transcriptome reveals changes in arginine metabolic pathways in patients with sickle cell disease. *Circulation.* 2007 Mar 27;115(12):1551-62.
7. Wood KC, Granger DN. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007 Sep;34(9):926-32.
8. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988 Jun 16;333(6174):664-6.
9. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999 Dec;34(6):879-86.
10. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1993;28:97-9.
11. Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest.* 2000 Aug;106(3):411-20.
12. Peng HB, Spiecker M, Liao JK. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. *J Immunol.* 1998 Aug 15;161(4):1970-6.
13. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation.* 2004 Mar;11(2):129-51.
14. Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Feb 13;98(4):1847-52.
15. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* 2007 Jan;21(1):37-47.
16. Thomas DD, Espey MG, Vitek MP, Miranda KM, Wink DA. Protein nitration is mediated by heme and free metals through Fenton-type chemistry: an alternative to the NO/O<sub>2</sub>- reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 1;99(20):12691-6.
17. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *Faseb J.* 2004 Nov;18(14):1746-8.
18. Tudor RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF. The pathobiology of pulmonary hypertension. *Endothelium. Clin Chest Med.* 2001 Sep;22(3):405-18.

19. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2004 Jan 20;109(2):159-65.
20. Kaul DK, Zhang X, Dasgupta T, Fabry ME. Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jul;295(1):H39-47.
21. Lin EE, Rodgers GP, Gladwin MT. Hemolytic anemia-associated pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Curr Hematol Rep*. 2005 Mar;4(2):117-25.
22. Morris CR, Kuypers FA, Kato GJ, Lavrisha L, Larkin S, Singer T, et al. Hemolysis-associated pulmonary hypertension in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:481-5.
23. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 15;44(8):1506-28.
24. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Sweeters N, Simon J, Vichinsky EP, et al. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2000 Nov;111(2):498-500.
25. Ashley-Koch AE, Elliott L, Kail ME, De Castro LM, Jonassaint J, Jackson TL, et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5721-6.
26. Steinberg MH. SNPing away at sickle cell pathophysiology. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5420-1.
27. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica*. 2008 Apr;93(4):605-9.
28. Kutlar A. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single-gene disorder. *Med Princ Pract*. 2005;14 Suppl 1:15-9.
29. Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN. Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science*. 1975 Apr 25;188(4186):361-3.
30. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 3;104(27):11346-51.
31. Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet*. 2007 Oct;39(10):1197-9.
32. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araujo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 19;105(33):11869-74.
33. Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta*. 2004 Jul;345(1-2):35-42.
34. Buchanan GR, Siegel JD, Smith SJ, DePasse BM. Oral penicillin prophylaxis in children with impaired splenic function: a study of compliance. *Pediatrics*. 1982 Dec;70(6):926-30.
35. Kinney TR, Ware RE, Schultz WH, Filston HC. Long-term management of splenic sequestration in children with sickle cell disease. *J Pediatr*. 1990 Aug;117(2 Pt 1):194-9.
36. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia.

- Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*. 1995 May 18;332(20):1317-22.
37. Roberts I, de Montalembert M. Sickle cell disease as a paradigm of immigration hematology: new challenges for hematologists in Europe. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):865-71.
  38. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2004 Feb 26;350(9):886-95.
  39. Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-Grau MM, Wang L, Adewoye AH, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2727-35.
  40. Currie PJ, Seward JB, Reeder GS, Vlietstra RE, Bresnahan DR, Bresnahan JF, et al. Continuous-wave Doppler echocardiographic assessment of severity of calcific aortic stenosis: a simultaneous Doppler-catheter correlative study in 100 adult patients. *Circulation*. 1985 Jun;71(6):1162-9.
  41. Berger M, Haimowitz A, Van Tosh A, Berdoff RL, Goldberg E. Quantitative assessment of pulmonary hypertension in patients with tricuspid regurgitation using continuous wave Doppler ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. 1985 Aug;6(2):359-65.
  42. Anthi A, Machado RF, Jison ML, Taveira-Dasilva AM, Rubin LJ, Hunter L, et al. Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jun 15;175(12):1272-9.
  43. Steinberg MH. Clinical trials in sickle cell disease: adopting the combination chemotherapy paradigm. *Am J Hematol*. 2008 Jan;83(1):1-3.
  44. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med*. 1998 Jul 2;339(1):5-11.
  45. Josephson CD, Su LL, Hillyer KL, Hillyer CD. Transfusion in the patient with sickle cell disease: a critical review of the literature and transfusion guidelines. *Transfus Med Rev*. 2007 Apr;21(2):118-33.
  46. Locatelli F. Reduced-intensity regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:398-401.
  47. Hagar W, Vichinsky E. Advances in clinical research in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2008 May;141(3):346-56.
  48. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000 Nov-Dec;22(6):515-20.
  49. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama*. 2005 Jul 6;294(1):81-90.
  50. Rivera A, Jarolim P, Brugnara C. Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):357-603.
  51. Romero JR, Suzuka SM, Nagel RL, Fabry ME. Arginine supplementation of sickle transgenic mice reduces red cell density and Gardos channel activity. *Blood*. 2002 Feb 15;99(4):1103-8.
  52. Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):402-10.

53. Hsu LL, Champion HC, Campbell-Lee SA, Bivalacqua TJ, Mancini EA, Diwan BA, et al. Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood*. 2007 Apr 1;109(7):3088-98.
54. Krajewski ML, Hsu LL, Gladwin MT. The proverbial chicken or the egg? Dissection of the role of cell-free hemoglobin versus reactive oxygen species in sickle cell pathophysiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jul;295(1):H4-7.
55. Nagaya N, Uematsu M, Oya H, Sato N, Sakamaki F, Kyotani S, et al. Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Mar;163(4):887-91.
56. Morris CR, Morris SM, Jr., Hagar W, Van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D, et al. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jul 1;168(1):63-9.
57. Lal A, Vichinsky EP. *Sickle cell disease*. Oxford: Blackwell; 2005.
58. Panepinto JA, Walters MC, Carreras J, Marsh J, Bredeson CN, Gale RP, et al. Matched-related donor transplantation for sickle cell disease: report from the Center for International Blood and Transplant Research. *Br J Haematol*. 2007 Jun;137(5):479-85.
59. Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhdja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Mar;81(6):1771-3.
60. Serjeant GR. The geography of sickle cell disease: Opportunities for understanding its diversity. *Ann Saudi Med*. 1994 May;14(3):237-46.
61. Modell B, Darlison M, Birgens H, Cario H, Faustino P, Giordano PC, et al. Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: an overview. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67(1):39-69.
62. Nagel RL. *Malaria and hemoglobinopathies*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001.
63. Sutton LL, Castro O, Cross DJ, Spencer JE, Lewis JF. Pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Am J Cardiol*. 1994 Sep 15;74(6):626-8.
64. Wainscoat JS, Bell JI, Thein SL, Higgs DR, Sarjeant GR, Peto TE, et al. Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. *Mol Biol Med*. 1983 Sep;1(2):191-7.
65. Goncalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Oct;36(10):1283-8.
66. Lyra IM, Goncalves MS, Braga JA, Gesteira Mde F, Carvalho MH, Saad ST, et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005 Jul-Aug;21(4):1287-90.
67. Serjeant GR. Sickle-cell disease. *Lancet*. 1997 Sep 6;350(9079):725-30.
68. Daudt LE ZD, Portal L, Camargo neto E, Silla LMR, Giugliani R. . Triagem Neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, RGS, Brasil. *CSP*. 2002;18(3):833-42.
69. Goldbek AS PC, Moreira MDG, Silveira EL, Vargas PR. Triagem Neonatal no RS. *Anais do II Congresso de Triagem Neonatal. REVMED Minas Gerais*. 2003;13.
70. Serjeant GR SB. *Sickle Cell Disease*. 3rd ed. New York, NY: NY Oxford University Press; 2001.
71. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1999 Apr 1;340(13):1021-30.

72. Eaton WA. Linus Pauling and sickle cell disease. *Biophys Chem.* 2003;100(1-3):109-16.
73. Schechter AN NC. Sickle hemoglobin polymer: structure-function correlates. New York: Raven Press; 1994.
74. Higgins JM, Eddington DT, Bhatia SN, Mahadevan L. Sickle cell vasoocclusion and rescue in a microfluidic device. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 18;104(51):20496-500.
75. Eaton WA, Hofrichter J. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem.* 1990;40:63-279.
76. Vekilov PG. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol.* 2007 Oct;139(2):173-84.
77. Martorana MC, Mojoli G, Cianciulli P, Tarzia A, Mannella E, Caprari P. Sickle cell anaemia: haemorheological aspects. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(2):164-70.
78. Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW, Hedlund BE. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jan;85(1):237-41.
79. Mohandas N, Rossi ME, Clark MR. Association between morphologic distortion of sickle cells and deoxygenation-induced cation permeability increase. *Blood.* 1986 Aug;68(2):450-4.
80. Eaton JW, Skelton TD, Swofford HS, Kolpin CE, Jacob HS. Elevated erythrocyte calcium in sickle cell disease. *Nature.* 1973 Nov 9;246(5428):105-6.
81. Palek J, Thomae M, Ozog D. Red cell calcium content and transmembrane calcium movements in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med.* 1977 Jun;89(6):1365-74.
82. Luthra MG, Sears DA. Increased Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, and Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> ATPase activities in erythrocytes of sickle cell anemia. *Blood.* 1982 Dec;60(6):1332-6.
83. Ballas SK, Marcolina MJ. Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion.* 2006 Jan;46(1):105-10.
84. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, 3rd, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1383-9.
85. Galili U, Clark MR, Shohet SB. Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. *J Clin Invest.* 1986 Jan;77(1):27-33.
86. DV F. Vascular modulation. New York: Raven Press; 1994.
87. Duits AJ, Rodriguez T, Schnog JJ. Serum levels of angiogenic factors indicate a pro-angiogenic state in adults with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2006 Jul;134(1):116-9.
88. Paszty C, Brion CM, Mancini E, Witkowska HE, Stevens ME, Mohandas N, et al. Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science.* 1997 Oct 31;278(5339):876-8.
89. Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *J Clin Invest.* 1980 Jan;65(1):154-60.
90. Mohandas N, Evans E. Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: requirement for both cell membrane changes and plasma factors. *Blood.* 1984 Jul;64(1):282-7.
91. Hoover R, Rubin R, Wise G, Warren R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. *Blood.* 1979 Oct;54(4):872-6.

92. Mohandas N, Evans E. Sickle erythrocyte adherence to vascular endothelium. Morphologic correlates and the requirement for divalent cations and collagen-binding plasma proteins. *J Clin Invest.* 1985 Oct;76(4):1605-12.
93. Kucukcelebi A, Barmatoski SP, Barnhart MI. Interactions between vessel wall and perfused sickled erythrocytes: preliminary observations. *Scan Electron Microsc.* 1980(3):243-8.
94. Embury SH HR, Steinberg MH, Mohandas N. . In: , eds. . . Pathogenesis of vasoocclusion. New York:: Raven Press; 1994.
95. Aslan M, Freeman BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med.* 2007 Dec 1;43(11):1469-83.
96. Kinney TR, Sleeper LA, Wang WC, Zimmerman RA, Pegelow CH, Ohene-Frempong K, et al. Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics.* 1999 Mar;103(3):640-5.
97. Mancini EA, Culbertson DE, Yang YM, Gardner TM, Powell R, Haynes J, Jr., et al. Causes of death in sickle cell disease: an autopsy study. *Br J Haematol.* 2003 Oct;123(2):359-65.
98. Schnog JJ, Lard LR, Rojer RA, Van der Dijs FP, Muskiet FA, Duits AJ. New concepts in assessing sickle cell disease severity. *Am J Hematol.* 1998 May;58(1):61-6.
99. Quinn CT, Lee NJ, Shull EP, Ahmad N, Rogers ZR, Buchanan GR. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell anemia: a study of the Dallas Newborn Cohort. *Blood.* 2008 Jan 15;111(2):544-8.
100. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor Jt, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood.* 2006 Mar 15;107(6):2279-85.
101. O'Driscoll S, Height SE, Dick MC, Rees DC. Serum lactate dehydrogenase activity as a biomarker in children with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2008 Jan;140(2):206-9.
102. Hegyi T, Delphin ES, Bank A, Polin RA, Blanc WA. Sickle cell anemia in the newborn. *Pediatrics.* 1977 Aug;60(2):213-6.
103. Powars DR. Natural history of sickle cell disease--the first ten years. *Semin Hematol.* 1975 Jul;12(3):267-85.
104. O'Brien RT, McIntosh S, Aspnes GT, Pearson HA. Prospective study of sickle cell anemia in infancy. *J Pediatr.* 1976 Aug;89(2):205-10.
105. Stevens MC, Hayes RJ, Vaidya S, Serjeant GR. Fetal hemoglobin and clinical severity of homozygous sickle cell disease in early childhood. *J Pediatr.* 1981 Jan;98(1):37-41.
106. Bainbridge R, Higgs DR, Maude GH, Serjeant GR. Clinical presentation of homozygous sickle cell disease. *J Pediatr.* 1985 Jun;106(6):881-5.
107. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood.* 1995 Jul 15;86(2):776-83.
108. Watson J. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. *Am J Med Sci.* 1948 Apr;215(4):419-23.
109. Diggs LW, Williams DL. Treatment of painful sickle cell crises with papaverine: preliminary report. *South Med J.* 1963 May;56:472-4.
110. Reynolds J. Radiologic manifestations of sickle cell hemoglobinopathy. *Jama.* 1977 Jul 18;238(3):247-50.

111. Milner P, Belai A, Tomlinson A, Hoyle CH, Sarner S, Burnstock G. Effects of long-term laxative treatment on neuropeptides in rat mesenteric vessels and caecum. *J Pharm Pharmacol*. 1992 Sep;44(9):777-9.
112. Milner PF, Kraus AP, Sebes JI, Sleeper LA, Dukes KA, Embury SH, et al. Sick cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med*. 1991 Nov 21;325(21):1476-81.
113. Hernigou P, Allain J, Bachir D, Galacteros F. Abnormalities of the adult shoulder due to sickle cell osteonecrosis during childhood. *Rev Rhum Engl Ed*. 1998 Jan;65(1):27-32.
114. Hernigou P, Galacteros F, Bachir D, Goutallier D. Deformities of the hip in adults who have sickle-cell disease and had avascular necrosis in childhood. A natural history of fifty-two patients. *J Bone Joint Surg Am*. 1991 Jan;73(1):81-92.
115. Vichinsky EP, Neumayr LD, Haberkern C, Earles AN, Eckman J, Koshy M, et al. The perioperative complication rate of orthopedic surgery in sickle cell disease: report of the National Sickle Cell Surgery Study Group. *Am J Hematol*. 1999 Nov;62(3):129-38.
116. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*. 1991 Jul 4;325(1):11-6.
117. Topley JM, Rogers DW, Stevens MC, Serjeant GR. Acute splenic sequestration and hypersplenism in the first five years in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child*. 1981 Oct;56(10):765-9.
118. Seeler RA, Shwiaki MZ. Acute splenic sequestration crises (ASSC) in young children with sickle cell anemia. Clinical observations in 20 episodes in 14 children. *Clin Pediatr (Phila)*. 1972 Dec;11(12):701-4.
119. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med*. 2000 Jun 22;342(25):1855-65.
120. Santoli F, Zerah F, Vasile N, Bachir D, Galacteros F, Atlan G. Pulmonary function in sickle cell disease with or without acute chest syndrome. *Eur Respir J*. 1998 Nov;12(5):1124-9.
121. Knight J, Murphy TM, Browning I. The lung in sickle cell disease. *Pediatr Pulmonol*. 1999 Sep;28(3):205-16.
122. Klings ES, Wyszynski DF, Nolan VG, Steinberg MH. Abnormal pulmonary function in adults with sickle cell anemia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jun 1;173(11):1264-9.
123. Powars D, Weidman JA, Odom-Maryon T, Niland JC, Johnson C. Sickle cell chronic lung disease: prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine (Baltimore)*. 1988 Jan;67(1):66-76.
124. Haque AK, Gokhale S, Rampy BA, Adegboyega P, Duarte A, Saldana MJ. Pulmonary hypertension in sickle cell hemoglobinopathy: a clinicopathologic study of 20 cases. *Hum Pathol*. 2002 Oct;33(10):1037-43.
125. Castro O, Hoque M, Brown BD. Pulmonary hypertension in sickle cell disease: cardiac catheterization results and survival. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1257-61.
126. Vichinsky EP. Pulmonary hypertension in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2004 Feb 26;350(9):857-9.
127. Machado RF, Mack AK, Martyr S, Barnett C, Macarthur P, Sachdev V, et al. Severity of pulmonary hypertension during vaso-occlusive pain crisis and exercise in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2007 Jan;136(2):319-25.



128. Machado RF, Gladwin MT. Chronic sickle cell lung disease: new insights into the diagnosis, pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Br J Haematol*. 2005 May;129(4):449-64.
129. Liem RI, Young LT, Thompson AA. Tricuspid regurgitant jet velocity is associated with hemolysis in children and young adults with sickle cell disease evaluated for pulmonary hypertension. *Haematologica*. 2007 Nov;92(11):1549-52.
130. van Beers EJ, van Tuijn CF, Mac Gillavry MR, van der Giessen A, Schnog JJ, Biemond BJ. Sickle cell disease-related organ damage occurs irrespective of pain rate: implications for clinical practice. *Haematologica*. 2008 May;93(5):757-60.
131. Machado RF, Anthi A, Steinberg MH, Bonds D, Sachdev V, Kato GJ, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels and risk of death in sickle cell disease. *Jama*. 2006 Jul 19;296(3):310-8.
132. Voskaridou E, Tsetsos G, Tsoutsias A, Spyropoulou E, Christoulas D, Terpos E. Pulmonary hypertension in patients with sickle cell/beta thalassemia: incidence and correlation with serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations. *Haematologica*. 2007 Jun;92(6):738-43.
133. Gutteridge C, Newland AC, Sequeira J. Hepatic sequestration in sickle cell anemia. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985 Apr 20;290(6476):1214-5.
134. Johnson CS, Omata M, Tong MJ, Simmons JF, Jr., Weiner J, Tatter D. Liver involvement in sickle cell disease. *Medicine (Baltimore)*. 1985 Sep;64(5):349-56.
135. Walker TM, Hambleton IR, Serjeant GR. Gallstones in sickle cell disease: observations from The Jamaican Cohort study. *J Pediatr*. 2000 Jan;136(1):80-5.
136. DeVault KR, Friedman LS, Westerberg S, Martin P, Hosein B, Ballas SK. Hepatitis C in sickle cell anemia. *J Clin Gastroenterol*. 1994 Apr;18(3):206-9.
137. Emre S, Kitibayashi K, Schwartz ME, Ahn J, Birnbaum A, Thung SN, et al. Liver transplantation in a patient with acute liver failure due to sickle cell intrahepatic cholestasis. *Transplantation*. 2000 Feb 27;69(4):675-6.
138. Serjeant GR, May H, Patrick A, Slifer ED. Duodenal ulceration in sickle cell anaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1973;67(1):59-63.
139. Rao S, Royal JE, Conrad HA, Jr., Harris V, Ahuja J. Duodenal ulcer in sickle cell anemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1990 Jan;10(1):117-20.
140. Lee MG, Thirumalai CH, Terry SI, Serjeant GR. Endoscopic and gastric acid studies in homozygous sickle cell disease and upper abdominal pain. *Gut*. 1989 May;30(5):569-72.
141. Karim A, Ahmed S, Rossoff LJ, Siddiqui R, Fuchs A, Multz AS. Fulminant ischaemic colitis with atypical clinical features complicating sickle cell disease. *Postgrad Med J*. 2002 Jun;78(920):370-2.
142. Moukarzel AA, Rajaram M, Sundeep A, Guarini L, Feldman F. Sickle cell anemia: severe ischemic colitis responding to conservative management. *Clin Pediatr (Phila)*. 2000 Apr;39(4):241-3.
143. Kumar A, Posner G, Marsh F, Bellvue R, Dosik H. Acute pancreatitis in sickle cell crisis. *J Natl Med Assoc*. 1989 Jan;81(1):91-2.
144. Covitz W, Espeland M, Gallagher D, Hellenbrand W, Leff S, Talner N. The heart in sickle cell anemia. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD). *Chest*. 1995 Nov;108(5):1214-9.
145. Deymann AJ, Goertz KK. Myocardial infarction and transient ventricular dysfunction in an adolescent with sickle cell disease. *Pediatrics*. 2003 Feb;111(2):E183-7.

146. Batra AS, Acherman RJ, Wong WY, Wood JC, Chan LS, Ramicone E, et al. Cardiac abnormalities in children with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2002 Aug;70(4):306-12.
147. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.* 1998 Jan 1;91(1):288-94.
148. Pegelow CH. Stroke in children with sickle cell anaemia: aetiology and treatment. *Paediatr Drugs.* 2001;3(6):421-32.
149. Powars D, Wilson B, Imbus C, Pegelow C, Allen J. The natural history of stroke in sickle cell disease. *Am J Med.* 1978 Sep;65(3):461-71.
150. Kral MC, Brown RT, Nietert PJ, Abboud MR, Jackson SM, Hynd GW. Transcranial Doppler ultrasonography and neurocognitive functioning in children with sickle cell disease. *Pediatrics.* 2003 Aug;112(2):324-31.
151. Marsenic O, Couloures KG, Wiley JM. Proteinuria in children with sickle cell disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Feb;23(2):715-20.
152. Powars DR, Elliott-Mills DD, Chan L, Niland J, Hiti AL, Opas LM, et al. Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. *Ann Intern Med.* 1991 Oct 15;115(8):614-20.
153. Ojo AO, Govaerts TC, Schmouder RL, Leichtman AB, Leavey SF, Wolfe RA, et al. Renal transplantation in end-stage sickle cell nephropathy. *Transplantation.* 1999 Jan 27;67(2):291-5.
154. Kent D, Arya R, Aclimandos WA, Bellingham AJ, Bird AC. Screening for ophthalmic manifestations of sickle cell disease in the United Kingdom. *Eye.* 1994;8 ( Pt 6):618-22.
155. Clare A, FitzHenley M, Harris J, Hambleton I, Serjeant GR. Chronic leg ulceration in homozygous sickle cell disease: the role of venous incompetence. *Br J Haematol.* 2002 Nov;119(2):567-71.
156. Young N. Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. *Semin Hematol.* 1988 Apr;25(2):159-72.
157. van der Dijs FP, Fokkema MR, Dijck-Brouwer DA, Niessink B, van der Wal TI, Schnog JJ, et al. Optimization of folic acid, vitamin B(12), and vitamin B(6) supplements in pediatric patients with sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2002 Apr;69(4):239-46.
158. Johnston RB, Jr. Increased susceptibility to infection in sickle cell disease: review of its occurrence and possible causes. *South Med J.* 1974 Nov;67(11):1342-8.
159. Gavrillis P, Rothenberg SP, Guy R. Correlation of low serum IgM levels with absence of functional splenic tissue in sickle cell disease syndromes. *Am J Med.* 1974 Oct;57(4):542-5.
160. Seeler RA, Metzger W, Mufson MA. Diplococcus pneumoniae infections in children with sickle cell anemia. *Am J Dis Child.* 1972 Jan;123(1):8-10.
161. Landesman SH, Rao SP, Ahonkhai VI. Infections in children with sickle cell anemia. Special reference to pneumococcal and salmonella infections. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1982 Winter;4(4):407-18.
162. Zarkowsky HS, Gallagher D, Gill FM, Wang WC, Falletta JM, Lande WM, et al. Bacteremia in sickle hemoglobinopathies. *J Pediatr.* 1986 Oct;109(4):579-85.
163. Wong WY, Overturf GD, Powars DR. Infection caused by Streptococcus pneumoniae in children with sickle cell disease: epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis, and vaccination. *Clin Infect Dis.* 1992 May;14(5):1124-36.
164. Overturf GD, Powars D, Baraff LJ. Bacterial meningitis and septicemia in sickle cell disease. *Am J Dis Child.* 1977 Jul;131(7):784-7.

165. Powars D, Overturf G, Weiss J, Lee S, Chan L. Pneumococcal septicemia in children with sickle cell anemia. Changing trend of survival. *Jama*. 1981 May 8;245(18):1839-42.
166. Wang WC, Wong WY, Rogers ZR, Wilimas JA, Buchanan GR, Powars DR. Antibiotic-resistant pneumococcal infection in children with sickle cell disease in the United States. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1996 May;18(2):140-4.
167. Barrett-Connor E. Bacterial infection and sickle cell anemia. An analysis of 250 infections in 166 patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1971 Mar;50(2):97-112.
168. Givner LB, Luddy RE, Schwartz AD. Etiology of osteomyelitis in patients with major sickle hemoglobinopathies. *J Pediatr*. 1981 Sep;99(3):411-3.
169. Syrogiannopoulos GA, McCracken GH, Jr., Nelson JD. Osteoarticular infections in children with sickle cell disease. *Pediatrics*. 1986 Dec;78(6):1090-6.
170. Wierenga KJ, Pattison JR, Brink N, Griffiths M, Miller M, Shah DJ, et al. Glomerulonephritis after human parvovirus infection in homozygous sickle-cell disease. *Lancet*. 1995 Aug 19;346(8973):475-6.
171. Gigliotti F, Feldman S, Wang WC, Day SW, Brunson G. Immunization of young infants with sickle cell disease with a Haemophilus influenzae type b saccharide-diphtheria CRM197 protein conjugate vaccine. *J Pediatr*. 1989 Jun;114(6):1006-10.
172. Sarnaik S, Kaplan J, Schiffman G, Bryla D, Robbins JB, Schneerson R. Studies on Pneumococcus vaccine alone or mixed with DTP and on Pneumococcus type 6B and Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates in two- to five-year-old children with sickle cell anemia. *Pediatr Infect Dis J*. 1990 Mar;9(3):181-6.
173. Phebus CK, Gloninger MF, Maciak BJ. Growth patterns by age and sex in children with sickle cell disease. *J Pediatr*. 1984 Jul;105(1):28-33.
174. Kramer MS, Rooks Y, Washington LA, Pearson HA. Pre- and postnatal growth and development in sickle cell anemia. *J Pediatr*. 1980 May;96(5):857-60.
175. Stevens MC, Hayes RJ, Serjeant GR. Body shape in young children with homozygous sickle cell disease. *Pediatrics*. 1983 Apr;71(4):610-4.
176. Stevens MC, Maude GH, Cupidore L, Jackson H, Hayes RJ, Serjeant GR. Prepubertal growth and skeletal maturation in children with sickle cell disease. *Pediatrics*. 1986 Jul;78(1):124-32.
177. Luban NL, Leikin SL, August GA. Growth and development in sickle cell anemia. Preliminary report. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1982 Spring;4(1):61-5.
178. Borel MJ, Buchowski MS, Turner EA, Peeler BB, Goldstein RE, Flakoll PJ. Alterations in basal nutrient metabolism increase resting energy expenditure in sickle cell disease. *Am J Physiol*. 1998 Feb;274(2 Pt 1):E357-64.
179. Barden EM, Zemel BS, Kawchak DA, Goran MI, Ohene-Frempong K, Stallings VA. Total and resting energy expenditure in children with sickle cell disease. *J Pediatr*. 2000 Jan;136(1):73-9.
180. Kopp-Hoolihan LE, van Loan MD, Mentzer WC, Heyman MB. Elevated resting energy expenditure in adolescents with sickle cell anemia. *J Am Diet Assoc*. 1999 Feb;99(2):195-9.
181. Buchowski MS, de la Fuente FA, Flakoll PJ, Chen KY, Turner EA. Increased bone turnover is associated with protein and energy metabolism in adolescents with sickle cell anemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Mar;280(3):E518-27.

182. Singhal A, Parker S, Linsell L, Serjeant G. Energy intake and resting metabolic rate in preschool Jamaican children with homozygous sickle cell disease. *Am J Clin Nutr.* 2002 Jun;75(6):1093-7.
183. Fung EB, Malinauskas BM, Kawchak DA, Koh BY, Zemel BS, Gropper SS, et al. Energy expenditure and intake in children with sickle cell disease during acute illness. *Clin Nutr.* 2001 Apr;20(2):131-8.
184. VanderJagt DJ, Harmatz P, Scott-Emuakpor AB, Vichinsky E, Glew RH. Bioelectrical impedance analysis of the body composition of children and adolescents with sickle cell disease. *J Pediatr.* 2002 Jun;140(6):681-7.
185. Gray NT, Bartlett JM, Kolasa KM, Marcuard SP, Holbrook CT, Horner RD. Nutritional status and dietary intake of children with sickle cell anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1992 Spring;14(1):57-61.
186. Heyman MB, Vichinsky E, Katz R, Gaffield B, Hurst D, Castillo R, et al. Growth retardation in sickle-cell disease treated by nutritional support. *Lancet.* 1985 Apr 20;1(8434):903-6.
187. Nelson MC, Zemel BS, Kawchak DA, Barden EM, Frongillo EA, Jr., Coburn SP, et al. Vitamin B6 status of children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002 Aug-Sep;24(6):463-9.
188. Westerman MP, Zhang Y, McConnell JP, Chezick PA, Neelam R, Freels S, et al. Ascorbate levels in red blood cells and urine in patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2000 Oct;65(2):174-5.
189. Gee BE PO. Growth and development. In: Embury SH HR, Mohandas N, Steinberg MH, editor. *Sickle cell disease: basic principles and clinical practice.* New York: Raven Press; 1994. p. 589–97.
190. Prasad AS, Abbasi AA, Rabbani P, DuMouchelle E. Effect of zinc supplementation on serum testosterone level in adult male sickle cell anemia subjects. *Am J Hematol.* 1981;10(2):119-27.
191. Abshire TC, English JL, Githens JH, Hambidge M. Zinc status in children and young adults with sickle cell disease. *Am J Dis Child.* 1988 Dec;142(12):1356-9.
192. Bruno D, Wigfall DR, Zimmerman SA, Rosoff PM, Wiener JS. Genitourinary complications of sickle cell disease. *J Urol.* 2001 Sep;166(3):803-11.
193. Burnett AL, Allen RP, Tempany CM, Dover GJ, Brendler CB. Evaluation of erectile function in men with sickle cell disease. *Urology.* 1995 Apr;45(4):657-63.
194. Consensus conference. Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *Jama.* 1987 Sep 4;258(9):1205-9.
195. Vichinsky E, Hurst D, Earles A, Kleman K, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. *Pediatrics.* 1988 Jun;81(6):749-55.
196. Adamkiewicz TV, Sarnaik S, Buchanan GR, Iyer RV, Miller ST, Pegelow CH, et al. Invasive pneumococcal infections in children with sickle cell disease in the era of penicillin prophylaxis, antibiotic resistance, and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination. *J Pediatr.* 2003 Oct;143(4):438-44.
197. Adamkiewicz TV, Silk BJ, Howgate J, Baughman W, Strayhorn G, Sullivan K, et al. Effectiveness of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with sickle cell disease in the first decade of life. *Pediatrics.* 2008 Mar;121(3):562-9.
198. Halasa NB, Shankar SM, Talbot TR, Arbogast PG, Mitchel EF, Wang WC, et al. Incidence of invasive pneumococcal disease among individuals with sickle cell disease before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis.* 2007 Jun 1;44(11):1428-33.
199. Borgna-Pignatti C. Modern treatment of thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* 2007 Aug;138(3):291-304.

200. Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2008 Mar 27;358(13):1362-9.
201. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1984 Aug;74(2):652-6.
202. Iyamu EW, Cecil R, Parkin L, Woods G, Ohene-Frempong K, Asakura T. Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *Br J Haematol*. 2005 Nov;131(3):389-94.
203. Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B, et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2002 Feb;116(2):436-44.
204. Orringer EP, Parker JC. Hydroxyurea and sickle cell disease. *Hematol Pathol*. 1992;6(4):171-8.
205. Ferguson RP, Arun A, Carter C, Walker SD, Castro O. Hydroxyurea treatment of sickle cell anemia in hospital-based practices. *Am J Hematol*. 2002 Aug;70(4):326-8.
206. Vichinsky EP, Lubin BH. A cautionary note regarding hydroxyurea in sickle cell disease. *Blood*. 1994 Feb 15;83(4):1124-8.
207. de Montalembert M, Belloy M, Bernaudin F, Gouraud F, Capdeville R, Mardini R, et al. Three-year follow-up of hydroxyurea treatment in severely ill children with sickle cell disease. The French Study Group on Sickle Cell Disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997 Jul-Aug;19(4):313-8.
208. Kinney TR, Helms RW, O'Branski EE, Ohene-Frempong K, Wang W, Daeschner C, et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. Pediatric Hydroxyurea Group. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1550-4.
209. Scott JP, Hillery CA, Brown ER, Misiewicz V, Labotka RJ. Hydroxyurea therapy in children severely affected with sickle cell disease. *J Pediatr*. 1996 Jun;128(6):820-8.
210. Ferster A, Vermeylen C, Cornu G, Buyse M, Corazza F, Devalck C, et al. Hydroxyurea for treatment of severe sickle cell anemia: a pediatric clinical trial. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):1960-4.
211. Jayabose S, Tugal O, Sandoval C, Patel P, Puder D, Lin T, et al. Clinical and hematologic effects of hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *J Pediatr*. 1996 Oct;129(4):559-65.
212. Hoppe C, Vichinsky E, Quirolo K, van Warmerdam J, Allen K, Styles L. Use of hydroxyurea in children ages 2 to 5 years with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000 Jul-Aug;22(4):330-4.
213. Wang WC, Wynn LW, Rogers ZR, Scott JP, Lane PA, Ware RE. A two-year pilot trial of hydroxyurea in very young children with sickle-cell anemia. *J Pediatr*. 2001 Dec;139(6):790-6.
214. Claster S, Vichinsky E. First report of reversal of organ dysfunction in sickle cell anemia by the use of hydroxyurea: splenic regeneration. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):1951-3.
215. Hackney AC, Hezier W, Gullledge TP, Jones S, Strayhorn D, Busby M, et al. Effects of hydroxyurea administration on the body weight, body composition and exercise performance of patients with sickle-cell anaemia. *Clin Sci (Lond)*. 1997 May;92(5):481-6.

216. Wang WC, Helms RW, Lynn HS, Redding-Lallinger R, Gee BE, Ohene-Frempong K, et al. Effect of hydroxyurea on growth in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS Study. *J Pediatr*. 2002 Feb;140(2):225-9.
217. Sumoza A, de Bisotti R, Sumoza D, Fairbanks V. Hydroxyurea (HU) for prevention of recurrent stroke in sickle cell anemia (SCA). *Am J Hematol*. 2002 Nov;71(3):161-5.
218. de Montalembert M, Begue P, Bernaudin F, Thuret I, Bachir D, Micheau M. Preliminary report of a toxicity study of hydroxyurea in sickle cell disease. French Study Group on Sickle Cell Disease. *Arch Dis Child*. 1999 Nov;81(5):437-9.
219. Diav-Citrin O, Hunnisett L, Sher GD, Koren G. Hydroxyurea use during pregnancy: a case report in sickle cell disease and review of the literature. *Am J Hematol*. 1999 Feb;60(2):148-50.
220. Friedrisch JR, Pra D, Maluf SW, Bittar CM, Mergener M, Pollo T, et al. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Mutat Res*. 2008 Jan 8;649(1-2):213-20.
221. Maluf S, Prá D., Friedrisch J.R., Bittar C., Silva M.A.L., Henriques J.A., Silla L. Length of treatment and dose as determinants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea In Press. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2008.
222. Vn M. *Pediatric pathology and molecular medicine*. London: Taylor&Francis; 2001.
223. Atweh GF, Schechter AN. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising the therapeutic bar in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2001 Mar;8(2):123-30.
224. Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1992 Feb 27;326(9):605-10.
225. Adams RJ, Brambilla D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2005 Dec 29;353(26):2769-78.
226. Serjeant G. Blood transfusion in sickle cell disease: a cautionary tale. *Lancet*. 2003 May 10;361(9369):1659-60.
227. B.E. G. *Transfusion Therapy. Sickle Cell Information* 2004 [cited; <<http://www.scinfo.org/transfus.htm>>
228. Ballas SK. Iron overload is a determinant of morbidity and mortality in adult patients with sickle cell disease. *Semin Hematol*. 2001 Jan;38(1 Suppl 1):30-6.
229. Cappellini MD, Cohen A, Piga A, Bejaoui M, Perrotta S, Agaoglu L, et al. A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3455-62.
230. Vichinsky E, Onyekwere O, Porter J, Swerdlow P, Eckman J, Lane P, et al. A randomised comparison of deferasirox versus deferoxamine for the treatment of transfusional iron overload in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2007 Feb;136(3):501-8.
231. Hagar RW, Vichinsky EP. Major changes in sickle cell disease. *Adv Pediatr*. 2000;47:249-72.
232. Wanko SO, Telen MJ. Transfusion management in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005 Oct;19(5):803-26, v-vi.
233. Alvarez O, Montane B, Lopez G, Wilkinson J, Miller T. Early blood transfusions protect against microalbuminuria in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Jul;47(1):71-6.

234. Suell MN, Horton TM, Dishop MK, Mahoney DH, Olutoye OO, Mueller BU. Outcomes for children with gallbladder abnormalities and sickle cell disease. *J Pediatr*. 2004 Nov;145(5):617-21.
235. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994 Jun 9;330(23):1639-44.
236. Serjeant GR. Mortality from sickle cell disease in Africa. *Bmj*. 2005 Feb 26;330(7489):432-3.
237. Scott RB. Health care priority and sickle cell anemia. *Jama*. 1970 Oct 26;214(4):731-4.
238. Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4023-7.
239. Telfer P, Coen P, Chakravorty S, Wilkey O, Evans J, Newell H, et al. Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):905-12.
240. Vichinsky EP. Comprehensive care in sickle cell disease: its impact on morbidity and mortality. *Semin Hematol*. 1991 Jul;28(3):220-6.
241. Health supervision for children with sickle cell disease. *Pediatrics*. 2002 Mar;109(3):526-35.
242. Reed W, Vichinsky EP. Transfusion therapy: a coming-of-age treatment for patients with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001 May;23(4):197-202.
243. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Eckman JR, Scott JP, Mentzer WC, et al. Bone marrow transplantation for sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1996 Aug 8;335(6):369-76.
244. Koshy M, Dorn L, Bressler L, Molokie R, Lavelle D, Talischy N, et al. 2-deoxy 5-azacytidine and fetal hemoglobin induction in sickle cell anemia. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2379-84.
245. Moutouh-de Parseval LA, Verhelle D, Glezer E, Jensen-Pergakes K, Ferguson GD, Corral LG, et al. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):248-58.
246. Brugnara C, Gee B, Armsby CC, Kurth S, Sakamoto M, Rifai N, et al. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest*. 1996 Mar 1;97(5):1227-34.
247. Ataga KI, Smith WR, De Castro LM, Swerdlow P, Sauntharajah Y, Castro O, et al. Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):3991-7.
248. Solovey AA, Solovey AN, Harkness J, Hebbel RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):1937-41.
249. MacDermott RP. Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid. *Am J Gastroenterol*. 2000 Dec;95(12):3343-5.
250. Orringer EP, Casella JF, Ataga KI, Koshy M, Adams-Graves P, Luchtman-Jones L, et al. Purified poloxamer 188 for treatment of acute vaso-occlusive crisis of sickle cell disease: A randomized controlled trial. *Jama*. 2001 Nov 7;286(17):2099-106.
251. Mankad VN. *Pediatric pathology and molecular medicine*. London: Taylor & Francis; 2001.

252. De Franceschi L, Bachir D, Galacteros F, Tchernia G, Cynober T, Alper S, et al. Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest*. 1997 Oct 1;100(7):1847-52.
253. Brugnara C, De Franceschi L, Beuzard Y. Erythrocyte-active agents and treatment of sickle cell disease. *Semin Hematol*. 2001 Oct;38(4):324-32.
254. Hankins JS, Wynn LW, Brugnara C, Hillery CA, Li CS, Wang WC. Phase I study of magnesium pidolate in combination with hydroxycarbamide for children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2008 Jan;140(1):80-5.
255. Iyamu EW, Ekekezie C, Woods GM. In vitro evidence of the inhibitory capacity of chloroquine on arginase activity in sickle erythrocytes. *Br J Haematol*. 2007 Oct;139(2):337-43.
256. Solovey A, Kollander R, Shet A, Milbauer LC, Choong S, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. *Blood*. 2004 Aug 1;104(3):840-6.
257. Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med*. 2001 Jun;137(6):398-407.
258. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med*. 2003 Dec 15;115(9):721-8.
259. Lee SP, Ataga KI, Zayed M, Manganello JM, Orringer EP, Phillips DR, et al. Phase I study of eptifibatid in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2007 Nov;139(4):612-20.
260. Machado RF, Martyr S, Kato GJ, Barst RJ, Anthi A, Robinson MR, et al. Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Br J Haematol*. 2005 Aug;130(3):445-53.
261. Lionnet F, Bachmeyer C, Stankovic K, Tharaux PL, Girot R, Aractingi S. Efficacy of the endothelin receptor blocker bosentan for refractory sickle cell leg ulcers. *Br J Haematol*. 2008 Sep;142(6):991-2.
262. Walters MC. Cord blood transplantation for sickle cell anemia: bust or boom? *Pediatr Transplant*. 2007 Sep;11(6):582-3.
263. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Eckman JR, Buchanan GR, Rogers ZR, et al. Barriers to bone marrow transplantation for sickle cell anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1996 May;2(2):100-4.
264. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Rogers ZR, Dinndorf P, Davies SC, et al. Collaborative multicenter investigation of marrow transplantation for sickle cell disease: current results and future directions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1997 Dec;3(6):310-5.
265. Lebensburger J, Persons DA. Progress toward safe and effective gene therapy for beta-thalassemia and sickle cell disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2008 Mar;11(2):225-32.
266. Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J, Machado L, Kepka-Lenhart D, Morris SM, Jr., et al. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 Aug;25(8):629-34.
267. Morris CR, Poljakovic M, Lavriha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM, Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Jul 15;170(2):148-53.
268. Morris CR. New Strategies for the Treatment of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease : The Rationale for Arginine Therapy. *Treat Respir Med*. 2006;5(1):31-45.



269. McCaffrey MJ, Bose CL, Reiter PD, Stiles AD. Effect of L-arginine infusion on infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Biol Neonate*. 1995;67(4):240-3.
270. Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G, Acampora R, Coppola L, Cozzolino D, et al. The vascular effects of L-Arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J Clin Invest*. 1997 Feb 1;99(3):433-8.
271. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1172-9.
272. Baron AD. Hemodynamic actions of insulin. *Am J Physiol*. 1994 Aug;267(2 Pt 1):E187-202.
273. Roberts JD, Jr., Fineman JR, Morin FC, 3rd, Shaul PW, Rimar S, Schreiber MD, et al. Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N Engl J Med*. 1997 Feb 27;336(9):605-10.
274. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet*. 1991 Nov 9;338(8776):1173-4.
275. Atz AM, Wessel DL. Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome. *Anesthesiology*. 1997 Oct;87(4):988-90.
276. Sullivan KJ, Goodwin SR, Evangelist J, Moore RD, Mehta P. Nitric oxide successfully used to treat acute chest syndrome of sickle cell disease in a young adolescent. *Crit Care Med*. 1999 Nov;27(11):2563-8.
277. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998 Nov 15;336 ( Pt 1):1-17.
278. Wu G, Meininger CJ, Knabe DA, Bazer FW, Rhoads JM. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000 Jan;3(1):59-66.
279. Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother*. 2002 Nov;56(9):427-38.
280. Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Sep 7;275(3):715-9.
281. Graf P, Forstermann U, Closs EI. The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. *Br J Pharmacol*. 2001 Mar;132(6):1193-200.
282. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci*. 1999 Jul;55(8-9):1015-28.
283. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 25;93(13):6770-4.
284. Demiryurek AT, Cakici I, Kanzik I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol Toxicol*. 1998 Mar;82(3):113-7.
285. Lehninger AN, DL;Cox, MM. *Princípios de Bioquímica*. 2 ed ed. São Paulo: Sarvier; 1995.
286. Enwonwu CO, Xu XX, Turner E. Nitrogen metabolism in sickle cell anemia: free amino acids in plasma and urine. *Am J Med Sci*. 1990 Dec;300(6):366-71.
287. Coleman JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2002 Jul;129(1):4-10.

288. Lee SK, Kim JH, Yang WS, Kim SB, Park SK, Park JS. Exogenous nitric oxide inhibits VCAM-1 expression in human peritoneal mesothelial cells. Role of cyclic GMP and NF-kappaB. *Nephron*. 2002 Apr;90(4):447-54.
289. Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, Nichols JS, Coles WA, Hunter LA, et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol*. 2005 Sep;130(6):943-53.
290. Schnog JJ, Jager EH, van der Dijs FP, Duits AJ, Moshage H, Muskiet FD, et al. Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2004 Jun;83(6):371-5.
291. Sher GD, Olivieri NF. Rapid healing of chronic leg ulcers during arginine butyrate therapy in patients with sickle cell disease and thalassemia. *Blood*. 1994 Oct 1;84(7):2378-80.
292. Waugh WH. Arginine metabolism, pulmonary hypertension, and sickle cell disease. *Jama*. 2005 Nov 16;294(19):2432-3; author reply 3-4.
293. Boger RH, Bode-Boger SM. Asymmetric dimethylarginine, derangements of the endothelial nitric oxide synthase pathway, and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(5):539-45.
294. Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, et al. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2003 Sep 23;108(12):1493-8.
295. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2003 Aug 26;108(8):933-8.
296. Vallance P. Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk. *Lancet*. 2001 Dec 22-29;358(9299):2096-7.
297. Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E, Tavakkoli F, Castro O. Nitric Oxide Metabolites in Sickle Cell Anemia Patients after Oral Administration of Hydroxyurea; Hemoglobinopathy. *Hematology*. 2000;5(4):335-9.
298. Featherston WR, Rogers QR, Freedland RA. Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. *Am J Physiol*. 1973 Jan;224(1):127-9.
299. Closs EI. Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002 Jan;11(1):99-107.
300. Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA, Thompson JA, et al. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 18;98(26):15215-20.
301. Dias-Da-Motta P, Arruda VR, Muscara MN, Saad ST, De Nucci G, Costa FF, et al. The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 1996 May;93(2):333-40.
302. Boger RH, Bode-Boger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:79-99.
303. Tangphao O, Chalon S, Moreno H, Jr., Hoffman BB, Blaschke TF. Pharmacokinetics of L-arginine during chronic administration to patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 1999 Feb;96(2):199-207.
304. Morris SM, Jr. Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004 Jan;7(1):45-51.
305. Morris SM, Jr. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr*. 2004 Oct;134(10 Suppl):2743S-7S; discussion 65S-67S.

306. Tews JK, Bradford AM, Harper AE. Induction of lysine imbalance in rats: relationships between tissue amino acids and diet. *J Nutr.* 1981 Jun;111(6):968-78.
307. Weatherall D, Hofman K, Rodgers G, Ruffin J, Hrynkow S. A case for developing North-South partnerships for research in sickle cell disease. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):921-3.
308. Alexander N, Higgs D, Dover G, Serjeant GR. Are there clinical phenotypes of homozygous sickle cell disease? *Br J Haematol.* 2004 Aug;126(4):606-11.

## 5. Artigo

### **Supplementation with L-Arginine as complementary therapy for sickle cell disease**

Christina Matzenbacher Bittar<sup>1,2</sup>, Lúcia Mariano da Rocha Silla<sup>2</sup>, João Ricardo Friedrich<sup>2</sup>  
Camila Matzenbacher Bittar<sup>2</sup>, Mariana Coelho Gonçalves Meirelles<sup>3</sup>, Alessandra Paz<sup>2</sup>,  
Cristiane Weber<sup>2</sup>, Denise Leuhgeur<sup>2</sup>, Gustavo Fisher<sup>2</sup>, Liane Esteves Daudt<sup>2</sup>, Laura  
Fogliatto<sup>2</sup>, Rosane Bittencourt<sup>2</sup> and Sérgio Saldanha Menna Barreto<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Service of Clinical Pathology

<sup>2</sup>Service of Hematology and Bone Marrow Transplantation,

<sup>3</sup> Pharmaceutics

<sup>4</sup>Service of Pneumology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos,  
2350, Largo Eduardo Zaccaro - Phone: 55 51 21017684 - E-mail: cbittar@hcpa.ufrgs.br

## **Abstract:**

**Introduction:** In sickle cell disease ischemia-reperfusion injury and hemolysis produce endothelial dysfunction and chronic vasculopathy characterized by reduced nitric oxide and arginine bioavailability. Oral L-Arginine increases the availability of the natural precursor of nitric oxide (NO), a free radical that plays an important role in the pathogenesis of chronic vasculopathy. **Objective:** Evaluate the impact of supplementation with L-Arginine on pulmonary arterial pressure estimated through Transthoracic Doppler echocardiogram (TTDE) and measure the effect on the reduction of hemolysis, evaluated through the variation of serum levels of lactate dehydrogenase (LDH). **Material and methods:** Oral L-Arginine at a dose of 0.1 g/Kg/day was administered to outpatients with sickle cell disease (SCD) for six months, in a randomized and double-blind, placebo controlled, clinical trial. Forty patients completed the treatment, twenty received L-Arginine and twenty received Placebo. The systolic pressure of pulmonary artery was estimated through tricuspid regurgitant jet velocity (TRJV). **Results** The two groups, before the trial, were comparable in terms of gender, age, genotype and degree of anemia, degree of hemolysis, concomitant therapeutic scheme and disease complications. The study observed that in 6 patients with pulmonary arterial hypertension (PAH), defined as TRJV  $\geq 2.5$  m/s, that received L-Arginine, the TRJV was reduced from  $2.83 \pm 0.36$  m/s to  $2.46 \pm 0.36$  m/s, while in 4 patients with HAP who received Placebo, the TRJV increased from  $2.75 \pm 0.35$  m/s to  $2.80 \pm 0.18$  m/s, but without statistical significance ( $p=0.13$ ). LDH was reduced from  $1065 \pm 495$  U/L to  $784 \pm 267$  U/L in 19 patients (one patient missed the final test), that received L-Arginine, while in 19 patients (one patient missed the final test) who received Placebo the LDH level changed from  $952 \pm 383$  U/L to  $907 \pm 395$  U/L ( $p=0.03$ ). **Conclusion:** The administration of L-Arginine was well tolerated, resulted in tendency to reduced pulmonary arterial pressure in 6 patients with HAP, and promoted reduced hemolysis. Oral L-arginine seems to have a positive effect on patients with SCD.

**Key words:** Sickle cell disease, L-Arginine, hemolysis, LDH, nitric oxide, pulmonary arterial hypertension.

## Introduction

Sickle cell disease (SCD) is a severe hemoglobinopathy, presented with rigid and falciform erythrocyte, due to hemoglobin S polymerization, obstructing the circulation (1) and endothelial dysfunction (2) secondary to intravascular hemolysis. This is a monogenic disease, of recessive autosomal heritage pattern. Punctual mutation at gene of  $\beta$ -globin determines the molecular base of the disease, leads to replacement of an amino acid, which originates hemoglobin S (HbS or HBB: glu6val). It has high prevalence in global population, greater in tropical regions of Africa, but can be found in any part of the world (3, 4). Homozygotes (SS) or double heterozygotes for other hemoglobinopathy  $\beta$  (SC, S $\beta^0$ thalassemia) are individuals that present the symptoms of the disease. Clinical manifestations of SCD start at 6 months of age (5-11) and are characterized by chronic hemolytic anemia, recurrent vaso-occlusive crises in any tissue or organ, accompanied by intense pain, especially in bones, thorax and abdomen, complications with life threatening and chronic tissue damage (1, 12). The spectrum of clinical manifestations in SCD is broad and variable, they are influenced by environmental and socioeconomic factors and individual genetic variability, as well as associated epigenetic factors (13-15).

Clinical, *in vitro* and in transgenic mice studies lead to a better understanding of the complex phenomena associated with and involved in SCD pathogeny. HbS polymerizes in the cytoplasm of erythrocytes when deoxygenated, provoking hardening of erythrocytes (1). HbS polymers and increased self oxidation of HbS provoke hemolysis and vaso-occlusion. Both trigger a series of events that consume the NO, leading to vasoconstriction, ischemia/reperfusion lesion, production of oxygen free radicals, local and systemic inflammation, resulting in endothelial dysfunction with secretion of endothelin-1, increased consumption of NO, activation

of adhesion molecules and activation of coagulation (16), with consequent acute and chronic tissue injury and additional hemolysis (17). The NO, a highly diffusible free radical produced by endothelial cells from Arginine, appears as a central element in the pathogeny of SCD vasculopathy.(18). Its vessel dilatation action occurs through bonding with NO-receptor, the soluble guanylate cyclase, which is activated and produces 3'5' cyclic guanosine monophosphate (cGMP), that promotes smooth musculature of the vessels relaxation (19-21). Arginine is the only physiological substrate for the formation of nitric oxide (22). Alterations to Arginine metabolism in intravascular hemolytic diseases can contribute to the development of chronic vasculopathy (23-25). This condition of relative deficiency of NO in the pulmonary circulation, leading to vasoconstriction and vascular remodeling (26), is related to the development of PAH (27, 28). Chronic pulmonary deficiency, determining abnormal pulmonary function tests, can be the first objective sign of chronic pulmonary disease in SCD (29). Since 1990, echocardiographic studies have shown that around 30% of the patients with SCD develop PAH (30). Chronic pulmonary disease and PAH are the two main causes of death in patients of SCD (31-34), the latter being associated also with sudden cardiac death (35). PAH is present in both adults and children older than 10 years of age (36, 37). Average survival of patients with pulmonary arterial hypertension is 26 months (31), with few treatment options.

Current treatment strategies partially prevent or minimize clinical manifestations of SCD: (38-64), present positive effects and help extend survival. Unfortunately, around 40% of the patients do not respond to hidroxyurea (HU) and even present damage dissemination to many organs (45, 65, 66). Allogenic hematopoietic stem cell transplantation (67, 68) are limited to young patients with compatible related

donator, with promising results (69, 70). Gene therapy for SCD still do not present technical conditions for application in humans (71).

We propose to study L-Arginine in SCD patients based on literature data. The oral or parenteral administration of this amino acid in patients with or without SCD has demonstrated reduction of PAH and protection against oxidative damage, due to its capability to promote increase of intra-erythrocyte glutathione (23, 72-77). Two pilot studies demonstrated reduction of the pulmonary arterial pressure with the use of L-Arginine (72, 73); the production of NO was greater in 5 patients on HU therapy (74). Also in an experimental study, L-Arginine administered to transgenic mice with SCD induced the production of NO, with reduction of erythrocyte density due to inhibition of Gardos channels (78). Data are available suggesting that HU increases synthesis of NO and Arginine deficiency in these patients can limit the therapeutic benefit of HU (49, 79).

Arginine is a conditionally essential amino acid, present in protein diet and in humans it is synthesized mainly in kidney from citrulline (80). The synthesis is affected in situations of high catabolism, and obtaining Arginine from diet becomes fundamental. Arginine is a food supplement of low toxicity and few side effects. Doses of 30 to 60g/day are well tolerated.

L-Arginine is well absorbed orally, in the form of Arginine hydrochloride, achieves maximum peak 2 hours after the administration (81) and is metabolized within 4 to 6 hours (82). Arginine is metabolized by the liver and, after renal filtration, it is reabsorbed by the distal tubules. Adverse reactions are rare, mild and dose-dependent (81). The oral utilization for long periods can cause only epigastric discomfort and cephalalgia. Monitoring of renal and hepatic functions is



recommended. There is no report on any adverse effect from the use of Arginine hydrochloride in patients with SCD (76).

**Objectives:**

Evaluate the effect of supplementation with L-Arginine on pulmonary arterial pressure estimated through transthoracic Doppler echocardiogram and measure the effect on the reduction of hemolysis, evaluated through the variation of serum levels of lactate dehydrogenase.

**Material and methods:**

**Patients**

A randomized double-blind clinical trial placebo-controlled, was offered to all outpatients with SCD followed on the Hemoglobinopathy Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). Fifty-one patients were randomized into 2 groups obtained with statistical program PEPI, version 3.0. The patients, as well the parents, in case of underaged patients were informed of all project details and signed the informed consent to this study. The inclusion criteria were: patients with SCD, confirmed through hemoglobin electrophoresis, genotypes SS, SC and S $\beta$ <sup>0</sup>thalassemia, over 1 year of age. The exclusion criteria were: hepatic dysfunction: glutamic pyruvic transaminase (GPT) > 3x normal, renal dysfunction: creatinine >2x normal, development of stroke during the treatment, increase of methemoglobin > 5x normal, allergy to L-Arginine, development of priapism, using sildenafil, calcium channel blockers, nitroglycerin or other nitrates and pregnancy. The study was approved by the Health Research and Ethics Committee of the Study and Postgraduate Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, number 04-487. A security committee was created , comprised of two physicians, who supervised the

clinical outcomes during the study. The patients were consecutively assigned to the randomization spreadsheets to receive L-Arginine or Placebo, identified as drug A and B, each capsule contained 500 mg of L-Arginine or 500 mg of Placebo (Mannitol). Only the pharmacist and the security committee knew the content of A and B capsules. The patients were instructed to take drug A or B assigned to them at the dose of 0.1g/kg/day, divided into 3 times a day. The concomitant ingestion of increased quantity of liquid was recommended.

### **Studied Variables**

The variables were evaluated in the patients out of the period of crises as part of the care service: weight, blood pressure, laboratory exams: full blood count, creatinine and dosage of methemoglobin as baseline measures and at each visit. Saturation of peripheral O<sub>2</sub>, fetal hemoglobin, LDH and TRJV measured through TTDE before and after concluding the treatment, in patients with minimal tricuspid regurgitant jet, whose jet velocity was undetectable or minimal, the pulmonary arterial pressure was considered normal.

The tests of pulmonary function were performed in patients above 6 years of age through spirometry; measurement of pulmonary volumes and diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO) and plain chest radiography were performed on a date close to the study. Spirometry were measured through FLOWSCREEN PRO Erich Jaeger GmbH & CoKG. The results were expressed as percentage of estimated and corrected values, considering gender, age and weight. Measurements of pulmonary volumes and diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO) were performed using pletismograph by Erich Jaeger GmbH & CoKG. The tests were performed according to 2002 guidelines for pulmonary function tests of *Sociedade Brasileira de Pneumologia* (Brazilian Society of Pulmonology). The pulmonary

function classification followed the 1991 norms of the American Thoracic Society (83). The subjective evaluation of improvement considered Likert scale of 3 alternatives: worse, no difference and better. The number of adverse reactions and of in patient care were obtained from patients electronic records or from the follow up in the out patient.

Transthoracic Doppler echocardiogram was performed according to previous norms (84) using HDI 500 ATL/Philips as a routine test. The pulmonary arterial hypertension was defined as TRJV $\geq$ 2.5 m/s.

### **Statistical Analysis**

Sample Size: The comparison of two independent samples requires 19 patients in each group to estimate a difference, at the end, of the moderate magnitude sequence (standardized effect size = 1.1), considering the significance level of 0.05 and statistical power of 90%. The studied utilized statistical program PEPI, version 3.0.

Data analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (version 14.0 SPSS, Chicago, IL).

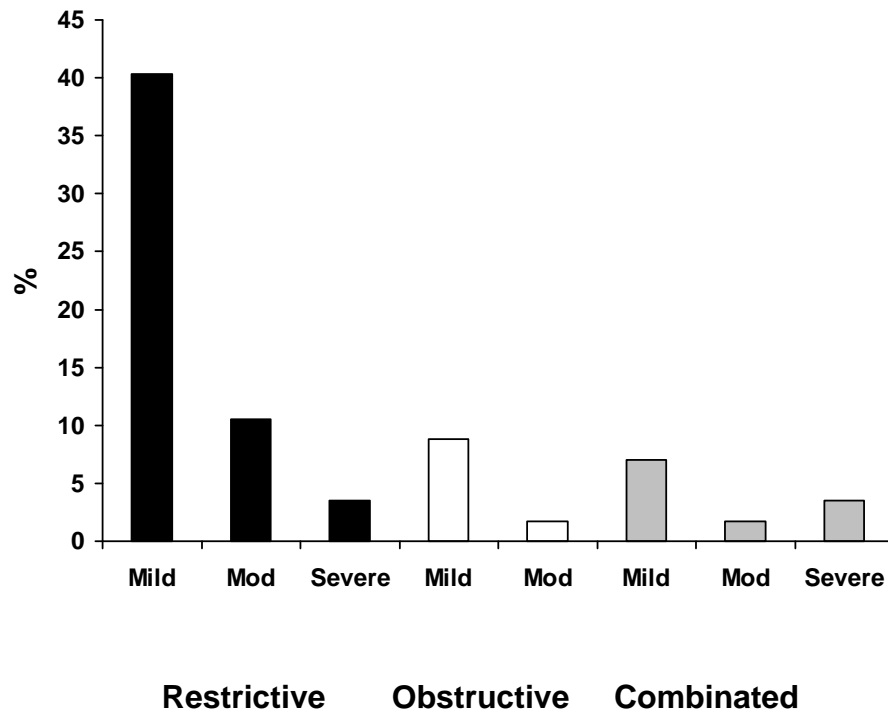
The category variables were compared using Chi-square test with Yates correction or Fisher's exact test. The quantitative variables with symmetrical distribution were compared using Student's t test for independent samples or Mann-Whitney test for asymmetrical distribution. The mean values of variables were compared along the time and between the groups using the Variance Analysis for repeated measurements. The coefficient of determination was established to examine the power of association between variables.

A significance level of 5% was considered.

### **Results**

Considering the 68 patients enrolled, 51 were randomized and 40 concluded the treatment, 20 received L-Arginine and 20 received Placebo, between October 17, 2006 and January 4, 2008. Eleven patients abandoned the treatment, 9 after  $82 \pm 46$  days for personal reasons, but 2 females reported difficulty in swallowing too many capsules and even were unable to drink the powder in solution, one was taking L-Arginine for 14 days and the other was taking Placebo for 120 days. Three/11 had PAH, 2/11 were on L-Arginine therapy, 9/11 were on Placebo, 7/11 were women and 7/11 were adults. One patient with PAH taking Placebo did not show up for the final TTDE. Two patients one of each group did not have the baseline LDH measured.

The data of all 40 patients who concluded the treatment was: 20 men, 20 women, median age: 30 years old (11-40 interquartile interval) min. 2, max. 61 years old, being 10(25%) children, genotype: SS 28/40 (70%), SC 7/40 (17,5%), S $\beta^0$  Talassemia 5/40(12,5%). Most using HU 34/40(80%). The incidence of abnormal pulmonary function tests was: deficient pulmonary function detected through spirometry in 31/37(78.9%) of the patients, the reduced forced vital capacity, with mean 65.37% of the estimated value determined a predominance of restrictive ventilatory disorder, with mild intensity the most frequent 16/37(43.2%) (Figure 1); diffusing capacity of the lung for carbon monoxide was reduced in 17/28 (60.7%), with mean 59.26% of the estimated value. PAH (TRJV  $\geq 2.5$  m/s) was found in 11/40 (27.5%), all of them were adults, all of them presented saturation of peripheral O<sub>2</sub> within normal limits.



**Figure 1:** Frequency of ventilatory disorder category characterized through spirometry in 37/40 of the patients. Mild Restrictive Ventilatory Disorder (FVC\* estimated 80-60%), Moderate (FVC\* estimated 59-51%) and Severe (FVC\* estimated  $\leq 50\%$ ), Mild Obstructive Ventilatory Disorder (VEF1\*\* estimated 80-60%) and Moderate (FEV1\*\* estimated 59-41%), Mild, Moderate and Severe Combined Ventilatory Disorder (reduction of FEV1\*\* and FVC\*). \*FVC: Forced Vital Capacity; \*\*FEV1: Forced Expiratory Volume in the 1st second of FCV elimination.

The demographic data, genotype, disease complications and associated treatment before the clinical trial and duration of the trial are presented on table 1

**Table 1:** Demographic data, clinical data, treatment associated and and treatment duration period according to the patient randomization groups.

Variables	Arginine		Placebo		p
	N (%) or mean±dp	n	n (%) or mean±dp	n	
Male	8 (40.0)	20	12 (60.0)	20	0.46
Age, in years	30 (6 to 37)	20	30 (13 to 41)	20	0.34
Children (<12 years of age)	6(30)	20	4(20)	20	0.48
HbSS	12 (60.0)	20	16 (80.0)	20	0.11
HbSC	6 (30.0)	20	1 (5.0)	20	0.11
HbSβ <sup>0</sup> thalassemia	2 (10.0)	20	3 (15.0)	20	0.11
Trial duration , days	206.4±20.7	20	203.7±31.3	20	0.75
<b>SCD Complications</b>					
Priapism	0 (0)	8	6 (50.0)	12	0.20
Stroke	4 (20.0)	20	1 (5.0)	20	0.34
Osteonecrosis	6 (30.0)	20	3 (15.0)	20	0.45
Cholecystectomy	6 (30.0)	20	9 (45.0)	20	0.51
Let ulcer	2 (10.0)	20	1 (5.0)	20	0.99
Cardiomegaly	6 (30.0)	20	8 (44.4)	18	0.56
Pulmonary parenchymal lesion	5 (25.0)	20	8 (44.4)	18	0.36
Radiological PAH	1 (5.0)	20	1 (5.6)	18	0.99
TRJV ≥2.5 m/sec.	6(30.0)	20	5(25.0)	20	0.99
Reduced DLCO	8 (61.5)	13	9 (60.0)	15	0.99
Ventilatory disorder	15 (75.0)	20	17 (85.0)	20	0.69
FEV1, % of estimated value	72.7±18.1	20	72.6±13.0	20	0.98
<b>Associated treatment</b>					
HU	15 (75.0)	20	19 (95.0)	20	0.23
Ex-change blood transfusion	3 (15.0)	20	0 (0)	20	0.23

The category variables are expressed as n(%) and compared using Chi-square test, with Yates correction or Fisher's Exact test.

The quantitative variables were described as mean±standard deviation and compared using Student's t test for independent samples with symmetrical distribution or median (interquartile interval) and Mann-Whitney test with asymmetrical distribution.

PAH: Pulmonary arterial hypertension, TRJV: Tricuspid regurgitant jet velocity, DLCO: Diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; FEV1: Forced expiratory volume in the first second. HU: Hidroxiurea

The demographic data, genotype, disease complications and associated treatment and duration of trial were similar in the two groups (Table1).

The baseline characteristics of all patients in both groups are presented in Table 2.

**Table 2:** Comparison of baseline measurements in the two groups.

Baseline measurements	Arginine n=20	Placebo n=20	P
Weight kg	43.8±20.2	53.9±24.0	0.16
SAP mm Hg	107.3±23.3	110.4±20.3	0.66
DAP mmHg	63.7±10.9	70.0±16.5	0.16
Hb g/dl	8.3±1.5	8.4±1.8	0.94
LDH U/l *	1065 ± 495	952 ±382	0.73
Percentage of fetal Hb (%)	5.95 (2.62 to 17.50)	10.30 (5.40 to 17.10)	0.32
Creatinine mg/dl	0.49±0.16	0.63±0.24	0.03
TRJV** m/s	2.43±0.42	2.40±0.45	0.87
Saturation of peripheral O2%	97.2±1.2	98.0±1.2	0.08
Methemoglobin %	0.36±0.14	0.54±0.26	0.69
Hospitalization 6 months before	7 (35.0%)	2 (10.0%)	0.13

The category variables are expressed as n(%) and compared using Chi-square test, with Yates correction or Fisher's Exact test.

The quantitative variables were described as mean±standard deviation and compared using Student's t test for independent samples with symmetrical distribution or median (interquartile interval) and Mann-Whitney test with asymmetrical distribution.

SAP: Systolic arterial pressure; DAP: diastolic arterial pressure; LDH: Lactate dehydrogenase, TRJV: Tricuspid regurgitant jet velocity

\*LDH was measured in 19 patients of Arginine group and in 19 patients of Placebo group.

\*\* TRJV was measurable in 16 patients of Arginine group and in 10 patients of Placebo group.

Before the starting the treatment, the baseline characteristics of all patients in both groups were similar, with the exception of the creatinine level that was significantly different between the groups, although normal in both.

The analyses of the baseline characteristics and after six-month treatment are presented in Table 3.

**Table 3: Variables measured before and after six months of treatment and variance analysis (ANOVA)**

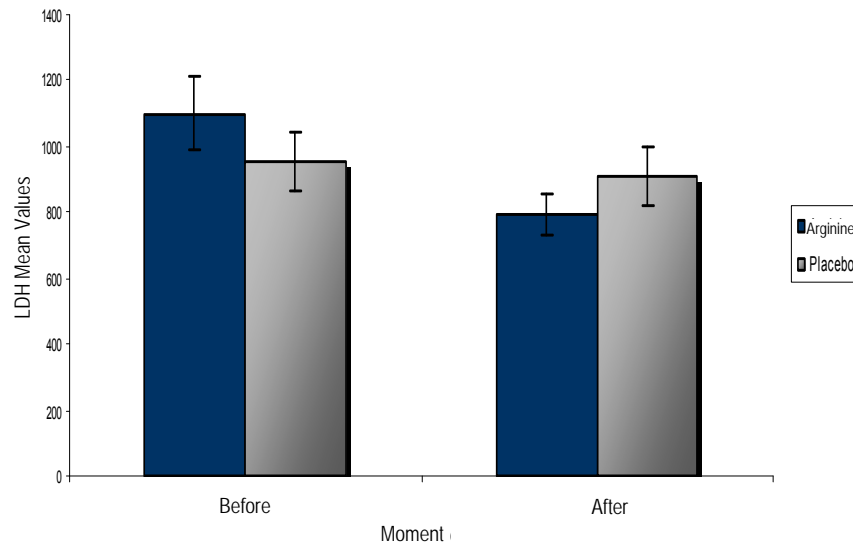
Variables	L-Arginine		Placebo		p period	p interaction	p group
	Before	After	Before	After			
TRJV* (m/s)	2.43±0.42	2.22±0.24	2.37±0.46	2.31±0.63	0.08	0.29	0.95
LDH (U/l)**	1066 ± 495	784 ± 267	952 ± 383	907 ± 395	0.004	0.03	0.96
Hb mg/dl	8.3±1.5	8.7±1.5	8.4±1.8	8.8±1.7	0.005	0.65	0.84
Fetal Hb %	6.0 (2.6-17.5)	7.8 (1.6-11.7)	10.3 (5.4-17.1)	15.7 (9.1-18.7)	0.28	0.10	0.07
Weight kg***	42.9±20.4	43.7±19.5	53.9±24.0	54.7±22.7	0.01	0.98	0.12
SAP mmHg	109.8±21.0	111.4±21.3	110.4±20.3	110.8±20.8	0.74	0.84	0.99
DAP mmHg	64.9±9.6	64.7±12.2	70.0±16.5	69.3±14.9	0.80	0.89	0.22
Creatinine mg/dl	0.49± 0.16	0.50±0.18	0.63±0.24	0.58±0.27	0.43	0.15	0.09
Final impression: better		12(60%)		13(65%)			1.0
Methemoglobin %	0.39±0.14	0.45±0.25	0.42±0.27	0.44±0.29	0.39	0.67	0.87

The quantitative variables were described as mean±standard deviation with symmetrical distribution or median (interquartile interval) with asymmetrical distribution. Mean values were compared along the time and between the groups using ANOVA test for repeated measurements. TRJV: Tricuspid regurgitant jet velocity; LDH: Lactate dehydrogenase; Hb: hemoglobin; SAP: Systolic Arterial Pressure; DAP: Diastolic Arterial Pressure.

TRJV\* n=24 (15 in L-Arginine group and 9 in Placebo group) LDH\*\* n=38 (19 in L-Arginine group and 19 in Placebo group) Weight\*\*\* n=39 (19 in L-Arginine group and 20 in placebo group)

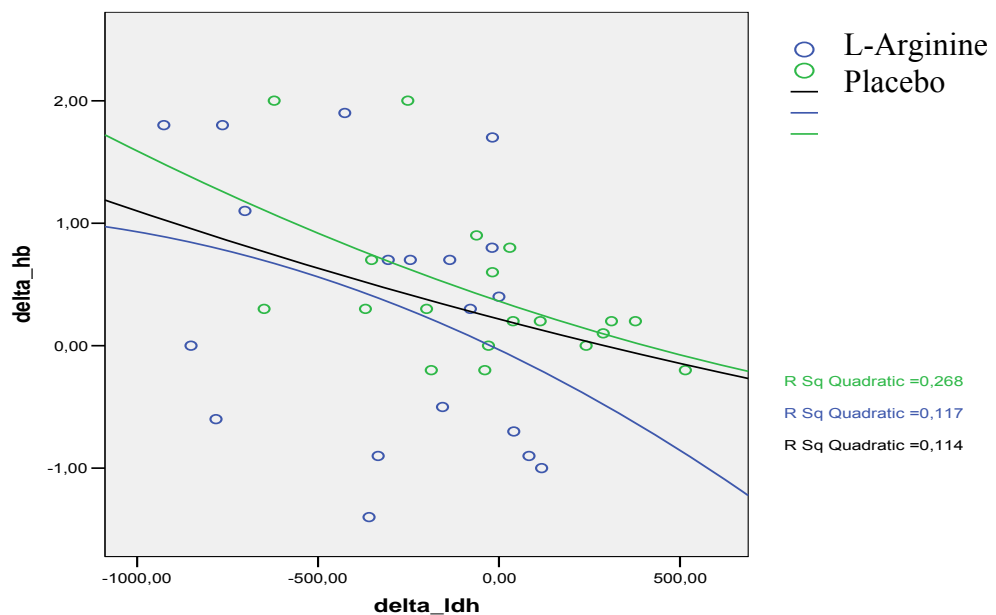
For all patients who had measurable TRJV, the 15 patients who received L-Arginine do not presented difference in reduction of TRJV compared with the 9 patients who received Placebo (difference of mean values: 0.22m/s and 0.06m/s, respectively, p=0.29). The effect on LDH, marker of hemolysis, measured in 19 patients of each group, decreased significantly (p=0.03) in the patients who received L-Arginine (reduction from 1066 ± 495U/L to 784 ± 267) then in the Placebo group (952 ± 383 to 907 ± 395U/L) . The dosage of hemoglobin increased significantly in the patients of both groups along the time (p=0.05), but this increase did not present statistical significance between the groups (p=0.65) (Figure2) .





**Figure 2: The administration of L-Arginine to 19 patients promoted reduced LDH from 1065 ± 495U/L to 784 ± 267U/L, while the reduction in the 19 patients who received Placebo was from 952 ± 383 to 907 ± 395 U/L (p=0.03).**

The reduced LDH showed correlation with increased hemoglobin (Figure 3).



**Figure 3: Correlation of reduced LDH with increased hemoglobin**

There was increased fetal hemoglobin in both groups along the time (p=0.28), but without statistical significance in terms of period and drug interaction(p=0,10). Weight increased significantly in patients of both groups along the time (p=0.01), but this increase did not present statistical significance between the groups (p=0.98). Systolic and diastolic arterial pressures, creatinine level and subjective impression of improvement were not different in the two groups. The methemoglobin, utilized as measurement of treatment adherence, again did not showed difference between the groups (p= 0.19). although was slightly higher after the treatment conclusion in the patients who received L-Arginine..

The analyses of the baseline characteristics and after six-month treatment only of the patients with PAH are presented in Table 4.

**Table 4: Measurements of TRJV, LDH, Hemoglobin and Fetal Hemoglobin of the patients with PAH before and after 6 months of treatment.**

Variables	L-Arginine N 6		Placebo N 4		P duration	P interaction	P group
	Before	After	Before	After			
TRJV $\geq$ 2.5m/s	2.83 $\pm$ 0.36	2.46 $\pm$ 0.36	2.75 $\pm$ 0.35	2.80 $\pm$ 0.18	0.25	0.13	0.55
LDH U/L	1122 $\pm$ 496	733 $\pm$ 257	828 $\pm$ 225	776 $\pm$ 185	0.06	0.13	0.53
Hb g/dL	8.2 $\pm$ 1.5	8.8 $\pm$ 1.5	7.3 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 1.3	0.12	0.78	0.23
Fetal Hb %	10.2 $\pm$ 9.4	11.7 $\pm$ 10.4	9.6 $\pm$ 4.9	11.7 $\pm$ 3.9	0.25	0.84	0.96

The variables are described as mean $\pm$ standard deviation. Mean values were compared along the time and between the groups using ANOVA test for repeated measurements.

TRJV: Tricuspid regurgitant jet velocity; LDH: Lactate dehydrogenase; Hb: hemoglobin

The 10 patients with PAH did not show reduced TRJV with statistical significance, although 6 patients who received L-Arginine showed a trend to have a reduction (mean of 0.37m/s), while the small group that received Placebo presented a slight increase (mean of 0.05m/s)p=0.13 (Figure 4).

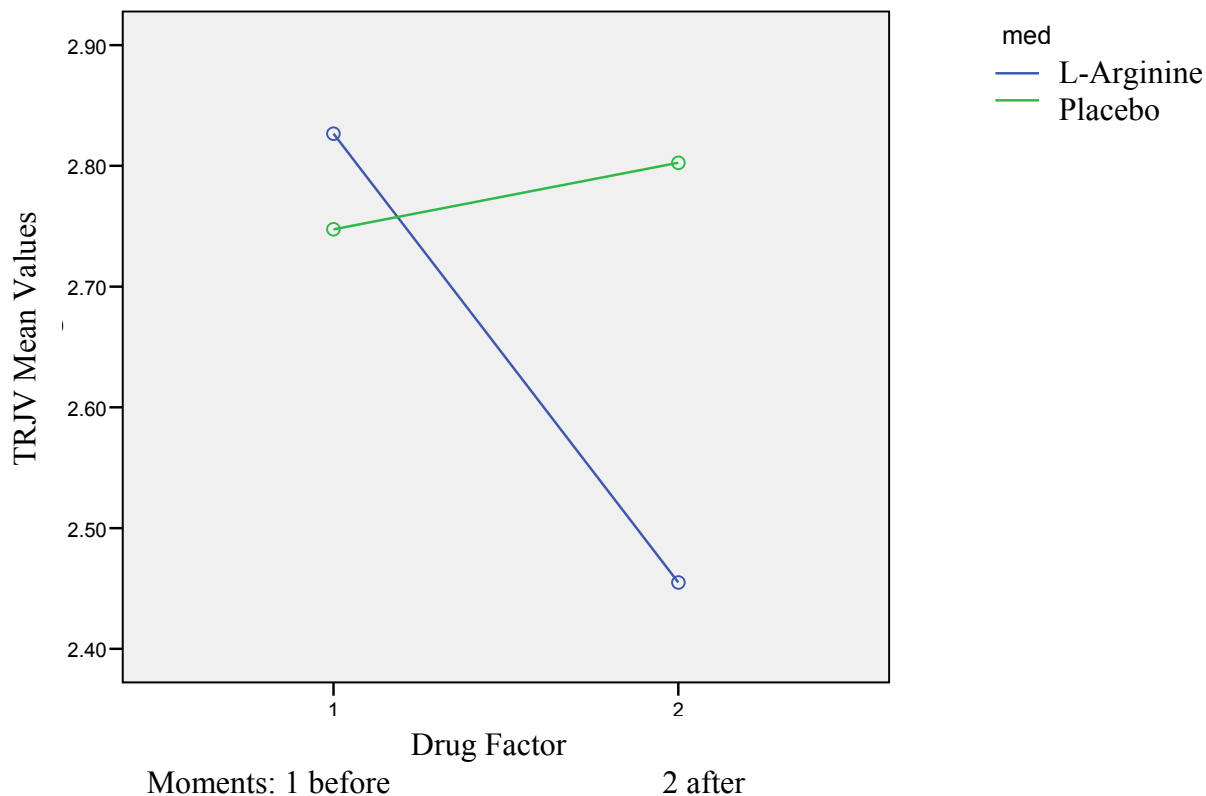


Figure 4. In 10 patients with PAH, the effect of L-Arginine after six months of treatment shows in six patients a tendency to greater reduction in tricuspid regurgitation velocity ( $p=0.13$ ).

The response in these patients with PAH in terms of reduced LDH, level of hemoglobin and fetal hemoglobin was not significant ( $p=0.13$ ,  $p=0.78$  and  $p=0.84$ , respectively). The patients with PAH did not present greater LDH level than in those patients without PAH.

There was no reduction in the number of patient hospitalizations when compared to the number of the patient hospitalizations during the six months before the treatment, in the same group (L-Arginine:  $p=0.99$  and Placebo:  $p=0.99$ ), and no difference in the number of patient hospitalizations before ( $p=0.13$ ) and during the treatment ( $p=0.23$ ) when comparing both groups.

The total number of leucocytes after the treatment conclusion in patients that received concomitant HU was: mean 8991/uL (min. 2790u/ L and max. 19500u/ L) and in patients that did not receive HU: 9216u/L (min. 5500/uL and max. 13500/uL), p=0.89.

The number of side effects and or interoccurrences during the clinical trial are presented in Table 5.

**Table 5:** Comparison of the number of inter-occurrences during the treatment period between the L-Arginine and Placebo groups.

Side effects/inter-occurrences	L-Arginine n=20	Placebo n=20	P
Diarrhea	3(15)	6(30)	0.50
Nauseas	1(5)	1(5)	1.00
Somnolence	0	1(5)	1.00
Pain crises	11(55)	8(40)	0.50
Infection	6(30)	5(25)	1.00
Required hospitalization during the treatment	7(35)	3(15)	0.28

The category variables are expressed as n(%) and compared using Chi-square test, with Yates correction or Fisher's Exact test.

The number of patients that reported diarrhea was higher, but not statistically significant in the group that received Placebo (Mannitol). Diarrhea was considered mild and have occurred after the drug ingestion and only in the first weeks of the treatment (2/6), one patient that received L-Arginine reported diarrheic evacuation always after taking the first dose of the day. The number of patients who reported pain crises, presented infections and required hospitalizations during the clinical trial was similar in both groups.

## Discussion

This is the first study that evaluates the effect of administration of l-Arginine to SCD patients for a long period. The purpose was to determine whether greater

plasmatic concentrations of L-Arginine, during 6 months, tend to reduce pulmonary arterial pressure and reduce hemolysis, . Arginine is the only physiological substrate for the formation of nitric oxide (22). The nitric oxide participates in several physical and chemical reactions and plays an important role in the functional integrity maintenance of vascular endothelium. The nitric oxide is quickly deactivated in the presence of SCD due to free plasma hemoglobin (85). In intravascular hemolytic anemia, just as in SCD, Arginine is reduced due to the action of arginase released in erythrocyte hemolysis, with consequent reduced production of NO (86, 87). The benefits expected with the Arginine supplementation are through increasing NO production : vasodilation (21), reducing pulmonary pressure, reducing expression of adhesion molecules (88), inhibiting platelet aggregation (20), increasing fetal hemoglobin (49, 89), reducing ischemia/reperfusion lesion, reducing oxidative stress (90, 91), inhibiting endothelin-1(92) and promoting hemolysis reduction (76). On the other hand, more Arginine will be available to reduce the effect of uncoupling of NO syntetase produce superoxide, reatcive oxigen species and oxidative stress(93), more arginine will be available to be transported to endotelial cell normalizing the Arginine to Ornithine ratio(30, 77), more Grados channel inhibition(78), more Arginina will be available to over come the competition for the cellular transport and for ON syntetase with the elevated analogs methylarginines (86) and more production of intra-erythrocyte glutathione promoting further hemolysis reduction (23, 76)

The response, after six months of treatment, in all patients, resulted in a reduction in TRJV mean values, slightly greater in patients that received L-Arginine than in patients from the Placebo group, although not reached statistical significance probably because small number of patients. The response in the small group of ten patients with PAH showed a greater tendency to reduced TRJV mean values in the

L-Arginine group, while the four patients in the Placebo group presented slight increase in TRJV mean values

Regarding the LDH, a marker of hemolysis, the response to the treatment showed a significant reduction in the patients who received L-Arginine ( $p=0.03$ ). In relation to the behavior of LDH, in the group of ten patients with PAH, six of them who received L-Arginine presented LDH reduction from  $1122\pm 496$ U/L to  $733\pm 257$ U/L and four of them who received Placebo presented smaller reduction, from  $828\pm 225$ U/L to  $777\pm 195$  U/L ( $p=0.13$ ). This analysis was probably affected by the small number of patients with PAH evaluated. Although in both groups the reduced LDH presented a correlation with the increased hemoglobin, the greater reduction of LDH in the patients who received L-Arginine did not represent an expected and significant increment of the hemoglobin level; the explanation to this fact could be the inhibition of erythropoiesis, observed in some patients receiving hydroxyurea, and due to the concomitant exchange transfusion treatment in three patients of this group. We did not find the expected increase in fetal hemoglobin.

The increase in methemoglobin, utilized as a measurement of treatment adherence, was slightly greater after the treatment in patients who received L-Arginine, but also without statistical significance ( $p=0.19$ ). The total number of leucocytes after the treatment conclusion in patients with concomitant use of HU and L-Arginine was also utilized as an indicator of treatment adherence. The mean values of leucocytes was 8991/uL, and the range from 2790 to 19500/uL suggests a partial adhesion or HU used in sub-doses; two patients of this group did not receive HU, one SC and one SS.

In relation to pulmonary function tests in our study, 80.7% of the patients presented some degree of pulmonary dysfunction, reduction of the diffusing capacity

of the lung for carbon monoxide in 60.7% and the pattern of restrictive dysfunction in 40.5% were the most prevalent alterations. Similar data are presented in a study with 310 patients with SCD (84). The pulmonary dysfunction is explained by a combination of factors, such as incomplete inspiration, due to discomfort caused by prior rib and vertebral column bone lesions, previous episodes of pulmonary infection, prior acute thoracic syndromes and the development of pulmonary fibrosis, all associated with vaso-occlusive and hemolytic phenotype. The reduced diffusing capacity of the lung for carbon monoxide was found in 69% of the patients and is considered as a marker of interstitial lung disease (84, 94).

Literature on the effects of oral L-Arginine supplementation is just emerging, clinical and experimental studies since the beginning of this century have shown promising results. The oral L-Arginine administration at the doses of 0.1 and 0.2g/kg in a placebo-controlled clinical essay to 23 normal healthy adults, promoted, 2 hours after, increased plasmatic levels of Arginine and nitrate, NO metabolite, and increased concentration of NO in exhaled air (95). The administration of L-Arginine single dose at doses of 0.05 and 0.1g /kg to 4 normal controls, 6 patients with SCD out of crises and 3 patients in vaso-occlusive crisis showed that the dose of 0.1g/kg promoted increased levels of nitrate 3 hours after in patients in vaso-occlusive crisis (77). The administration of L-Arginine single dose (0.1g/kg) complemented, 30 minutes after, with a dose of 1g hydroxyurea to 5 patients with SCD and under continuous use of hydroxyurea promoted a significant increase of nitrate level and exhaled NO, with maximal peak 60 minutes after and slow fall within max. 240 minutes; this response was smaller in the same patients, without prior L-Arginine (74).

The oral L-Arginine administration in a non-controlled clinical essay published in 2003, with 10 patients with PAH secondary to SCD, treated for 5 days with a 0.1g/kg/day dose three times a day, promoted an average reduction of 15.2% in the pulmonary arterial pressure ( $63.9 \pm 13$  to  $54.2 \pm 12$  mmHg,  $p=0.002$ ) in 9 patients (73). Another study, randomized, double-blind and placebo-controlled, published in 2001, involving patients with PAH of other etiologies and without SCD, administered oral L-Arginine at the dose of 0.05g/kg to 10 patients and Placebo (galactosis) to 9 patients, and promoted a 9% reduction in the mean pulmonary arterial pressure ( $53 \pm 4$  to  $48 \pm 4$  mmHg,  $p < 0.05$ ) (72).

Another study, porcine aortic endothelial cells in culture, showed that the administration of Arginine does not increase the production of NO under normal conditions, which occurs only with cells very depleted of Arginine, without this amino acid for a long time (19).

The positive effects of supplementation with L-Arginine in the experimental model with transgenic mice with SCD are stronger than in humans, in terms of reduced hemolysis, reduced resistance to NO, normalization of oxidative stress markers and increased level of antioxidants. The greater effectiveness in the experimental model is probably due to the lower concentration of arginase in the erythrocytes of these animals (96).

The minimal dose of L-Arginine required to reestablish the NO function is still unknown, as it varies with the one's state and his/her disease (97). Due to this variability in the response, it is necessary to determine the dose individually (98). The effective dose to revert situations of endothelial dysfunction is 6 to 8 g to adults, but doses of 18 to 20 g are probably more efficient, without provoking significant adverse effects (97). There is a tendency to use 6 to 30 g a day (97, 99, 100); however, the



adherence to the treatment is affected due to the high number of capsules taken and the sour taste of the powder in the solution, which can be improved if mixed with fruit juices (76).

Published after the beginning of this clinical trial, a more recent multicentric, blind and randomized study of phase II, using doses of 0.05g/kg, 0.1g/kg and placebo, conducted in 51 children with SCD, where 48 who concluded at least one month of treatment did not show any improvement in the analyzed variables as Arginine serum level, NO production and measurement of erythrocyte density, which did not change significantly after one or three months of treatment. The absence of response was at first attributed to low doses of L-Arginine, smaller than the pharmacological dose (101). Another study is in progress, not yet published, where adults with SCD using hydroxyurea received high doses of Arginine for three months, the preliminary results show that, despite the increase of plasmatic Arginine and Ornithine and intra-erythrocyte glutathione, there was no alteration of TRJV (102).

This way, the question remains related to whether higher doses would be required and if only patients with hyper hemolysis and increase of endothelin-1 would benefit from the treatment (103).

It is still not possible to determine whether the effects of L-Arginine administration found in our study present clinical relevance, if the intensity of lactate dehydrogenase reductions (mean: 282U/L), much greater than the reduction found in the Placebo group (mean: 45U/L) ( $p=0.03$ ) and the reduction of tricuspid regurgitation velocity of 0.37m/s in patients with PAH( $p=0.13$ ) constitute a significant clinical benefit. Lactate dehydrogenase was analyzed in 38 patients, 19 in each group, and TRJV was analyzed in 10 patients with PAH, 6 receiving L-Arginine and 4 receiving Placebo. The absence of response, more significant in our experiment, can be

attributed to the fleeting effect of NO, maybe a greater hypotension response in the pulmonary artery occurs immediately after the ingestion of L-Arginine. The small size of the sample of patients with PAH might have been insufficient to detect a significant difference in the reduction of PAH. The L-Arginine dose might have been insufficient to nullify the high activity of arginase and win the competition with asymmetric dimethylarginine, and both were not measured. The absence of treatment adherence cannot be excluded either. The adherence was measured only through the production of methemoglobin, which did not show a significant increase, only a tendency to increase in the L-Arginine group.

The effectiveness and potential adverse effects of L-Arginine have not been explored adequately, no confirmation has been provided of whether the administration for long periods increases or reduces the production of proline and polyamines, and this way, a broader investigation is required (102). L-Arginine is still part of the group of new small therapeutic molecules for vasculopathy of SCD, along with citrulline, glutamine, niacine, L4F, sildenafil, bosentan hydroxyurea and ICA-17043 administered orally; nitric oxide and carbon monoxide through inhalation and sodium nitrite through endovenous feeding, which still require additional studies (102).

In conclusion, the administration of L-Arginine, in our study, at the dose of 0.1g/kg, was well tolerated, promoted a reducing in hemolysis, and in six patients with pulmonary arterial hypertension, a tendency to reduced tricuspid regurgitation velocity.

#### Perspectives

Additional studies are required to confirm the small benefit found. New studies with a higher number of patients could confirm the benefits of L-Arginine

supplementation with enough security to indicate this therapy as routine and associated with current treatments.

### **Declaration of Competing Interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Acknowledgements**

This project was supported in part through a fund provided by FIPE (Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and by HEMOAMIGOS Association.

The authors wish to thank Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. for the L-Arginine donation, and the patients from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre for their participation.

## References:

1. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1997 Sep 11;337(11):762-9.
2. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004 Mar;11(2):129-51.
3. Steinberg M. Disorders of hemoglobin. New York: Cambridge Unpolimerização de hemoglobina S deoxigenada no interior dos eritrócitosiversity press; 2001.
4. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001;79(8):704-12.
5. Hegyi T, Delphin ES, Bank A, Polin RA, Blanc WA. Sickle cell anemia in the newborn. *Pediatrics*. 1977 Aug;60(2):213-6.
6. Powars DR. Natural history of sickle cell disease--the first ten years. *Semin Hematol*. 1975 Jul;12(3):267-85.
7. O'Brien RT, McIntosh S, Aspnes GT, Pearson HA. Prospective study of sickle cell anemia in infancy. *J Pediatr*. 1976 Aug;89(2):205-10.
8. Stevens MC, Hayes RJ, Vaidya S, Serjeant GR. Fetal hemoglobin and clinical severity of homozygous sickle cell disease in early childhood. *J Pediatr*. 1981 Jan;98(1):37-41.
9. Bainbridge R, Higgs DR, Maude GH, Serjeant GR. Clinical presentation of homozygous sickle cell disease. *J Pediatr*. 1985 Jun;106(6):881-5.
10. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1995 Jul 15;86(2):776-83.
11. Watson J. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. *Am J Med Sci*. 1948 Apr;215(4):419-23.
12. Diggs LW, Williams DL. Treatment of painful sickle cell crises with papaverine: preliminary report. *South Med J*. 1963 May;56:472-4.
13. Steinberg MH. SNPing away at sickle cell pathophysiology. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5420-1.
14. Kutlar A. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single-gene disorder. *Med Princ Pract*. 2005;14 Suppl 1:15-9.
15. Ashley-Koch AE, Elliott L, Kail ME, De Castro LM, Jonassaint J, Jackson TL, et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5721-6.
16. Raghavachari N, Xu X, Harris A, Villagra J, Logun C, Barb J, et al. Amplified expression profiling of platelet transcriptome reveals changes in arginine metabolic pathways in patients with sickle cell disease. *Circulation*. 2007 Mar 27;115(12):1551-62.
17. Wood KC, Granger DN. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Sep;34(9):926-32.
18. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007 Jan;21(1):37-47.
19. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988 Jun 16;333(6174):664-6.
20. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999 Dec;34(6):879-86.

21. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1993;28:97-9.
22. Hallemeesch MM, Lamers WH, Deutz NE. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clin Nutr.* 2002 Aug;21(4):273-9.
23. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama.* 2005 Jul 6;294(1):81-90.
24. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama.* 2005 Apr 6;293(13):1653-62.
25. Hsu LL, Champion HC, Campbell-Lee SA, Bivalacqua TJ, Mancini EA, Diwan BA, et al. Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood.* 2007 Apr 1;109(7):3088-98.
26. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *Faseb J.* 2004 Nov;18(14):1746-8.
27. Tuder RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF. The pathobiology of pulmonary hypertension. *Endothelium. Clin Chest Med.* 2001 Sep;22(3):405-18.
28. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation.* 2004 Jan 20;109(2):159-65.
29. Powars D, Weidman JA, Odom-Maryon T, Niland JC, Johnson C. Sickle cell chronic lung disease: prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine (Baltimore).* 1988 Jan;67(1):66-76.
30. Sutton LL, Castro O, Cross DJ, Spencer JE, Lewis JF. Pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Am J Cardiol.* 1994 Sep 15;74(6):626-8.
31. Haque AK, Gokhale S, Rampy BA, Adegboyega P, Duarte A, Saldana MJ. Pulmonary hypertension in sickle cell hemoglobinopathy: a clinicopathologic study of 20 cases. *Hum Pathol.* 2002 Oct;33(10):1037-43.
32. Castro O, Hoque M, Brown BD. Pulmonary hypertension in sickle cell disease: cardiac catheterization results and survival. *Blood.* 2003 Feb 15;101(4):1257-61.
33. Vichinsky EP. Pulmonary hypertension in sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2004 Feb 26;350(9):857-9.
34. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2004 Feb 26;350(9):886-95.
35. Machado RF, Mack AK, Martyr S, Barnett C, Macarthur P, Sachdev V, et al. Severity of pulmonary hypertension during vaso-occlusive pain crisis and exercise in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2007 Jan;136(2):319-25.
36. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor Jt, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood.* 2006 Mar 15;107(6):2279-85.
37. Liem RI, Young LT, Thompson AA. Tricuspid regurgitant jet velocity is associated with hemolysis in children and young adults with sickle cell disease evaluated for pulmonary hypertension. *Haematologica.* 2007 Nov;92(11):1549-52.
38. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1999 Apr 1;340(13):1021-30.
39. Consensus conference. Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *Jama.* 1987 Sep 4;258(9):1205-9.

40. Vichinsky E, Hurst D, Earles A, Kleman K, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. *Pediatrics*. 1988 Jun;81(6):749-55.
41. Adamkiewicz TV, Sarnaik S, Buchanan GR, Iyer RV, Miller ST, Pegelow CH, et al. Invasive pneumococcal infections in children with sickle cell disease in the era of penicillin prophylaxis, antibiotic resistance, and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination. *J Pediatr*. 2003 Oct;143(4):438-44.
42. Adamkiewicz TV, Silk BJ, Howgate J, Baughman W, Strayhorn G, Sullivan K, et al. Effectiveness of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with sickle cell disease in the first decade of life. *Pediatrics*. 2008 Mar;121(3):562-9.
43. Halasa NB, Shankar SM, Talbot TR, Arbogast PG, Mitchel EF, Wang WC, et al. Incidence of invasive pneumococcal disease among individuals with sickle cell disease before and after the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*. 2007 Jun 1;44(11):1428-33.
44. Borgna-Pignatti C. Modern treatment of thalassaemia intermedia. *Br J Haematol*. 2007 Aug;138(3):291-304.
45. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*. 1995 May 18;332(20):1317-22.
46. Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2008 Mar 27;358(13):1362-9.
47. Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1984 Aug;74(2):652-6.
48. Iyamu EW, Cecil R, Parkin L, Woods G, Ohene-Frempong K, Asakura T. Modulation of erythrocyte arginase activity in sickle cell disease patients during hydroxyurea therapy. *Br J Haematol*. 2005 Nov;131(3):389-94.
49. Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B, et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2002 Feb;116(2):436-44.
50. Orringer EP, Parker JC. Hydroxyurea and sickle cell disease. *Hematol Pathol*. 1992;6(4):171-8.
51. Ferguson RP, Arun A, Carter C, Walker SD, Castro O. Hydroxyurea treatment of sickle cell anemia in hospital-based practices. *Am J Hematol*. 2002 Aug;70(4):326-8.
52. Vichinsky EP, Lubin BH. A cautionary note regarding hydroxyurea in sickle cell disease. *Blood*. 1994 Feb 15;83(4):1124-8.
53. de Montalembert M, Belloy M, Bernaudin F, Gouraud F, Capdeville R, Mardini R, et al. Three-year follow-up of hydroxyurea treatment in severely ill children with sickle cell disease. The French Study Group on Sickle Cell Disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997 Jul-Aug;19(4):313-8.
54. Kinney TR, Helms RW, O'Branski EE, Ohene-Frempong K, Wang W, Daeschner C, et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. Pediatric Hydroxyurea Group. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1550-4.
55. Scott JP, Hillery CA, Brown ER, Misiewicz V, Labotka RJ. Hydroxyurea therapy in children severely affected with sickle cell disease. *J Pediatr*. 1996 Jun;128(6):820-8.

56. Ferster A, Vermylen C, Cornu G, Buyse M, Corazza F, Devalck C, et al. Hydroxyurea for treatment of severe sickle cell anemia: a pediatric clinical trial. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):1960-4.
57. Jayabose S, Tugal O, Sandoval C, Patel P, Puder D, Lin T, et al. Clinical and hematologic effects of hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *J Pediatr*. 1996 Oct;129(4):559-65.
58. Hoppe C, Vichinsky E, Quirolo K, van Warmerdam J, Allen K, Styles L. Use of hydroxyurea in children ages 2 to 5 years with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000 Jul-Aug;22(4):330-4.
59. Wang WC, Wynn LW, Rogers ZR, Scott JP, Lane PA, Ware RE. A two-year pilot trial of hydroxyurea in very young children with sickle-cell anemia. *J Pediatr*. 2001 Dec;139(6):790-6.
60. Claster S, Vichinsky E. First report of reversal of organ dysfunction in sickle cell anemia by the use of hydroxyurea: splenic regeneration. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):1951-3.
61. Hackney AC, Hezier W, Gullledge TP, Jones S, Strayhorn D, Busby M, et al. Effects of hydroxyurea administration on the body weight, body composition and exercise performance of patients with sickle-cell anaemia. *Clin Sci (Lond)*. 1997 May;92(5):481-6.
62. Wang WC, Helms RW, Lynn HS, Redding-Lallinger R, Gee BE, Ohene-Frempong K, et al. Effect of hydroxyurea on growth in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS Study. *J Pediatr*. 2002 Feb;140(2):225-9.
63. Sumoza A, de Bisotti R, Sumoza D, Fairbanks V. Hydroxyurea (HU) for prevention of recurrent stroke in sickle cell anemia (SCA). *Am J Hematol*. 2002 Nov;71(3):161-5.
64. de Montalembert M, Begue P, Bernaudin F, Thuret I, Bachir D, Micheau M. Preliminary report of a toxicity study of hydroxyurea in sickle cell disease. French Study Group on Sickle Cell Disease. *Arch Dis Child*. 1999 Nov;81(5):437-9.
65. Vn M. *Pediatric pathology and molecular medicine*. London: Taylor&Francis; 2001.
66. Atweh GF, Schechter AN. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising the therapeutic bar in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2001 Mar;8(2):123-30.
67. Panepinto JA, Walters MC, Carreras J, Marsh J, Bredeson CN, Gale RP, et al. Matched-related donor transplantation for sickle cell disease: report from the Center for International Blood and Transplant Research. *Br J Haematol*. 2007 Jun;137(5):479-85.
68. Walters MC. Cord blood transplantation for sickle cell anemia: bust or boom? *Pediatr Transplant*. 2007 Sep;11(6):582-3.
69. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Eckman JR, Buchanan GR, Rogers ZR, et al. Barriers to bone marrow transplantation for sickle cell anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1996 May;2(2):100-4.
70. Walters MC, Patience M, Leisenring W, Rogers ZR, Dinndorf P, Davies SC, et al. Collaborative multicenter investigation of marrow transplantation for sickle cell disease: current results and future directions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1997 Dec;3(6):310-5.
71. Lebensburger J, Persons DA. Progress toward safe and effective gene therapy for beta-thalassemia and sickle cell disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2008 Mar;11(2):225-32.

72. Nagaya N, Uematsu M, Oya H, Sato N, Sakamaki F, Kyotani S, et al. Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with precapillary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Mar;163(4):887-91.
73. Morris CR, Morris SM, Jr., Hagar W, Van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D, et al. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jul 1;168(1):63-9.
74. Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J, Machado L, Kepka-Lenhart D, Morris SM, Jr., et al. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003 Aug;25(8):629-34.
75. Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM, Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Jul 15;170(2):148-53.
76. Morris CR. New Strategies for the Treatment of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease : The Rationale for Arginine Therapy. *Treat Respir Med.* 2006;5(1):31-45.
77. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Sweeters N, Simon J, Vichinsky EP, et al. Arginine therapy: a novel strategy to induce nitric oxide production in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2000 Nov;111(2):498-500.
78. Romero JR, Suzuka SM, Nagel RL, Fabry ME. Arginine supplementation of sickle transgenic mice reduces red cell density and Gardos channel activity. *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1103-8.
79. Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E, Tavakkoli F, Castro O. Nitric Oxide Metabolites in Sickle Cell Anemia Patients after Oral Administration of Hydroxyurea; Hemoglobinopathy. *Hematology.* 2000;5(4):335-9.
80. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998 Nov 15;336 ( Pt 1):1-17.
81. Boger RH, Bode-Boger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:79-99.
82. Tangphao O, Chalon S, Moreno H, Jr., Hoffman BB, Blaschke TF. Pharmacokinetics of L-arginine during chronic administration to patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond).* 1999 Feb;96(2):199-207.
83. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. American Thoracic Society. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Nov;144(5):1202-18.
84. Klings ES, Wyszynski DF, Nolan VG, Steinberg MH. Abnormal pulmonary function in adults with sickle cell anemia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Jun 1;173(11):1264-9.
85. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, 3rd, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1383-9.
86. Closs EI. Expression, regulation and function of carrier proteins for cationic amino acids. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002 Jan;11(1):99-107.
87. Vallance P. Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk. *Lancet.* 2001 Dec 22-29;358(9299):2096-7.
88. Lee SK, Kim JH, Yang WS, Kim SB, Park SK, Park JS. Exogenous nitric oxide inhibits VCAM-1 expression in human peritoneal mesothelial cells. Role of cyclic GMP and NF-kappaB. *Nephron.* 2002 Apr;90(4):447-54.



89. Haynes J, Jr., Baliga BS, Obiako B, Ofori-Acquah S, Pace B. Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3945-50.
90. Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(3):411-20.
91. Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, Hebbel RP. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*. 2000 Jul 1;96(1):314-20.
92. Bassenge E. Endothelial function in different organs. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996 Nov-Dec;39(3):209-28.
93. Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 25;93(13):6770-4.
94. Flaherty KR, Martinez FJ. The role of pulmonary function testing in pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2000 Sep;6(5):404-10.
95. Kharitonov SA, Lubec G, Lubec B, Hjelm M, Barnes PJ. L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clin Sci (Lond)*. 1995 Feb;88(2):135-9.
96. Kaul DK, Zhang X, Dasgupta T, Fabry ME. Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jul;295(1):H39-47.
97. Maxwell AJ, Cooke JP. Cardiovascular effects of L-arginine. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998 Jan;7(1):63-70.
98. Evans RW, Fernstrom JD, Thompson J, Morris SM, Jr., Kuller LH. Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *J Nutr Biochem*. 2004 Sep;15(9):534-9.
99. Merimee TJ, Rabinowitz D, Fineberg SE. Arginine-initiated release of human growth hormone. Factors modifying the response in normal man. *N Engl J Med*. 1969 Jun 26;280(26):1434-8.
100. Lerman A, Burnett JC, Jr., Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR, Jr. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation*. 1998 Jun 2;97(21):2123-8.
101. Styles L, Kuypers F, Kesler K, Reiss U, Lebeau P, Nagel R, et al. Arginine Therapy Does Not Benefit Children with Sickle Cell Anemia Results of the CSCC Clinical Trial Consortium Multi-Institutional Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2007 November 16, 2007;110(11):2252-.
102. Kato GJ. Novel small molecule therapeutics for sickle cell disease: nitric oxide, carbon monoxide, nitrite, and apolipoprotein a-I. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;2008:186-92.
103. Krajewski ML, Hsu LL, Gladwin MT. The proverbial chicken or the egg? Dissection of the role of cell-free hemoglobin versus reactive oxygen species in sickle cell pathophysiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jul;295(1):H4-7.

## 6. Considerações finais

A doença falciforme foi considerada uma doença órfã, invisível, por muitos anos. Nas duas últimas décadas, graças ao crescente interesse médico, acadêmico e principalmente pelo progresso significativo no entendimento da patogenia das manifestações clínicas e crônicas da doença, mais pacientes estão sendo beneficiados (2, 307, 308). A hipertensão arterial pulmonar na doença falciforme é multifatorial, tem correlação com a intensidade de hemólise e é um fator de risco independente para morte prematura (38).

A administração de L-arginina, em nosso estudo, na dose de 0,1g/kg a vinte pacientes com doença falciforme foi bem tolerada, promoveu uma redução da hemólise medida pela LDH sem traduzir esta resposta em aumento de hemoglobina, e nos seis pacientes, que apresentavam hipertensão arterial pulmonar, mostrou uma tendência a diminuição da velocidade do fluxo de regurgitação tricúspide. Estudos adicionais são necessários para confirmar o discreto benefício encontrado.

Há necessidade de confirmar os discretos benefícios obtidos com nosso estudo, fica a sugestão de aguardar os resultados oficiais de outros estudos e talvez desenhar novo ensaio clínico. Administrar L-Arginina a um maior número de pacientes, selecionando apenas os pacientes com fenótipo hemolítico predominante, deficientes em arginina, e nestes administrar doses maiores de L-Arginina, em preparações mais palatáveis. Avaliar o efeito do tratamento com testes mais sensíveis, como medidas do dano oxidativo, do nível da arginase plasmática, do nível sérico da metilarginina assimétrica, do nível de prolina e poliaminas, além da VFRT. Monitorar a aderência ao tratamento através relação arginina-ornitina, que é

um melhor marcador da biodisponibilidade da arginina, talvez possamos obter a confirmação dos benefícios da suplementação do L-Arginina com a segurança necessária para a indicação desta terapia, como rotina e associada aos tratamentos já bem estabelecidos.

L-Arginina foi doada pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda e as verbas obtidas FIPE e Hemoamigos custearam a manipulação do medicamento e do placebo. As avaliações e acompanhamentos foram realizados como assistenciais. Contaram com o comprometimento do Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea, do Serviço de Pneumologia, do Serviço de Patologia Clínica e do Laboratório de Métodos não Invasivos do Serviço de Cardiologia.

## **ANEXOS:**

### **Ficha do protocolo L- arginina no tratamento da DF**

1. Identificação
  - 1.1 Nome  
registro
  - 1.2 Nome da Mãe:
  - 1.3 Endereço:
  - 1.4 Telefone
  - 1.5 Sexo
  - 1.6 Data do diagnóstico
  - 1.7 Data do primeiro atendimento HCPA
  - 1.8 Uso de HU data do início
  - 1.9 Antibiótico
  - 1.10 Função pulmonar antes do tratamento:
  - 1.10b Função pulmonar pós tratamento
  - 1.11 Função cardíaca com estimativa da pressão da artéria pulmonar antes do início do tratamento através de ecodoppler cardíaco
  - 1.11b Função cardíaca com estimativa da pressão arterial no final do tratamento através de ecodoppler cardíaco.
  - 1.12 Peso: antes final:
  - 1.13 Altura: antes : final:
  - 1.14 Exames laboratoriais (Ver Tabela)
    - 1.14a Exames laboratoriais em sangue venoso periférico a cada consulta Tabela1 Hemograma completo, Reticulócitos, Creatinina, aminotransferases: GOT, GPT e GGT, Bilirrubina, LDH,
    - 1.14b Exames laboratoriais em sangue arterial a cada consulta: Gasometria arterial com dosagem de meta-hemoglobina.
    - 1.14c Exame laboratoriais em sangue periférico antes e depois: Dosagem de arginase, MDA, endotelina-1, carbonyl, nitrito e nitrato.
    - 1.14d Exame laboratoriais em sangue periférico Dosagem de Hemoglobina Fetal antes e no final do tratamento.

### **Ficha de acompanhamento**

	Pré-trat	1sem	2sem	3sem	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6 final
<b>Data</b>									
<b>Peso</b>									
<b>Altura</b>									
<b>PA</b>									
<b>Leucócitos</b>									
<b>Neutrófilos</b>									
<b>Linfócitos</b>									
<b>Ht</b>									
<b>Hb</b>									
<b>VCM</b>									
<b>Reticulócitos</b>									
<b>Plaquetas</b>									
<b>PO2</b>									
<b>Sat O2</b>									
<b>Meta-hemoglobina</b>									
<b>PAP</b>									
<b>Bilirrubina Total</b>									
<b>Bilirrubina indireta</b>									
<b>LDH</b>									
<b>GGT</b>									
<b>GOT</b>									
<b>GPT</b>									
<b>Creatinina</b>									
<b>Hb. Fetal</b>									
<b>Arginina</b>									
<b>Citrulina</b>									

<b>Ornitina</b>									
<b>Prolina</b>									
<b>Acido Glutâmico</b>									
	Pré-trat	1sem	2sem	3sem	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6 final
<b>Diarréia</b>									
<b>Calorões</b>									
<b>Internações Emerg.</b>									
<b>Internações Hospital</b>									
<b>Crises algicas</b>									
<b>Infecções</b>									
<b>Úlcera de perna</b>									
<b>Interrupção tratamento</b>									

## **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **Administração de L – Arginina a um grupo de pacientes com doença falciforme e os efeitos serão comparados a um grupo de pacientes com doença falciforme que receberá uma substância sem efeito este estudo é denominado Estudo Duplo-Cego Randomizado**

1. Justificativa: a doença falciforme é uma doença que pode ser grave, requer tratamento contínuo e com vários medicamentos. No entanto, existem alguns sintomas que o tratamento atualmente disponível, não consegue evitar ou mesmo tratar.
2. Objetivos do estudo: Testar a L-arginina, que é um nutriente (aminoácido), administrado por via oral, que parece melhorar ou evitar os sintomas da doença e prevenir complicações, especialmente problemas pulmonares (hipertensão pulmonar) ou úlceras de perna.
3. Riscos e Desconfortos: os estudos anteriores já demonstraram que este medicamento, nas doses propostas, é seguro, não prejudica os pacientes com doença falciforme e tem poucos efeitos colaterais. Raramente pode causar desconforto abdominal, diarreia e calorões. Não afeta a pressão arterial, a temperatura ou os batimentos cardíacos.
4. Possíveis Benefícios: melhora da circulação sanguínea, menor risco de desenvolver doença pulmonar, menor número de crises de dor, melhora da anemia, melhora as úlceras de pernas.
5. Procedimentos Envolvidos: Todo o paciente que for incluído no estudo receberá por sorteio a medicação (L-Arginina) ou uma substância sem ação terapêutica (placebo). Não sabemos a que grupo você pertencerá. Isto é necessário e durará somente 6 meses. Você deverá tomar a medicação conforme a receita. Ingerir de 2 a 4 litros de líquido por dia, e realizar os exames de sangue solicitados. A maioria dos exames de sangue são os que você já faz na rotina deste ambulatório. Será preciso retirar mais um frasco (de aproximadamente 5 ml) para podermos medir o medicamento em teste, no seu sangue e todas as outras substâncias envolvidas no metabolismo deste (arginina, citrulina, ornitina e glutamina). Os exames e as consultas serão mais frequentes do que as da rotina. Serão ao todo 9 consultas e nove coletas de sangue. Uma por semana durante 3 semanas e após, 1 por mês. Será preciso também uma amostra de sangue arterial para medir a oxigenação e a meta-hemoglobina no início e no final do tratamento. Informamos que a coleta de sangue da veia causa desconforto e o risco de manchas roxas, a coleta de sangue arterial causa maior desconforto e também o risco de manchas roxas no local da coleta; estes riscos são menores se é feita compressão prolongada sobre o ponto da coleta. Ainda serão

necessários dois exames especiais: 1. Ecocardiograma (para medir a função cardíaca e a pressão da artéria pulmonar). 2. Teste da função pulmonar (que mede a capacidade respiratória). Estes dois exames (que já são realizados 1 vez por ano na rotina) deverão ser realizados antes e no final do tratamento. Será tirada uma foto digital das úlceras de pernas( caso você as tiver) antes do tratamento, aos 3 meses e no final para documentar o efeito do tratamento. Após 6 meses os resultados serão analisados e o paciente volta às consultas nos intervalos habituais.

Eu..... Abaixo assinado ou o responsável legal pelo paciente....., fui informado (a) dos objetivos especificados nesta pesquisa, de forma detalhada e clara. Recebi as informações específicas sobre cada procedimento, dos desconfortos e riscos previstos, tanto quanto aos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas com clareza, e sei que poderei solicitar novas informações a qualquer momento, mesmo durante a pesquisa. Além disso, tenho o direito e a liberdade de retirar o meu consentimento de participação na pesquisa, em face de novas informações.

A Prof.Dra.Lúcia Mariano da Rocha Silla, Dra. Christina Bittar ou o Dr. João Friedrish certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial e serão utilizadas apenas para fins científicos. A pesquisa poderá ser interrompida, a critério dos pesquisadores, caso ocorram risco ou benefícios diferentes do previsto.

Os telefones para contato a qualquer hora são Dra. Christina Bittar (51) 99925715 e

Dr.João Friedrish (51) 99958314.



## Orçamento

### Orçamento exames complementares 60 pacientes (A) Assistência (P) Pesquisa

	Número	Preço unidade R \$	Preço total R\$
Consultas (A)	180		
Consultas(P)	360	2,55	918,00
RX de tórax (A)	60		
RX de tórax(P)	60	9,5	570,00
Ecocardiograma (A)	60		
Ecocardiograma(P)	60	20,48	1.228,80
Espirometria,DifusãoCO, Volumes pulmonares (A)	60		
Espirometria,DifusãoCO, Volumes Pulmonares(P)	60	82,5	4950,00
Gasometria arterial (A)	60		
Gasometria arterial(P)	60	15,65	939,00
GGT (A)	180		
GGT(P)	360	3,51	1263,20
GOT (A)	180		
GOT(P)	360	2,01	723,60
GPT (A)	180		
GPT(P)	360	2,01	723,60
LDH (A)	180		
LDH (P)	360	3,68	1324,80
Hemograma+ Plaquetas (A)	180		
Hemograma+Plaquetas (P)	360	4,11	1479,60

Reticulócitos (A)	180		
Reticulócitos (P)	320	2,73	873,60
Bilirrubinas (A)	180		
Bilirrubinas(P)	320	2,01	643,20
Creatinina (A)	180		
Creatinina (P)	320	1,85	592,00
Hemoglobina Fetal (A)	60		
Hemoglobina Fetal(P)	60	2,73	163,80
Dosagem de amino ácidos Arginina, Citrulina, Ornitina, Ácido glutâmico e Prolina	540	15,65	8451,00

Medicamento: L Arginina Base + Placebo: R\$16.850,00

Orçamento final:

Consultas: R\$: 918,00

Medicamento + Placebo: R\$16.850,00

Provas de função pulmonar: R\$4.950,00

RX de tórax: R\$570,00

Ecocardiograma: R\$1.228,80

Exames de laboratório: R\$ 17.177,40

Duas passagens de ônibus da cidade como ressarcimento para 6 consultas, por paciente: 360 passagens: Preço unitário R\$1,75. Total : R\$ 630,00

Total: R\$ 37.863,20

Cronograma;

Iniciar a pesquisa após aprovação pelo comitê de pesquisa e Ética em pesquisa, e a obtenção do custeio com verbas solicitadas a Fundação Palmares, CNPq e FAPERGS.

Christina Matzenbacher Bittar

Porto Alegre, 6 de junho de 2005.