

## Determinação dos níveis de malonaldeído e nitrito em indivíduos portadores de traço falciforme

### *Determination of levels of malondialdehyde and nitrite in individuals with sickle falciform trace*

<sup>1</sup>Jouse Lima do Nascimento, Rivelilson Mendes de Freitas<sup>2</sup>; Lúcio Fernandes Pires<sup>3</sup>; Romélia Pinheiro Gonçalves<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Farmacêutica e Analista Clínica.

<sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI),

<sup>3</sup>Mestrando em Farmacologia pela Universidade Federal do Piauí.

<sup>4</sup>Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### Resumo

**Introdução:** Pacientes com traço falciforme são frequentemente expostos a estresse oxidativo devido ao aumento da produção de espécies reativas derivadas do oxigênio. A doença também pode ser caracterizada pelo aumento dos níveis plasmáticos de produtos da peroxidação lipídica e do consumo de óxido nítrico. **Objetivo:** O objetivo do presente trabalho foi delinear o perfil epidemiológico e comparar as alterações plasmáticas dos parâmetros oxidativos (nitrito e malonaldeído (MDA)) entre portadores do traço falciforme e pacientes com perfil de hemoglobina normal. **Metodologia:** Foram colhidas 70 amostras, sendo 50 de portadores do traço falciforme (Grupo Hb AS) e 20 do grupo controle (Grupo Hb AA). Para a confirmação do diagnóstico laboratorial, as amostras de sangue foram submetidas ao procedimento eletroforético em pH alcalino e ao teste de solubilidade. O método empregado para determinar a peroxidação lipídica foi baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico e para mensurar o conteúdo de nitrito foi usado o método de GREEN. **Resultados:** O grupo Hb AS ( $0,24 \pm 0,02$ ) apresentou valor médio dos níveis séricos de MDA semelhante ao grupo Hb AA ( $0,20 \pm 0,02$ ;  $p=0,3138$ ). Em relação aos níveis séricos de nitrito, verificou-se um aumento de 92% no grupo Hb AS ( $4,6 \pm 0,33$ ) quando comparado ao grupo Hb AA ( $2,4 \pm 0,22$ ;  $p<0,0009$ ). **Conclusão:** Em suma, o perfil desses portadores do traço falciforme atendidos é de mulheres jovens, com baixa escolaridade, casadas e que não exercem atividade remunerada. Considerando os parâmetros oxidativos, os pacientes com traço falciforme apresentam níveis mais elevados de nitrito plasmático.

**Palavras-chave:** Traço falciforme. Malondialdeído. Estresse Oxidativo. Perfil de Saúde.

#### Abstract

**Introduction:** Patients with sickle cell trait are often exposed to oxidative stress due to increased production of reactive species derived from oxygen. Disease may also be characterized by increased plasma levels of lipid peroxidation products and the consumption of nitric oxide. **Objective:** The aim of this study was to describe epidemiological profile and compare changes of plasma oxidative parameters (nitrite and malondialdehyde (MDA)) between carriers of the sickle cell trait and profile of patients with normal hemoglobin. **Methodology:** there were collected 70 samples; 50 of them were from carriers of sickle cell trait (Hb AS group) and 20 in the control group (Hb AA group). To confirm laboratory diagnosis, blood samples were subjected to electrophoresis procedure in alkaline pH and solubility test. Method used to determine lipid peroxidation was based on reaction with thiobarbituric acid and to measure the nitrite content the GREEN method was used. **Results:** AS Hb group ( $0.24\pm 0.02$ ) showed a mean serum MDA value similar to Hb AA group ( $0.20\pm 0.02$ ,  $p=0.3138$ ). With respect to nitrite serum levels, there was an increase of 92% in the Hb AS group ( $4.6\pm 0.33$ ) when compared to AA Hb group ( $2.4\pm 0.22$ ,  $p<0.0009$ ). **Conclusion:** Profile of these carriers of sickle cell trait is seen in young women with low education, married and not pursuing gainful activity. Considering the oxidative parameters, patients with sickle cell trait have higher levels of plasma nitrite.

**Keywords:** Sickle Cell Trait. Malondialdehyde. Oxidative Stress. Health Profile.

#### INTRODUÇÃO

No Brasil, o traço falciforme é uma característica genética prevalente em virtude, principalmente, da quantidade de negros na população e do processo de miscigenação.<sup>1</sup> Os estudos entre doadores de sangue mostram que a prevalência do traço falciforme é maior em Estados Nordestinos, embora possa ser encontrada em todas as regiões brasileiras.<sup>2</sup>

A heterozigose para a hemoglobina S (Hb AS) define uma situação relativamente comum, clinicamente benigna, em que o indivíduo apresenta as hemoglobinas A e S.<sup>2</sup> Sua prevalência varia de 6 a 10%. O nível de Hb S também é variável nas diferentes populações e usualmente está abaixo de 45%.<sup>3</sup> O traço falciforme, portanto, caracteriza o portador assintomático, clinicamente normal sem alterações hematológicas.<sup>3</sup> Os indivíduos com traço falciforme são doadores de sangue clinicamente e hematologicamente saudáveis.<sup>4</sup> Entretanto, a

Correspondência / Correspondence: Romélia Pinheiro Gonçalves. Rua Pereira Valente, 640 -Meireles - Ap.701 60160-250, Fortaleza, Ceará. e-mail: romeliapinheiro@ig.com.br

utilização deste sangue é restrita, principalmente em portadores de hemoglobinopatias e na acidose láctica em recém nascidos.<sup>5</sup>

O balanço redox em sistemas orgânicos é determinado pela presença de pares redox que sofrem freqüentes interconversões entre o estado reduzido e o oxidado.<sup>6</sup> Mudanças nesse balanço podem causar estresse oxidativo. A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró- e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com as moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos.<sup>7</sup>

A produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. As EROs e as ERN têm importante função biológica. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre os sistemas pró- e antioxidante com predomínio dos pró-oxidantes.<sup>8</sup>

No sangue circulam importantes antioxidantes, bem como biomarcadores da peroxidação lipídica das membranas celulares.<sup>9</sup> Atualmente, o malonaldeído (MDA) é considerado como um biomarcador geral de dano oxidativo plasmático. Por sua vez, o óxido nítrico (NO•) é rapidamente metabolizado no plasma a outros produtos estáveis. Quando em presença do radical superóxido (O<sub>2</sub>-•) converte-se em peroxinitrito (ONOO-), que promove diferentes danos aos sistemas biológicos.<sup>10</sup> Pesquisas recentes apontam novos alvos de investigação terapêutica direcionadas a restabelecer a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO).<sup>11</sup> Estudos demonstram que mais de 50% dos pacientes com anemia falciforme apresentam baixa biodisponibilidade endógena do NO.<sup>12</sup>

Pacientes com traço falciforme são freqüentemente expostos a um estresse oxidativo devido ao desequilíbrio entre a produção de EROs e as enzimas antioxidantes. A doença também é caracterizada pelo dano na membrana celular caracterizada pelo aumento dos produtos da peroxidação lipídica (MDA e nitrito) e no aumento do consumo de óxido nítrico (NO).<sup>13</sup> Diante deste contexto, mensuramos os níveis de MDA e nitrito, para verificarmos a presença ou não de danos na membrana eritrocitária de portadores do traço falciforme.

Estudos recentes sugerem que pacientes com anemia falciforme sofrem decréscimo das reservas de NO principalmente durante as crises vaso-oclusivas<sup>14</sup> e na síndrome de seqüestro agudo,<sup>15</sup> sendo os níveis de NO inversamente proporcional

aos sintomas dolorosos, de forma que a diminuição da biodisponibilidade do NO pode contribuir para a fisiopatologia da anemia falciforme.<sup>16</sup>

Neste trabalho, pretende-se delinear o perfil epidemiológico e determinar as alterações plasmáticas dos parâmetros oxidativos (nitrito e MDA) entre portadores do traço falciforme, bem como comparar os níveis destes marcadores biológicos com os dos pacientes com perfil de hemoglobina normal. Baseado nos nossos resultados será identificado o perfil plasmático oxidativo dos pacientes com traço falciforme, e dessa forma, contribuiremos para o esclarecimento da fisiopatologia da doença, além disso, forneceremos subsídios para novos estudos sobre estresse oxidativo nas hemoglobinopatias.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de corte transversal, prospectivo, que avaliou amostras de sangue de portadores de traço falciforme, pais de crianças com anemia falciforme atendidas em um Hospital Infantil em Fortaleza, Ceará, no período de outubro a dezembro de 2008.

Para a pesquisa, foram coletadas 70 amostras de sangue periférico, sendo 50 amostras dos pais de pacientes com diagnóstico de anemia falciforme (Grupo Hb AS) e 20 de doadores de sangue (Grupo Hb AA). De cada voluntário, foram colhidos dois tubos de sangue periférico sendo um com heparina e outro com EDTA, utilizando-se sistema de coleta a vácuo. As amostras com EDTA foram submetidas ao Teste de Solubilidade para presença da hemoglobina S e à Eletroforese em pH alcalino, para confirmação do perfil da hemoglobina. Das amostras com heparina, obteve-se o plasma que foi mantido a -20 °C para a realização dos parâmetros oxidativos.

A coleta de dados foi realizada durante uma entrevista direta por meio do preenchimento de um questionário com perguntas claras e objetivas, no intuito de registrar as seguintes informações: idade, cor da pele auto-referida, estado civil, escolaridade, renda familiar, problemas de saúde e hipóteses diagnósticas.

Os critérios de inclusão foram ser portador do traço falciforme e aceitarem a participar da pesquisa após assinarem o termo de livre consentimento e esclarecido. Já os critérios de exclusão foram ser portadores de outras hemoglobinopatias que não a Hb S e os que não concordaram em participar da pesquisa. Foi elaborado um grupo controle constituído por doadores de sangue provenientes de um Hemocentro.

As amostras coletadas em EDTA foram submetidas inicialmente ao teste seletivo para a pesquisa da Hb S, o teste de solubilidade,<sup>17</sup> seguido da análise eletroforética para a confirmação do perfil através da eletroforese Qualitativa em Acetato de Celulose pH 8,0 - 9,0.<sup>14</sup>

O método empregado para determinar a peroxidação lipídica foi baseado na produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo o protocolo a seguir. O plasma foi diluído a 10% em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. 250  $\mu$ L do plasma a 10% de cada grupo foi retirado, ao qual foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% e em seguida a mistura foi agitada em vortex. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente por 15 min, e a seguir resfriada em água corrente. Após o resfriamento foi adicionada 2 mL de  $\eta$ -butanol, agitada em vortex por 1 min. Após agitação a mistura foi centrifugada a 1200 rpm por 5 min. A fase butanólica de coloração rosa foi tomada para leitura em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malonaldeído/g de hemoglobina (nmol de malonaldeído/g de Hb).

A concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foi determinada segundo o método de GREEN. Foi pesado 7 mg de  $\text{NaNO}_2$  e dissolvido em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM) foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 1,25 $\mu$ M, 0,625 $\mu$ M, 0,312 $\mu$ M. Foi feita, em seguida, uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste. Em um tubo branco foi adicionado 500  $\mu$ L do reagente mais 500  $\mu$ L de água destilada, em outro tubo teste foi adicionado 500  $\mu$ L do reagente mais 500  $\mu$ L do plasma a 10% em água destilada de cada grupo estudado. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560 nm e os resultados expressos em  $\mu$ g de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

Para a participação na pesquisa os pacientes assinaram o Termo de Livre Consentimento e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Infantil Albert Sabin.

Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com teste de Student-Newman-Keuls (post hoc) pelo programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad software. O mesmo programa (GraphPad Prism<sup>®</sup>) foi utilizado para confecção do gráfico apresentado neste trabalho. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

O perfil dos portadores do traço falciforme foi caracterizado por uma população predominantemente do sexo feminino, com idade variando de 21 a 63 anos com a maioria na faixa de 35 a 42 anos de idade de etnia parda e procedente do interior do Ceará. A maioria dos pacientes apresentou ensino fundamental completo, tinha uma situação conjugal estável e renda mensal familiar de 0 a 2 salários mínimos. Também foi verificado que os pacientes não fumam e não

relatam fazer ingestão de bebidas alcoólicas. Não há presença de doenças subclínicas, não fazem uso de medicamentos e/ou complementos alimentares, com desconhecimento de outros casos na família de anemia falciforme e não realizaram transfusões sanguíneas. 34% dos portadores do traço falciforme auto-referem infecção urinária. A maioria não relatou exposição a produtos químicos.

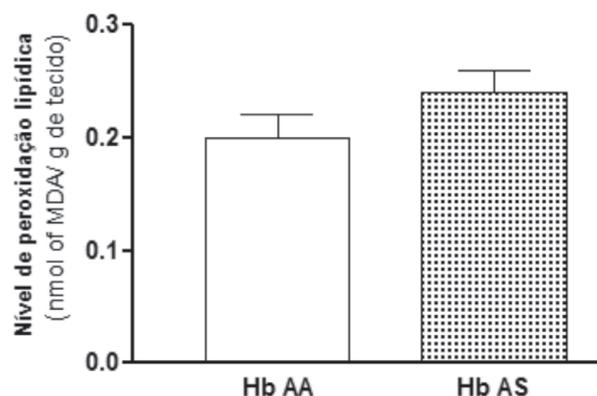
Os níveis plasmáticos de MDA e conteúdo de nitrito nos pacientes com Hb AA e Hb AS foram apresentados na Tabela 1. O grupo Hb AS ( $0,24 \pm 0,02$ ) apresentou valor médio dos níveis séricos de MDA semelhante ao grupo Hb AA ( $0,20 \pm 0,02$ ;  $p=0,3138$ ) (Figura 1). Em relação aos níveis séricos de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), verifica-se um significativo aumento de 92% no grupo Hb AS ( $4,6 \pm 0,33$ ) quando comparado ao grupo Hb AA ( $2,4 \pm 0,22$ ;  $p < 0,0009$ ) (Tabela 1 e Figura 2).

**Tabela 1** - Níveis plasmáticos de malonaldeído (MDA) e o conteúdo de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em pacientes portadores do traço falciforme (Hb AS) e pacientes sem hemoglobinopatias (Hb AA).

Grupos	Peroxidação lipídica (nmol de MDA /g de Hb)	Nitrito ( $\mu$ g de $\text{NO}_2^-$ )
Hb AA	$0,20 \pm 0,02$	$2,4 \pm 0,22$
Hb AS	$0,24 \pm 0,02^*$	$4,6 \pm 0,33^{**}$

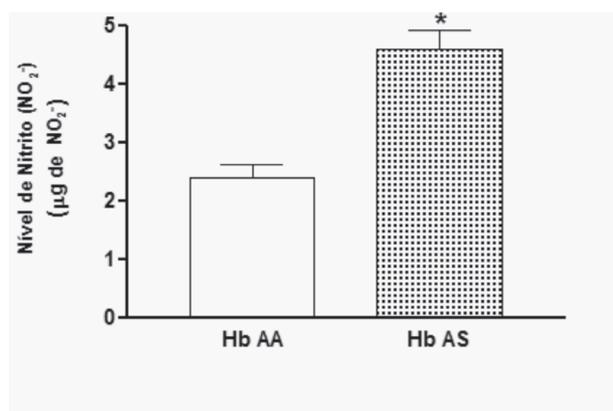
Abreviações: Hb AA – grupo de pacientes sem hemoglobinopatias; Hb AS – grupo de pacientes com traço falciforme; MDA – malonaldeído; Hb – hemoglobina;  $\text{NO}_2^-$  – nitrito; \* $p < 0,3138$  (ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls com post hoc teste); \*\* $p < 0,0009$  (ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls com post hoc teste).

**Figura 1** - Níveis séricos de malonaldeído (MDA) dos pacientes portadores do traço falciforme (Hb AS) e pacientes sem hemoglobinopatias (Hb AA).



O grupo Hb AS ( $0,24 \pm 0,02$ ) apresentou valor médio dos níveis séricos de MDA semelhante ao grupo Hb AA ( $0,20 \pm 0,02$ ;  $p=0,3138$ ). Abreviações: Hb AA – grupo de pacientes sem hemoglobinopatias; Hb AS – grupo de pacientes com traço falciforme; MDA – malonaldeído.

**Figura 2**–Níveis séricos de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) dos pacientes portadores do traço falciforme (Hb AS) e pacientes sem hemoglobinopatias (Hb AA).



Nos níveis séricos de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, verificou-se um significativo aumento de 92% no grupo Hb AS (4,6 ± 0,33) quando comparado ao grupo Hb AA (2,4 ± 0,22). Abreviações: Hb AA – grupo de pacientes sem hemoglobinopatias; Hb AS – grupo de pacientes com traço falciforme; NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – nitrito; \*p<0,0009 (ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls com post hoc teste).

## DISCUSSÃO

Entre as pessoas com traço falciforme estudadas, 82% auto-refere ser pardo, 14% branco e 4% negro.<sup>18</sup>Podemos verificar que o processo de miscigenação da população brasileira, modificou o padrão de expressão racial da hemoglobina S, uma vez que, essa pode ser encontrada nos diferentes grupos étnicos.<sup>18</sup>

Os eritrócitos são particularmente susceptíveis a peroxidação lipídica devido à presença do ferro e do oxigênio nas hemácias, tornando a hemoglobina um potencial catalisador para a formação de EROs e para iniciação da reação de peroxidação lipídica. No presente estudo foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa para a dosagem MDA entre os grupos de traço falciforme e controle. Estudos demonstraram níveis significativamente elevados de MDA em pacientes com anemia falciforme em relação a portadores do traço falciforme e de indivíduos com hemoglobina normal.<sup>15</sup> Nossos resultados podem corroborar com esses estudos, uma vez que não há registros na literatura quanto aos níveis de MDA em portadores do traço falciforme.

A estimativa dos níveis de NO, nesse estudo foi realizada através da dosagem sérica de nitrito, um produto de degradação do NO que apresenta boa sensibilidade e estabilidade. A avaliação dos níveis séricos de nitrito nos dois grupos estudados demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, provavelmente devido ao fato de tratar-se de pacientes portadores do traço falciforme. Esse achado concorda com alguns trabalhos que demonstraram a presença de uma diminuição transitória de NO durante as crises vaso-

oclusivas em pacientes com anemia falciforme.<sup>19</sup>Morris e colaboradores demonstraram um aumento dos níveis de nitrito em pacientes com anemia falciforme assintomático.<sup>20</sup> Nossos achados em pacientes com traço falciforme sugerem um aumento dos níveis de nitrito em comparação aos pacientes com hemoglobina normal, uma vez que durante a peroxidação lipídica da membrana eritrocitária ocorre um aumento nos níveis séricos do ferro que facilitam a biotransformação do óxido nítrico em nitrito.<sup>11,12</sup>

Em suma, este estudo em abordagem quantitativa foi resultado da participação direta no atendimento aos portadores do traço falciforme. Considerando tratar-se de uma instituição de referência para o acompanhamento desses pacientes, houve o interesse em traçar o perfil da clientela assistida, acreditando-se que poderíamos, então, reconhecer suas características e identificar fatores de risco que podem ser evitados ou tratados. O perfil desses portadores do traço falciforme atendidos é de mulheres jovens, com baixa escolaridade, em situação conjugal estável, que não exercem atividade remunerada e que não praticam automedicação. A maioria não faz uso de bebidas alcoólicas, não fuma e nem relata fazer uso de complementos alimentares, bem como não apresentava outras patologias associadas.

## CONCLUSÃO

Considerando os parâmetros oxidativos, os pacientes com traço falciforme apresentaram níveis mais elevados de nitrito plasmático, embora o conteúdo de MDA tenha sido semelhante aos dos pacientes com hemoglobinas normais. Desta forma, a partir dos nossos resultados a população em estudo foi caracterizada e a partir desses achados iremos ampliar nossas ações para realização de um trabalho de educação dos pacientes e dos profissionais de saúde sobre os riscos e as conseqüências dos problemas relacionados ao estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

- BERGAMINI, C.M. et.al. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des*. Schiphol, v.10, n. 14, p.11-12, 2004.
- KLINGS, E.S.; FARBER, H.W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Resp. Res.* v.2, n.5, p.280-285, 2001.
- TAYLOR, M.Y. et.al. Pregnancy loss after first-trimester viability in women with sickle cell trait: Time for a reappraisal? *Am J Obst Gynecol*. St. Louis, v.194, n.6, p.1604-1608, 2006.
- FASOLA, F. et.al. Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. *J. Natl. Méd. Assoc.*, New York, v.99, n.8, p.891-894, 2007.
- BENCAIOVA, G.; KRAFFT, A.; BREYMAN, C.H. Sickle cell trait and urinary tract infection in pregnancy. *Int J Gyn Obst*. New York, v.92, n.2, p.128-129, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: \_\_\_\_\_ *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989.

7. DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 8. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
8. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: Oxford, 2007.
9. MOUSINHO-RIBEIRO, R.C.et al. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**. São Paulo,v.30, n.2, p.136-141, 2008.
10. REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M.U. (Eds.). **Free Radicals: from basic science to Medicine**. Basel: Birkhauser Verlag, 1993.
11. GLADWIN, M.T.; CRAWFORD, J.H.; PATEL, R.P. Serial review: biomedical implications for hemoglobin interactions with nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med**.New York, v.37, n.4, p. 442-453, 2004.
12. CHEN, K. et.al. Nitric oxide from nitrite reduction by hemoglobin in the plasma and erythrocytes. **Nitric Oxide**. Orlando,v.18, n.1, p.47-60, 2008.
13. NAHAVANDI, M.et.al. Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. **Eur J Clin Invest**. Berlin, v.34, n.2, p.143-148, 2004.
14. OSHIRO, M. Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para detecção populacional de hemoglobina S. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v.58, n.2, p.53-56, 1999.
15. MANFREDINI ,V. Blood Antioxidant Parameters Sickle Cell Anemia Patients Steady State. **J Nat Med Assoc**. New York, v.100, n.8, p.897-902, 2008.
16. ZAGO, M.A.; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos. **Rev Bras Hematol Hemoter**. São Paulo,v.29, n.3, p.207-214, 2007.
17. PRUDÊNCIO, B.C.A.B.; COVAS, D.T.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. **Rev Bras Hematol Hemoter**. São Paulo, v.22, n.2, p.99-109, 2000.
18. BITARÃES, E.L.; OLIVEIRA, M.; VIANA, M.B. Adesão à antibioticoterapia profilática em crianças com anemia falciforme: um estudo prospectivo. **J Pediatr**.(Rio J.), v.84, n.4, p.316-322, 2008.
19. GLADWIN, M.T. et.al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol.**, Oxford, v.116, n.2, p.436-444, 2002.
20. Morris, C.R. Hydroxyurea and arginine therapy: impact n nitric oxide production in sickle cell disease. **J Pediatr Hamatol Oncol.**, New York, v.25, n.8, p.629-634, 2003.

---

Submetido em 06.12.2012;

Aceito em 04.04.2013.