

Jean Leandro dos Santos\* e Chung Man Chin

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rod. Araraquara/Jaú km 1, s/n, 14801-902 Araraquara – SP, Brasil

Recebido em 23/4/11; aceito em 26/10/11; publicado na web em 4/1/12

**SICKLE CELL DISEASE: CHALLENGES AND ADVANCES IN DRUG DISCOVERY.** Sickle Cell Disease (SCD) is a disease characterized by a punctual mutation (GTG - GAG) in the sixth codon of the gamma globin gene leading to a substitution of glutamic acid by a valine in the  $\beta$  chain of hemoglobin. Despite the huge progress on the molecular knowledge of the disease in recent years, few therapeutic resources were developed. Currently, the treatment is mainly done with the anticancer agent hydroxyurea. This review summarizes current knowledge about possible targets and new approaches to the discovery new compounds to treat the symptoms of SCD.

Keywords: Sickle Cell Disease; drug discovery; molecular modification.

## INTRODUÇÃO

As hemácias, também denominadas eritrócitos ou glóbulos vermelhos, são células com formato de disco bicôncavo, anucleadas presentes no sangue. Produzidas na medula óssea, vivem aproximadamente 120 dias e são constituídas por moléculas de hemoglobina (Hb), cuja principal função é transportar oxigênio e gás carbônico aos tecidos.<sup>1</sup> A molécula de Hb é um tetrâmero constituído por duas subunidades de cadeias globínicas, cada qual ligada a um grupo heme (Figura 1). Este é constituído pela protoporfirina IX (anel porfirínico) ligada a um átomo de ferro central ( $\text{Fe}^{+2}$ ), responsável pela ligação com oxigênio.<sup>2,3</sup>

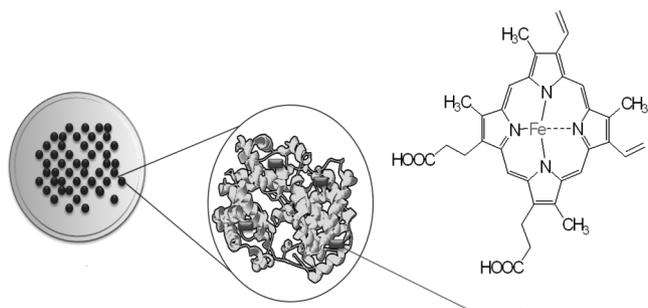


Figura 1. Representação esquemática da hemácia, hemoglobina e grupo heme

As hemoglobinas são diferenciadas de acordo com a constituição das cadeias globínicas. Os tipos mais comuns são: hemoglobina A (HbA) constituída por duas cadeias alfa ( $\alpha$ ) e duas cadeias beta ( $\beta$ ) ( $\alpha_2\beta_2$ ), é a Hb predominante e representa cerca de 96% das moléculas totais de Hb em indivíduos saudáveis; hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) constituída de duas cadeias alfa ( $\alpha$ ) e duas cadeias delta ( $\delta$ ) ( $\alpha_2\delta_2$ ). Essas cadeias delta são sintetizadas a partir do primeiro trimestre após o nascimento e representam cerca de 2,5-3% das hemoglobinas em indivíduos saudáveis; hemoglobina fetal (HbF), presente na vida fetal, é constituída por duas cadeias alfa ( $\alpha$ ) e duas cadeias gama ( $\gamma$ ) ( $\alpha_2\gamma_2$ ) e apresenta níveis diminuídos na vida adulta.<sup>4</sup>

Na anemia falciforme (AF) há presença de hemoglobina S (HbS) que, como a HbA, é constituída por duas cadeias alfa e duas beta

( $\alpha_2\beta_2$ ). Entretanto, devido a uma mutação pontual (GTG  $\rightarrow$  GAG) no sexto códon do gene da  $\beta$  globina ocorre substituição de um ácido glutâmico por uma valina. Essa modificação faz com que em estados de baixos níveis de oxigênio haja exposição do resíduo hidrófobo  $\beta\text{Val6}$  que interage com  $\beta\text{Phe85}$  e  $\beta\text{Leu88}$  do grupo heme de outra molécula de HbS. Essa interação promove a polimerização das moléculas de HbS, provocando alterações morfológicas na estrutura dos eritrócitos, que culminam na deformação das células, que passam a adquirir forma de foice. Em determinadas situações, os polímeros formados podem lesar a estrutura da membrana do eritrócito levando a um fenômeno conhecido como hemólise. A diminuição do número de eritrócitos pela hemólise causa o quadro de anemia, presente nos pacientes falcêmicos.<sup>5</sup>

Durante a hemólise há extravasamento do conteúdo citoplasmático do eritrócito e liberação de Hb e arginase. Esta enzima é a responsável pela conversão da arginina em ornitina e ureia, diminuindo a concentração plasmática de arginina, que atua como substrato da enzima óxido nítrico sintase endotelial para produção de óxido nítrico (NO).<sup>6</sup> A Hb liberada contendo grupo heme também pode sequestrar o NO endotelial, diminuindo os níveis fisiológicos deste. A deficiência de NO induzida pela hemólise tem sido associada a diversas manifestações clínicas da doença como, por exemplo, hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de pernas e infarto.<sup>7</sup> Além disso, a diminuição dos níveis de NO contribui para o caráter vasoconstritor do paciente falciforme e instalação do processo vaso-oclusivo.<sup>8</sup>

A vaso-oclusão é a característica mais marcante da doença, responsável por grande parte das complicações agudas e crônicas. É caracterizada por um aumento da adesão de células sanguíneas ao endotélio vascular, o que bloqueia a circulação nos microcapilares, levando alguns tecidos ao infarto (Figura 2). Na AF os eritrócitos contendo HbS apresentam adesão 2 a 10 vezes maior ao endotélio vascular que os eritrócitos de indivíduos saudáveis.<sup>9</sup> A adesão de leucócitos ao endotélio com formação de agregados heterocelulares (leucócitos e células falcêmicas) também contribui para essa obstrução, resultando em hipóxia local, aumento da formação de polímeros de HbS e propagação da oclusão da vasculatura adjacente.<sup>10,11</sup> Tem sido relatado que o aumento do número de leucócitos em indivíduos falciformes aumentaria a probabilidade de mortes, principalmente associadas ao infarto.<sup>12</sup>

O paciente falciforme comumente apresenta um quadro inflamatório crônico inicialmente disparado pela injúria constante causada

\*e-mail: santosjl@fcar.unesp.br

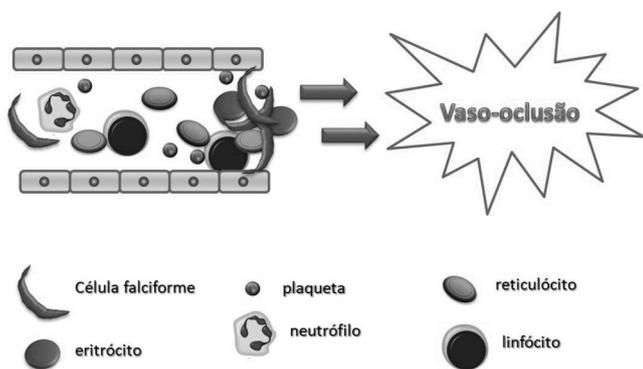


Figura 2. Representação esquemática do processo de vaso-oclusão

pelas células falciformes e agregados celulares à parede do endotélio vascular. Neste processo inflamatório crônico a participação das citocinas pró-inflamatórias tem um papel importante na propagação e manutenção do quadro contribuindo, por exemplo, com o aumento na expressão de moléculas de adesão que, em última instância, agrava o processo vaso-oclusivo.<sup>13</sup> Entre as citocinas pró-inflamatórias destacam-se as interleucinas (IL) (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).<sup>14</sup>

Todos esses fatores associados contribuem com os principais eventos agudos que ocorrem na AF como síndrome torácica aguda, infarto esplênico, hipertensão pulmonar, retinopatia, priapismo, síndrome respiratória aguda, sequestro esplênico e dor, diminuindo a qualidade e a expectativa de vida dos portadores da doença.

A doença apresenta alta incidência nos países africanos e diversos estudos têm associado o surgimento desta como forma de resistência à infecção por malária, já que é sabido que há diminuição da invasão e desenvolvimento do plasmódio na célula falciforme. Atualmente, a AF é a doença hematológica hereditária mais comum, altamente disseminada por conta da miscigenação racial, ocorrendo principalmente entre afro-descendentes. Nos Estados Unidos acomete 1 em cada 350 recém-nascidos afro-americanos por ano e cerca de 72.000 no total.<sup>15</sup> Já no Brasil, a incidência de AF entre os diferentes estados brasileiros é diferente, por exemplo, é estimado na Bahia 1 caso a cada 650 recém-nascidos, enquanto no Rio Grande do Sul esta incidência é de 1 caso a cada 10.000 recém-nascidos. Dados do Ministério da Saúde permitem estimar que o número de casos de portadores da doença alcance cerca de 25.000-30.000 indivíduos, e que o número de novos casos por ano seja cerca de 3.500, entretanto, devido à falta de dados mais robustos estes números podem ser subestimados.<sup>16,17</sup>

A AF pode ser considerada uma doença negligenciada e sua face mais cruel é a falta de recursos terapêuticos para o tratamento.<sup>18</sup> Atualmente, o único fármaco aprovado pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da doença é o antineoplásico hidroxiureia (HU). A despeito dos efeitos benéficos, o uso deste fármaco tem sido associado a alguns efeitos deletérios que dificultam seu uso seguro.<sup>19</sup> Também é sabido que grande número de pacientes não são responsivos ao tratamento com HU ou, ainda, que a eficácia do fármaco diminuiu ou até mesmo se extinguiu após tratamento crônico.<sup>20</sup> Nesse contexto, é urgente a busca de novas moléculas que constituam uma alternativa ao tratamento dos sintomas da AF.

Esta revisão resume os conhecimentos atuais sobre possíveis alvos e as abordagens para a descoberta de novas moléculas para tratar os sintomas de AF. À luz do planejamento de fármacos baseados nas estratégias de modificação molecular serão apresentadas substâncias que induzem a produção de Hb fetal; modificam a estrutura da HbS; previnem a desidratação dos eritrócitos; diminuem a sobrecarga de ferro por quelação; aumentam a biodisponibilidade de NO e, modificam as propriedades reológicas do sangue. Serão apresentados alguns

medicamentos fitoterápicos disponíveis e estratégias envolvendo transplante de células-tronco e terapias gênicas.

## MOLÉCULAS INDUTORAS DE HEMOGLOBINA FETAL

Desde a década de 50, uma série de estudos foi relatada demonstrando que adultos e crianças portadores de AF com altos níveis de HbF apresentavam sintomas menos severos da doença.<sup>21,22</sup> Níveis de HbF superiores a 20% foram associados com redução de sintomas clínicos.<sup>23</sup> Esse efeito benéfico ocorre porque diferentemente de HbS, a HbF não sofre polimerização. Assim, o aumento da concentração de HbF previne a primeira etapa do processo fisiopatológico da doença e constitui uma abordagem terapêutica importante para prevenir as complicações da doença. Entre os agentes indutores de HbF podem ser citados, como exemplos, análogos de nucleosídeo com propriedades inibidoras da DNA metiltransferase (5-azacitidina e decitabina), derivados de ácido butírico, inibidores de histona deacetilase e agentes citotóxicos (HU).

Após o nascimento, a metilação do gene de  $\gamma$  globina pela enzima DNA metil-transferase promove o silenciamento deste, diminuindo a produção de HbF. Fármacos como 5-azacitidina (1) e decitabina (2) que atuam inibindo esta enzima constituem uma importante estratégia a fim de aumentar a produção de HbF (Figura 3).<sup>24</sup>

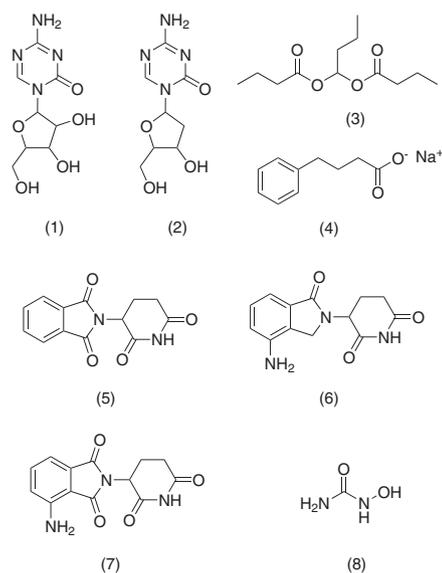


Figura 3. Estruturas químicas de algumas moléculas indutoras da síntese de hemoglobina fetal

A 5-azacitidina (1) foi uma das primeiras substâncias a demonstrar capacidade de promover aumento na síntese de HbF, em macacos. Este mesmo efeito foi posteriormente confirmado em humanos voluntários que, após tratamento por 5 dias com uma dose de 2 mg/kg/dia, apresentaram aumento de HbF de 22%.<sup>25,26</sup> Entretanto, a despeito dos efeitos benéficos seu uso foi descontinuado devido a efeitos deletérios graves como leucopenia, trombopenia, citopenia e potencial mutagênico induzido pelo fármaco.<sup>27</sup>

A 5-Aza-2'-deoxicitidina (decitabina) (2) é um análogo de pirimidina inibidor da enzima metil-transferase, que apresentou capacidade de induzir de maneira similar a 5-azacitidina à produção de HbF *in vitro* e *in vivo*.<sup>28</sup> Estudos demonstraram que a decitabina (2) apresenta menor toxicidade e menor risco na indução de tumores que a 5-azacitidina (1).<sup>29</sup> A decitabina (2) pode ser usada como alternativa ou em conjunto com HU em pacientes não responsivos (Figura 3).

Ácidos graxos de cadeia curta, como ácido butírico e derivados, mostraram-se úteis no tratamento de AF por possuírem a capacidade

de induzir *in vitro* e *in vivo* a produção de HbF.<sup>30</sup> Estas moléculas inibem a histona deacetilase e promovem aumento na acetilação gênica, afetando a estrutura da cromatina e a taxa de transcrição gênica de  $\gamma$  globina, aumentando a produção de HbF. Entretanto, exposições prolongadas ao butirato diminuem a produção de HbF, devido a efeitos antiproliferativos cumulativos.<sup>31</sup>

Ácido butírico e derivados apresentam problemas farmacocinéticos, como baixa absorção e meia-vida. Este inconveniente pode ser solucionado utilizando-se estratégias de modificação molecular como, por exemplo, a latênciação. A conversão da função ácido carboxílico presente no ácido butírico em ésteres tem permitido a obtenção de moléculas com maior coeficiente de partição e absorção oral. Nudelman e colaboradores sintetizaram pró-fármaco butilideno butirato (3) que, após biotransformação *in vivo*, é convertido em duas moléculas de ácido butírico e uma molécula de butiraldeído<sup>32</sup> (Figura 3).

Derivados como o fenilbutirato de sódio (4), administrados por via oral, também induzem a produção de HbF; entretanto, em uso prologando, tem sido relatada ausência de eficácia dessas substâncias devido ao desenvolvimento de tolerância.<sup>33</sup>

A talidomida (5), usada na década de 60 como fármaco hipnótico e sedativo, foi retirada do mercado por causar efeitos teratogênicos. Na década de 90, o fármaco ressurgiu devido às suas propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias decorrentes da inibição do TNF- $\alpha$ .<sup>34,35</sup> No sistema hematológico, o fármaco estimula a eritropoiese em pacientes com mieloma múltiplo e pode induzir a expressão gênica de  $\gamma$  globina de maneira dose-dependente.<sup>36,37</sup> Esse último efeito está relacionado à capacidade da talidomida de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que regulam a expressão de diversos genes, afetando em uma última etapa as vias de sinalização, por modificar fatores de transcrição ou proteínas quinases. Especificamente, tem sido proposto que a talidomida atua na via de sinalização p38 MAPK e acetilação histona H4.<sup>38</sup>

A lenalidomida (6) e a pomalidomida (7) são imunomoduladores derivados da talidomida que também apresentam capacidade em induzir *in vitro* e *in vivo* a síntese de HbF (Figura 3). A pomalidomida (7) é mais potente que a lenalidomida (6) e se obtém efeito sinérgico quando estes fármacos são combinados com hidroxiureia. Tem sido proposto que a pomalidomida (7) regula a síntese de HbF por modificar a estrutura da cromatina, resultado da acetilação da histona H3.<sup>39</sup> Esses efeitos combinados com as propriedades anti-inflamatórias decorrentes da inibição de TNF- $\alpha$  podem prevenir algumas complicações clínicas associadas com a AF.

Ainda que haja muitas substâncias com propriedades em induzir a produção de HbF, até o momento, nenhum apresentou uma combinação que garanta segurança, eficácia e conveniência no uso. Assim, é importante a busca de novas moléculas que atuem por esse mecanismo sem apresentar toxicidade. Atualmente, o único fármaco disponível para o tratamento da AF é a HU (8) (Figura 3).

A HU (8) é um hidroxycarbamato inibidor seletivo da síntese de ribonucleotídeo difosfato redutase, enzima necessária na conversão de ribonucleotídeos difosfatados em deoxiribonucleotídeos difosfatados. Assim, HU impede que as células saiam da fase G1/S do ciclo celular. É usada principalmente em neoplasias do sistema hematopoiético como, por exemplo, na leucemia mieloide crônica.<sup>40,41</sup>

Os estudos clínicos para avaliar a eficácia de HU (8) na AF iniciaram na década de 90 e demonstraram a eficácia do fármaco em aumentar os níveis de HbF e reduzir o número de internações. Steinberg e colaboradores avaliaram durante 9 anos pacientes sob tratamento com HU (8) e apontaram uma redução significativa de 40% no número de mortes.<sup>42</sup>

Acredita-se que os efeitos benéficos da HU (8) decorreriam em parte de sua capacidade, após metabolização, de ser biotransformada em NO, sendo este último o principal responsável pelos efeitos

benéficos de HU. O aumento dos níveis de NO pelo tratamento com HU (8) contribui de forma significativa auxiliando nos casos de vaso-oclusão, pois há diminuição da expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular e inibição da agregação plaquetária, mantendo o equilíbrio homeostático vascular.<sup>43</sup> Além disso, o NO estimula a produção de HbF através da via de guanilato ciclase solúvel (GCs) induzindo a expressão de RNAm  $\gamma$  globina e aumentando os níveis de HbF em células eritroleucêmicas K562 e células progênitoras humanas.<sup>44</sup>

Nem todos os pacientes usuários de HU (8) são responsivos ao tratamento. Em muitos casos, o efeito benéfico do tratamento crônico se reduz ou mesmo se extingue após determinados períodos, necessitando doses cada vez mais elevadas, aumentando o risco de toxicidade.<sup>20</sup> Além disso, o tratamento com HU (8) pode causar alguns efeitos deletérios como mielossupressão, lesões ulcerativas dos membros inferiores, hiperpigmentação e, em alguns casos, o uso crônico tem sido associado com o desenvolvimento de câncer.<sup>19,45,46</sup> Diversos estudos relatados na literatura demonstram o potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico de HU (8).<sup>47-51</sup> Entretanto, a redução na mortalidade e morbidade de pacientes tratados com HU (8) é fato inquestionável e justifica a utilização deste fármaco na terapia já que não há, até o presente momento, outra opção terapêutica mais segura e eficaz.

## MOLÉCULAS MODIFICADORAS DA ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA S

Há alguns relatos na literatura demonstrando a potencialidade de algumas moléculas em modificar quimicamente a Hb, reduzindo o processo de polimerização. As moléculas modificadoras de HbS podem ser classificadas, de acordo com o tipo de ligação que realizam, em covalentes e não covalentes.

Os modificadores não covalentes apresentam aplicação limitada e muitos não modificam a afinidade da Hb pelo oxigênio. Entre os modificadores não covalentes pode-se citar: ureia, butilureia, l-fenilalanina, citrato de cetidil, guanidina e solventes como dimetilformamida, etanol, 1,4-dioxano, acetona e dimetilsulfóxido.<sup>52</sup>

Os modificadores covalentes constituem um grupo de moléculas não estruturalmente relacionadas e que diferem entre si pelo tipo da ligação e o local exato de interação com Hb. Têm sido propostos dois mecanismos pelos quais estes agentes diminuem a modificação do eritrócito à forma de foice: aumento da afinidade pelo oxigênio e/ou aumento da solubilidade de HbS.<sup>53</sup> Para o planejamento de novas moléculas desta classe os dois principais fatores a ser considerados são seletividade de ação e reatividade química das substâncias. Entre os modificadores covalentes se podem citar: clofibrato (9), benzafibrato (10) e análogos (11-13), isotiocianatos (14) e algumas substâncias contendo a função aldeído (15-17) (Figuras 4 e 5).

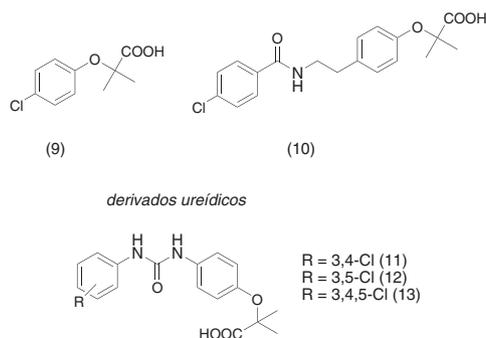
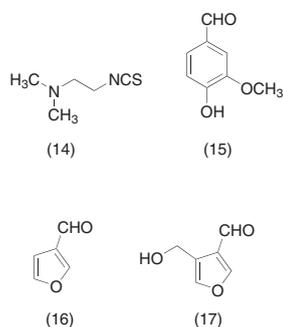


Figura 4. Estruturas químicas da clofibrato (9), benzafibrato (10) e derivados ureídicos (11-13)



**Figura 5.** Estruturas químicas do derivado de isotiocianato (14) e dos derivados aldeídicos (15-17)

Os antilipêmicos clofibrato (9) e benzaflibrato (10) demonstraram capacidade de modificar o equilíbrio alostérico de Hb para estado de maior afinidade ao oxigênio ligando-se a sítios específicos na cavidade central de Hb.<sup>54</sup> Sabe-se que a substituição do cloro na posição 4 (benzaflibrato) por hidrogênio aumenta a atividade devido a uma diminuição na repulsão estérica entre 4-cloro presente no benzaflibrato (10) e o sistema aromático da fenila na posição 36 da cadeia  $\alpha$  da Hb.<sup>55</sup> Moléculas ureídicas (11-13) obtidas por processo de simplificação molecular foram sintetizadas a partir do protótipo benzaflibrato (10) (Figura 4). A avaliação farmacológica dessas moléculas permitiu revelar que a presença do substituinte cloro aumenta a potência de acordo com a substituição em ordem crescente: *meta* > *para* > *orto*. Na série dissustituída, o 3,5-dicloro foi considerado o mais potente e na série trissustituída, o derivado 3,4,5-tricloro. Embora as moléculas tenham apresentado atividade superior ao benzaflibrato (10) seu uso é limitado devido à inatividade na presença de albumina.<sup>56</sup>

Após atravessarem a membrana dos eritrócitos, os derivados isotiocianatos podem alterar a solubilidade da HbS, aumentar a afinidade de HbS pelo oxigênio e inibir a polimerização de HbS no estado desoxi. Do ponto de vista mecanístico, propõe-se que a presença de grupos catiônicos oriundos do derivado isotiocianato (14) próximo ao resíduo Cys $\beta$ 93 e o deslocamento da cadeia imidazólica His $\beta$ 146 propiciam mudanças eletrostáticas, dificultando a interação entre as cadeias  $\beta$  de HbS, evitando a polimerização (Figura 5). Além disso, é relatado que isotiocianatos acoplados a grupos alifáticos reagem com Cys $\beta$ 93 na cadeia  $\beta$ , enquanto isotiocianatos acoplados com grupos aromáticos reagem com a cadeia  $\alpha$  quando, em ambas as condições, estas substâncias reagem em condições estequiométricas com HbS.<sup>57</sup>

Algumas moléculas contendo a função aldeído apresentam aplicação no tratamento da AF, devido à capacidade dessa função orgânica reagir com Hb formando adutos (base Schiff). A vanilina (15), usada como flavorizante na indústria alimentícia, diminui a polimerização de HbS por se ligar a dois diferentes sítios (sítios 1 – próximos a resíduos de  $\alpha$ His103,  $\alpha$ Cys104 e  $\beta$ Gln131; e sítios 2 – próximos a resíduos de  $\beta$ His116 e  $\beta$ His117). Entretanto, devido à labilidade metabólica, o fármaco não pode ser administrado por via oral. Estratégias de modificação molecular usando a latência têm sido realizadas a fim de alterar as propriedades farmacocinéticas da vanilina para melhorar a absorção oral.<sup>58</sup>

Aldeídos heterocíclicos como furfural (16), 5-metil-furfural, 5-etil-furfural e 5-hidroxi-metil-furfural (17) são moléculas que aumentam a afinidade da Hb pelo oxigênio, inibindo a polimerização (Figura 5). O 5-hidroxi-metil-furfural (17) apresenta baixa toxicidade e é cerca de 3,5 vezes mais potente que a vanilina (15) em inibir a polimerização.<sup>59</sup> Entretanto, devido a características como a baixa disponibilidade oral e necessidade de altas doses, seu uso no tratamento da AF é limitado.

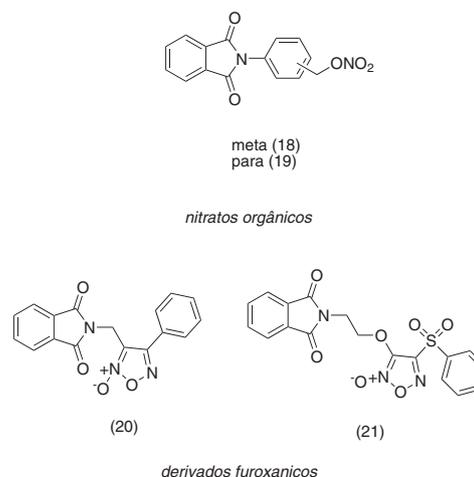
## MOLÉCULAS QUE AUMENTAM A BIODISPONIBILIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO

A hemólise nos indivíduos com AF promove a liberação de arginase e Hb, reduzindo a concentração de NO e promovendo um “caráter vasoconstritor” que culmina na instalação de processos vaso-oclusivos. O NO tem um papel fundamental na manutenção do equilíbrio hemodinâmico e, entre diversas ações, promove vasodilatação, diminui a agregação de plaquetas, reduz a ativação endotelial, diminui a adesão de neutrófilos e o número de receptores de adesão do endotélio vascular.<sup>60,61</sup> Além disso, o NO é um dos mediadores da indução da expressão gênica de  $\gamma$  globina, um dos mecanismos responsáveis pelo efeito benéfico da hidroxiureia.<sup>62,63</sup>

Considerando que mais da metade dos pacientes com AF apresentam disfunção endotelial gerada pela diminuição local da concentração de NO, a terapia que visa aumentar os níveis de NO constitui uma alternativa importante para redução das complicações da doença. Tem sido relatado que a inalação do gás apresenta aplicação para diminuição da síndrome torácica aguda, complicação frequente nos portadores da doença.<sup>64</sup> Entretanto, o uso do gás óxido nítrico apresenta uma série de limitações que incluem preço elevado e dificuldade de manipulação, exigindo uso restrito ao ambiente hospitalar.

Têm sido desenvolvidas alternativas na busca de substâncias que aumentem a biodisponibilidade de NO. O uso de nitrito de sódio nebulizado demonstrou reduzir, em modelo animal, a pressão pulmonar devido à capacidade desta substância atuar como fonte exógena de NO.<sup>65</sup>

Santos e colaboradores relataram a obtenção de moléculas híbridas (18-19) derivadas da talidomida contendo uma subunidade éster de nitrato orgânico como doadora de NO (Figura 6). As substâncias (18-19) demonstraram propriedades analgésicas e anti-inflamatórias reduzindo *in vivo* a expressão e síntese de citocinas pró-inflamatórias e capacidade de doação de NO. Ademais, as substâncias (18-19) foram capazes de induzir *in vitro* a expressão gênica da cadeia de  $\gamma$  globina, constituinte da HbF. Estudos de toxicidade demonstraram ausência de efeito mutagênico e menor genotoxicidade das substâncias (18-19) em relação à HU.<sup>66-68</sup>



**Figura 6.** Estruturas químicas dos doadores de NO: ésteres de nitrato orgânico (18-19) e derivados furoxânicos (20-21)

Baseado no conhecimento de que nitratos orgânicos podem provocar efeitos indesejados, como hipotensão e dor de cabeça, e promover o desenvolvimento de tolerância Santos e colaboradores desenvolveram outra série de derivados híbridos em que a subunidade doadora de NO foi substituída pelo furoxano (20-21) (Figura 6). As novas moléculas obtidas (20-21) demonstraram atividade analgésica

e anti-inflamatória com perfil diferenciado na doação de óxido. Além disso, essas moléculas (20-21) demonstraram capacidade em induzir *in vitro* a expressão gênica de  $\gamma$  globina.<sup>17,68,69</sup>

Outra estratégia para aumentar os níveis de NO seria a suplementação de portadores de AF com arginina. Fisiologicamente, a arginina é metabolizada pela arginase em NO e citrulina. Como os níveis de arginina se encontram diminuídos em portadores da doença, apresentando queda ainda mais acentuada durante as crises vaso-oclusivas, a suplementação poderia funcionar como estratégia terapêutica.<sup>70,71</sup> Animais transgênicos suplementados com arginina apresentaram diminuição na densidade dos eritrócitos.<sup>72</sup> Curiosamente, estudos de fase II com crianças não demonstraram aumento nos níveis de arginina ou mudanças nos níveis de NO.<sup>73</sup>

Outras propostas têm sido descritas na literatura como, por exemplo, o uso de pró-eréteis ou de estatinas. O fármaco sildenafil, usado no tratamento de disfunção erétil e hipertensão pulmonar, é inibidor da enzima fosfodiesterase 5, responsável pela degradação do GMPc. Considerando o papel do GMPc na indução da produção de HbF, essa estratégia parece ser interessante do ponto de vista mecânico.<sup>74,75</sup> Entretanto, é importante considerar que em indivíduos do sexo masculino há possibilidade de se agravar o priapismo. As estatinas alteram o metabolismo do NO, promovendo diminuição na reatividade vascular em pacientes com AF. Os fármacos diminuem a inflamação vascular endotelial e provocam a diminuição de fatores ativadores de plaquetas na superfície endotelial.<sup>76</sup>

## MOLÉCULAS USADAS NA PREVENÇÃO DA DESIDRATAÇÃO DOS ERITRÓCITOS

A polimerização das moléculas de Hb está diretamente relacionada com o processo hidratação/desidratação do eritrócito. Em estados de desidratação, há diminuição do volume e aumento da concentração intracelular de Hb favorecendo o processo de polimerização. A manutenção do equilíbrio osmótico, a diminuição na concentração intracelular de HbS e o bloqueio de transportadores iônicos de membrana são algumas das possibilidades de intervenção para prevenir a desidratação dos eritrócitos. Dentre essas estratégias, o bloqueio de transportadores iônicos tem sido a mais explorada. Dois mecanismos de regulação catiônica do eritrócito foram identificados: via cotransporte K-Cl e os canais de potássio ativados por cálcio (canais de Gardos).<sup>17,69</sup> No primeiro tipo de transporte, a saída de potássio ocasiona movimento concomitante de íons cloreto e água promovendo desequilíbrio osmótico, que culmina em polimerização e hemólise.<sup>77</sup> A atividade do cotransporte K-Cl está aumentada no eritrócito devido ao aumento da expressão da proteína KCC1, responsável pela extrusão do potássio e cloreto. Durante a falcização, há redução do conteúdo intracelular de  $Mg^{+2}$  devido à troca  $Na^+-Mg^{+2}$ . Tem sido proposto que o aumento da concentração de  $Mg^{+2}$ , por suplementação, poderia inibir a atividade do cotransporte K-Cl reduzindo a desidratação em pacientes com AF.<sup>78,79</sup>

Nos canais de potássio ativados por cálcio (canais de Gardos) a entrada de cálcio decorrente da formação de polímeros ativa o transportador, promovendo a desidratação do eritrócito.<sup>80</sup> Os canais de Gardos são ativados por alguns metais divalentes  $Ca^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Sr^{+2}$  e  $Ba^{+2}$ , alguns nucleotídeos e calmodulina e inibidos por diversas substâncias como, por exemplo, cetiedil, nifedipino, fendilina, benpridil, benciclano, anestésicos voláteis (halotano, isoflurano), clotrimazol e senicapoc.<sup>81,82</sup> Destacaremos a atividade de dois inibidores - cetiedil e clotrimazol.

O cetiedil é um fármaco analgésico, antiespasmódico, anestésico local e vasodilatador com importante aplicação na AF, devido à capacidade que o fármaco possui de alterar a permeabilidade da membrana do eritrócito aos íons potássio e cálcio.<sup>83</sup> O fármaco não altera a afinidade pelo oxigênio nem a solubilidade da desoxi-hemoglobina

S. Ensaio com humanos demonstraram eficácia e poucos efeitos adversos.<sup>84,85</sup>

O clotrimazol (22) é potente inibidor dos canais de potássio ativados por cálcio presentes nos eritrócitos falciformes (Figura 7). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que após inibição dos canais de Gardos pelo clotrimazol há aumento do conteúdo de potássio intracelular, impedindo o processo de desidratação. Estruturalmente, tem sido relatado que a subunidade imidazólica, associada com alguns efeitos adversos do clotrimazol (22) como, por exemplo, a inibição das enzimas do complexo do citocromo P450, pode ser suprimida sem que haja perda da atividade de inibição dos canais de Gardos.<sup>86,87</sup>

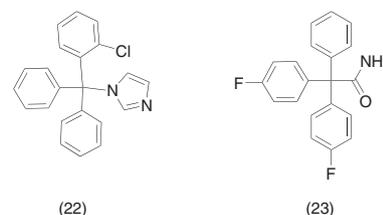


Figura 7. Estruturas químicas do clotrimazol (22) e senicapoc (23)

O senicapoc (ICA-17043) (23) apresenta atividades *in vitro* e *in vivo* superiores ao clotrimazol (22) (Figura 7). A presença dos átomos de flúor na posição *para* diminui as reações metabólicas e aumenta a meia-vida da substância. Estudos usando animais transgênicos, tratados por 21 dias com 10 mg/kg (duas vezes ao dia), demonstraram inibição de 90% dos canais de Gardos e aumento no conteúdo de potássio do eritrócito, diminuindo o processo de desidratação. Apesar da redução da hemólise, o senicapoc (23) não foi capaz de diminuir as crises dolorosas agudas em estudos de fase III, por isso seu estudo foi descontinuado.<sup>88,89</sup>

## MOLÉCULAS USADAS NA SOBRECARGA DE FERRO (AGENTES QUELANTES)

Transfusões sanguíneas são frequentemente recomendadas a pacientes falciformes.<sup>90-92</sup> Após sucessivas transfusões sanguíneas, entretanto, há acúmulo de ferro que se deposita em órgãos como fígado e coração. Este metal catalisa reações oxidativas e favorece a formação de espécies reativas de oxigênio responsáveis pela lesão de diversos órgãos.<sup>93</sup>

A terapia usando agentes quelantes diminui os níveis de ferro extra e intracelulares, o ferro não ligado à transferrina fora das células e a sobrecarga de ferro na forma de ferritina e hemossiderina depositada nos diferentes compartimentos do organismo.<sup>94</sup> Os agentes quelantes podem ser classificados em três grupos principais de acordo com o modo de interação com o átomo de ferro: hexadentados (1:1), tridentados (2:1) e bidentados (3:1).

Abordaremos nessa revisão os exemplos mais utilizados para quelação de ferro de cada um dos grupos principais, com destaque para desferrioxamina (24) (hexadentado), deferiprona (26) (bidentado) e deferasirox (27) (tridentado) (Figura 8).

A desferrioxamina (24), introduzida na terapêutica em 1963, é um agente quelante hexadentado usado para diminuir sobrecarga de ferro. O fármaco apresenta alta afinidade pelo ferro (III) formando um complexo estável na proporção 1:1. Do ponto de vista farmacocinético, a desferrioxamina (24) apresenta algumas desvantagens, como baixa absorção oral exigindo administração intravenosa ou subcutânea.<sup>69</sup> Essa desvantagem gera um impacto negativo na adesão à terapia com este agente quelante, sendo necessária a busca de novas alternativas de agentes quelantes disponíveis por via oral.

Na tentativa de melhorar a biodisponibilidade da desferrioxamina (24) alguns análogos foram preparados com objetivo de aumentar o

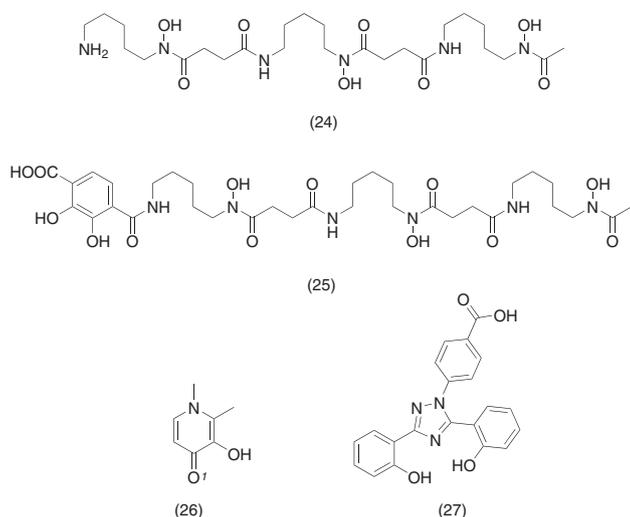


Figura 8. Estruturas químicas de alguns agentes quelantes de ferro (24-27)

coeficiente de partição do fármaco. A presença do grupo amino terminal na desferrioxamina (24) não contribui com a coordenação do átomo de ferro e ainda diminui a lipofilicidade, devido à protonação deste grupo funcional em pH fisiológico. Baseado nisso, Inhat e colaboradores sintetizaram uma série de amidas alifáticas e aromáticas, aumentando em 200-3900 vezes o coeficiente de partição em relação à desferrioxamina (24).<sup>95</sup>

Relatou-se que derivado da desferrioxamina contendo o grupo catecol (25) possui maior coeficiente de partição que desferrioxamina (Figura 8). Esta substância (25) também apresentou capacidade de remover o ferro da transferrina em níveis superiores que o fármaco matriz. Isso é decorrente em parte do sinergismo promovido pela introdução do grupo catecol no mecanismo de quelação promovido pelos derivados.<sup>96</sup>

Ligantes bidentados da classe das  $\alpha$ -ceto-hidroxi-piridinas como, por exemplo, a deferiprona (26) aumentam a excreção de ferro e podem ser administrados por via oral. O nitrogênio-1 (N-1) pode ser substituído por grupos metila, etila, alila e *n*-propila (Figura 8). A molécula mais efetiva em aumentar a excreção de ferro (1-alil-2-metil-3-hidroxi-piridin-4-ona) continha o grupo N-alil na posição 1, que contribuía com propriedades farmacocinéticas mais adequadas ao uso oral diminuindo, por exemplo, a inativação metabólica quando comparado aos demais substituintes em N-1.<sup>97</sup>

O deferasirox (27) é um agente quelante tridentado com alta afinidade pelo ferro, aprovado para uso oral pela agência FDA, em 2005 (Figura 8). As características farmacocinéticas do fármaco permitem administração oral em uma única dose diária. Esta forma de tratamento é mais conveniente ao paciente e permite maior adesão à terapia quando comparada à desferrioxamina. A principal desvantagem é seu alto custo.<sup>98,99</sup>

Os agentes quelantes ideais devem preencher alguns requisitos, como biodisponibilidade adequada por via de administração oral, remoção seletiva do ferro depositado nos órgãos, toxicidade reduzida para órgãos como medula óssea, fígado e rins e capacidade reduzida (ou nula) de acessar o sistema nervoso central e placenta. Além disso, o agente quelante ideal deve ser comercializado a preços acessíveis permitindo aquisição do medicamento pela população.<sup>100</sup>

## MOLÉCULAS QUE ALTERAM AS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DO SANGUE

O polaxamer 188 (P-188) (28) é um surfactante não iônico com importantes propriedades antitrombóticas e antiadesivas úteis para

o tratamento dos sintomas da AF (Figura 9). O uso de P-188 em ensaios clínicos tem demonstrado uma série de efeitos benéficos, como diminuição do tempo de hospitalização e redução do número de crises de dor.<sup>101</sup> O aumento da oxigenação tecidual associado à diminuição das crises de dor tem beneficiado muitos pacientes com síndrome torácica aguda.<sup>102</sup>

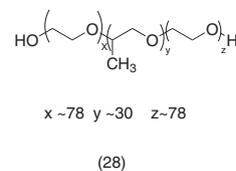


Figura 9. Estrutura química do polaxamer 188 (28)

## FITOMEDICAMENTOS

O Niprisan<sup>®</sup> e Ciklaviv<sup>®</sup> são dois medicamentos fitoterápicos desenvolvidos a partir do conhecimento de alguns povos africanos. O Niprisan<sup>®</sup> é composto por sementes de *Piper guineense*, *Pterocarpus Osun stem*, *Eugenia caryophyllum* e frutos e folhas de *Sorghum bicolor*.<sup>103</sup> O Ciklaviv<sup>®</sup> é obtido através do extrato etanólico da planta *Cajanus cajan*.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o Niprisan<sup>®</sup> foi capaz de prevenir a deformação do eritrócito, mesmo em condições de hipóxia.<sup>104</sup> Esses resultados promissores incentivaram a busca por efeitos semelhantes em humanos portadores de AF. Estudo clínico de fase II revelou que o medicamento é capaz de reduzir as crises dolorosas por um período de 6 meses, sem causar efeitos adversos graves.<sup>105</sup>

O Ciklaviv<sup>®</sup> também preveniu a deformação do eritrócito mesmo em condições de hipóxia. Esta atividade foi relacionada à presença de algumas substâncias como derivados hidroxibenzoicos contidos nos extratos.<sup>106</sup> A diminuição das crises dolorosas foi relatada em um estudo clínico envolvendo 100 pacientes que usaram o Ciklaviv<sup>®</sup>.<sup>107</sup>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A única opção conhecida para a cura da AF ainda é o transplante de medula. O primeiro relato de que essa intervenção poderia curar a doença foi descrito por Johnson e colaboradores, em 1984, quando observaram a cura de uma criança com anemia falciforme submetida a este procedimento.<sup>108</sup> A despeito desse benéfico panorama, o transplante de medula apresenta limitações e envolve uma série de problemas como, por exemplo, reduzido número de doadores compatíveis; variabilidade na severidade da doença; possibilidade de rejeições; quimerismo das células hematopoiéticas e, consenso médico quanto à realização deste procedimento.<sup>109</sup>

A terapia gênica é outra importante perspectiva a ser explorada no futuro. Esta abordagem explora a transferência de genes de regulação das cadeias globínicas em células tronco hematopoiéticas autólogas utilizando vetores virais transplantados em pacientes. Embora promissora, esse tipo de terapia necessita vencer algumas barreiras, como ausência ou reduzida expressão do gene transplantado, excessiva expressão próximo aos locais de integração, seleção adequada de vetores de transferência gênica, entre outros.<sup>110</sup>

A busca de novas perspectivas para o tratamento pode contribuir não apenas com a redução dos sintomas, mas com a cura definitiva da doença no futuro.

## CONCLUSÃO

Pouco avanço na descoberta de novos fármacos para tratamento dos sintomas da anemia falciforme tem ocorrido desde a descoberta

da doença há mais de cem anos. O único recurso terapêutico aprovado pela agência norte-americana FDA é o antineoplásico hidroxiureia. Este fármaco, após biotransformação é convertido em NO, e realiza, entre outras ações, aumento da produção de HbF. Apesar dos efeitos benéficos associados ao uso de hidroxiureia, alguns efeitos deletérios comprometem seu uso seguro. Nesse sentido, a busca de novos fármacos com melhor eficácia e perfil de segurança é fundamental.

Entre as estratégias para desenvolvimento de novos fármacos é possível destacar: indução da HbF, uso de agentes quelantes em casos de sobrecarga de ferro, prevenção da desidratação dos eritrócitos, modificação estrutural da Hb, agentes antiadesivos e vasodilatadores.

A descoberta de novos protótipos associados a estratégias de modificação molecular tem permitido a obtenção de moléculas mais seguras e efetivas para o tratamento dos principais sintomas da doença, a fim de melhorar a qualidade de vida dos portadores de anemia falciforme. Embora algum avanço tenha ocorrido, nenhuma das novas substâncias é capaz de promover a cura da doença.

Estratégias como transplante de medula óssea e utilização da terapia gênica se mostram promissoras, com perspectivas de promover a cura dessa doença genética.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, FAPESP (Ref. proc. 2010/12495-6), PADCFar-UNESP (Proc. 107/10) e FUNDUNESP (Proc. 182/10) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento dos estudos apresentados nesta revisão.

## ABREVIATURAS

Hb – Hemoglobina  
 HbF – Hemoglobina Fetal  
 NO – Óxido Nítrico  
 AF – Anemia Falciforme  
 IL – Interleucina  
 TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa  
 FDA – Food and Drug Administration  
 HU – Hidroxiureia  
 GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclico  
 P 188 – Polaxamer 188

## REFERÊNCIAS

- Kuypers, F. A.; *Curr. Mol. Med.* **2008**, *8*, 633.
- Moreira, L. M.; Moraes, P. C. G.; Mendonça, J. P. R. F.; Guimarães, L.; Lyon, J. P.; Aimbire, F.; Poli, A. L.; Imasato, H.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 119.
- Frenette, P. S.; Atweh, G. F.; *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 850.
- Neto, G. C. G.; Pitombeira, M. S.; *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2003**, *39*, 51.
- Adachi, K.; Kim, J.; Ballas, S.; Surrey, S.; Asakura, T.; *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 5607.
- Silva, D. C.; Cerchiaro, G.; Honorio, K. M.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 300.
- Kato, G. J.; Gladwin, M. T.; Steinberg, M. H.; *Blood Rev.* **2007**, *21*, 37.
- Taylor, J. G.; Nolan, V. G.; Mendelsohn, L.; Kato, G. J.; Gladwin, M. T.; Steinberg, M. H.; *PLoS One* **2008**, *3*, 1.
- El Nemer, W.; Wautier, M.; Rahuel, C.; Gane, P.; Hermand, P.; Galacteros, F.; Wautier, J.; Cartron, J.; Colin, Y.; Kim, C. V.; *Blood* **2007**, *109*, 3544.
- Okpala, I.; Daniel, Y.; Haynes, R.; Odoemene, D.; Goldman, J.; *Eur. J. Haematol.* **2002**, *69*, 135.
- Okpala, I.; *Blood Rev.* **2004**, *18*, 65.
- Platt, O. S.; Brambilla, D. J.; Rosse, W. F.; Milner, P. F.; Castro, O.; Steinberg, M. H.; Klug, P. P.; *New Engl. J. Med.* **1994**, *330*, 1639.
- Pathare, A.; Kindi, S. A. L.; Alnaqdy, A. A.; Daar, S.; Knox-Macaulay, H.; Dennison, D.; *Am. J. Hematol.* **2004**, *77*, 323.
- Lages, A. S.; Romeiro, N. C.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 761.
- Bonds, D. R.; *Blood Rev.* **2005**, *19*, 99.
- Ilozue, C.; Cipolotti, R.; Melo, C. A.; Gurgel, R. Q.; Cuevas, L. E.; *Trop. Med. Int. Health.* **2010**, *15*, 1125.
- Santos, J. L.; Lanaro, C.; Chung, M. C.; *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **2011**, *9*, 113.
- Chung, M. C.; Ferreira, E. I.; Santos, J. L.; Giarolla, J.; Rando, D. G.; Almeida, A. E.; Bosquesi, P. L.; Menegon, R. F.; Blau, L.; *Molecules* **2008**, *13*, 616.
- Nahavandi, M.; Perlin, E.; Kassim, O. O.; Wyche, M. O.; Castro, O.; Tavakkoli, F.; *Blood* **2000**, *96*, 14.
- Aliyu, Z. Y.; Tumblin, A. R.; Kato, G. J.; *Haematologica* **2005**, *90*, 7.
- Perrine, R. P.; Pembrey, M. E.; John, P.; Perrine, S.; Shoup, F.; *Ann. Intern. Med.* **1978**, *88*, 1.
- Watson, J.; Stahman, A. W.; Billelo, F. P.; *Am. J. Med. Sci.* **1948**, *215*, 419.
- Powars, D. R.; Weiss, J. N.; Chan, L. S.; Schroeder, W. A.; *Blood* **1984**, *63*, 921.
- Sauntharajah, Y.; Lavelle, D.; DeSimone, J.; *Br. J. Haematol.* **2004**, *126*, 629.
- Ley, T. J.; DeSimone, J.; Noguchi, C. T.; Turner, P. H.; Schechter, A. N.; Heller, P.; Nienhuis, A. W.; *Blood* **1983**, *62*, 370.
- DeSimone, J.; Heller, P.; Hall, L.; Zwiers, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, *79*, 4428.
- Carr, B. I.; Rahbar, S.; Asmeron, Y.; Riggs, A.; Winberg, C. D.; *Brit. J. Cancer* **1988**, *57*, 395.
- Quesnel, B.; Fenaux, P.; *Leuk. Lymphoma* **1999**, *35*, 437.
- DeSimone, J.; Koshy, M.; Dorn, L.; Lavelle, D.; Bressler, L.; Molokie, R.; Talischy, N.; *Blood* **2002**, *99*, 3905.
- Dover, G. J.; Brusilow, S.; Samid, D.; *New Engl. J. Med.* **1992**, *327*, 569.
- Hines, P.; Dover, G. J.; Resar, L. M.; *Pediat. Blood Canc.* **2008**, *50*, 357.
- Nudelman, A.; Shaklai, M.; Aviram, A.; Rabizadeh, E.; Zimra, Y.; Ruse, M.; Rephaeli, A. J.; *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 687.
- Resar, L. M.; Segal, J. B.; Fitzpatrick, L. K.; Friedmann, A.; Brusilow, S. W.; Dover, G. J.; *J. Pediat. Hematol. Oncol.* **2002**, *24*, 737.
- Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 683.
- Barreiro, E. J.; Ferreira, V. F.; Costa, P. R. R.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 647.
- Raza, A.; Meyer, P.; Dutt, D.; Zorat, F.; Lisak, L.; Nascimben, F.; Du Randt, M.; Kaspar, C.; Goldberg, C.; Lowel, J.; Dar, S.; Gezer, S.; Venugopal, P.; Zeldis, J.; *Blood* **2001**, *98*, 958.
- Aerbajinai, W.; Zhu, J.; Gao, Z.; Chin, K.; Rodgers, G. P.; *Blood* **2007**, *110*, 2864.
- Hsiao, C. H.; Li, W.; Lou, T. F.; Baliga, B. S.; Pace, B. S.; *Exp. Hematol.* **2006**, *34*, 264.
- Moutouh-de-Parseval, L. A.; Verhelle, D.; Glezer, E.; Jensen-Pergakes, K.; Ferguson, G. D.; Corral, L. G.; Morris, C. L.; Muller, G.; Brady, H.; Chan, K.; *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 248.
- Tenorio, R. P.; Góes, A. J. S.; Lima, J. G.; Faria, A. R.; Alves, A. J.; Aquino, T. M.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 1030.
- Hanft, V. N.; Fruchtman, S. R.; Pickens, C. V.; Rosse, W. F.; Howard, T. A.; Ware, R. E.; *Blood* **2000**, *95*, 3589.
- Steinberg, M. H.; Barton, F.; Castro, O.; Pegelow, C. H.; Ballas, S. K.; Kutlar, A.; *JAMA* **2003**, *289*, 1645.
- Steinberg, M. H.; *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 204.
- Conran, N.; Oresco-Santos, C.; Acosta, H. C.; Fattori, A.; Saad, S. T.; Costa, F. F.; *Br. J. Haematol.* **2004**, *124*, 547.
- Najejan, Y.; Rain, J. D.; *Blood* **1997**, *90*, 3370.

46. Fruchtman, S. M.; Mack, K.; Kaplan, M. E.; Peterson, P.; Berk, P. D.; Wasserman, L. R.; *Semin. Hematol.* **1997**, *34*, 17.
47. Ferm, V. H.; *Arch. Pathol.* **1966**, *81*, 174.
48. Depass, L. R.; Weaver, E. V.; *J. Toxicol. Environ. Health* **1982**, *10*, 297.
49. Santos, J. L.; Varanda, E. A.; Lima, L. M.; Chung, M. C.; *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 779.
50. Santos, J. L.; Bosquesi, P. L.; Varanda, E. A.; Lima, L. M.; Chung, M. C.; *Molecules* **2011**, *16*, 2982.
51. Lima, P. D. L.; Cardoso, P. C. S.; Khayat, A. S.; Bahia, M. O.; Burbano, R. R.; *Gen. Mol. Res.* **2003**, *2*, 328.
52. Waterman, M. R.; Yamaoka, K.; Dahm, L.; Taylor, J.; Cottam, G. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, *71*, 2222.
53. Ueno, H.; Bai, Y.; Manning, J. M.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, *565*, 239.
54. Mehanna, A. S.; Abraham, D. J.; *Biochemistry* **1990**, *29*, 3944.
55. Randad, R. S.; Mahran, M. A.; Mehanna, A. S.; Abraham D. J.; *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 752.
56. Wireko, F. C.; Kellogg, G. E.; Abraham, D. J.; *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 758.
57. Park, S.; Hayes, B. L.; Marankan, F.; Mulhearn, D. C.; Wanna, L.; Mesecar, A. D.; Santarsiero, B. D.; Johnson, M. E.; Venton, D. L.; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 936.
58. Zhang, C.; Li, X.; Lian, L.; Chen, Q.; Abdulmalik, O.; Vassilev, V.; Lai, C. S.; Asakura, T.; *Br. J. Haematol.* **2004**, *125*, 788.
59. Safo, M. K.; Abdulmalik, O.; Danso-Danquat, R.; Burnett, J. C.; Nokuri, S.; Joshi, G. S.; Musayev, F. N.; Asakura, T.; Abraham, D. J.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4665.
60. Queiroz, S. L.; Batista, A. A.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 584.
61. Barreto, R. L.; Correia, C. R. D.; Muscara, M. N.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 1046.
62. Reiter, C. D.; Wang, X.; Tanus-Santos, J. E.; Hogg, N.; Cannon III, R. O.; Schwchter, A. N.; Gladwin, M. T.; *Nat. Med.* **2002**, *8*, 1383.
63. Canalli, A. A.; Franco-Penteado, C. F.; Saad, S. T.; Conran, N.; Costa, F. F.; *Haematologica* **2008**, *93*, 605.
64. Atz, A. M.; Wessel, D. L.; *Anesthesiology* **1997**, *87*, 988.
65. Hunter, C. J.; Dejam, A.; Blood, A. B.; Shields, H.; Kim-Shapiro, D. B.; Machado, R. F.; *Nat. Med.* **2004**, *10*, 1122.
66. Santos, J. L.; Lanaro, C.; Lima, L. M.; Gambero, S.; Franco-Penteado, C. F.; Alexandre-Moreira, M. S.; Wade, M.; Yerigenahally, S.; Kutlar, A.; Meiler, S. E.; Costa, F. F.; Chung, M. C.; *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5811.
67. Santos, J. L.; *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2010**, *32*, 341.
68. Santos, J. L.; Chung, M. C.; *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2010**, *32*, 489.
69. Santos, J. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil, 2009.
70. Morris, C. R.; Kuypers, F. A.; Larkin, S.; Sweeters, N.; Simmon, J.; Vichinsky, E. P.; Styles, L. A.; *Br. J. Haematol.* **2000**, *111*, 498.
71. Morris, C. R.; Kuypers, F. A.; Larkin, S.; Vichinsky, E. P.; Styles, F. A.; *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2000**, *22*, 515.
72. Dasgupta, T.; Hebbel, R. P.; Kaul, D. K.; *Free Radical Biol. Med.* **2006**, *41*, 1771.
73. Styles, L.; Kuypers, F. A.; Kesler, K.; Reiss, U.; Lebeau, P.; Nagel, R. L.; Fabry, M. E.; *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Atlanta, EUA, 2007.
74. Weinert, P. L.; Pezza, L.; Pezza, H. R.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1112.
75. Machado, R. F.; Martyr, S.; Kato, G. J.; Barst, R. J.; Anthi, A.; Robinson, M. R.; Hunter, L.; Coles, W.; Nichols, J.; Hunter, C.; Sachdev, V.; Castro, O.; Gladwin, M. T.; *Br. J. Haematol.* **2005**, *130*, 445.
76. Solovey, A.; Kollander, R.; Shet, A.; Milbauer, L. C.; Choong, S.; Panoskaltis-Mortari, A.; Blazar, B. R.; Kelm Jr, R. J.; Hebbel, R. P.; *Blood* **2004**, *104*, 840.
77. Lew, V. L.; Tiffert, T.; Etzion, Z.; Perdomo, D.; Daw, N.; Macdonald, L.; Bookchin, R. M.; *Blood* **2005**, *105*, 361.
78. De Franceschi, L.; Bachir, D.; Galacteros, F.; Tchernaia, G.; Cynober, T.; Neuberg, D.; Beuzard, Y.; Brugnara, C.; *Br. J. Haematol.* **2000**, *108*, 284.
79. Hankins, J. S.; Wynn, L. W.; Brugnara, C.; Hillery, C. A.; Li, C. S.; Wang, W. C.; *Br. J. Haematol.* **2008**, *140*, 80.
80. Joiner, C.; Rettig, R. K.; Jiangm, R.; Franco, P. S.; *Blood* **2007**, *109*, 1728.
81. Cao, Y. J.; Houamed, K. M.; *FEBS Lett.* **1999**, *446*, 137.
82. Maher, A. D.; Kuchel, P. W.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 1182.
83. Berkowitz, L. R.; Orringer, E. P.; *J. Clin. Invest.* **1981**, *68*, 1215.
84. Benjamin, L. J.; Berkowitz, L. R.; Orringer, E. P.; Mankad, V. N.; Prasad, A. S.; Lewkow, L. M.; Chillar, R. K.; Peterson, C. M.; *Blood* **1986**, *67*, 1442.
85. Lewis, G. P.; Cho, Y. W.; *J. Clin. Pharmacol.* **1982**, *22*, 243.
86. Brugnara, C.; De Franceschi, L.; Alper, S. L.; *J. Clin. Invest.* **1993**, *92*, 520.
87. De Franceschi, L.; Sadane, N.; Trudel, M.; Alper, S. L.; Brugnara, C.; Beuzard, Y.; *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 1670.
88. Stocker, J. W.; De Franceschi, L.; McNaughton-Smith, G. A.; Corrocher, R.; Beuzard, Y.; Brugnara, C.; *Blood* **2003**, *101*, 2412.
89. Ataga, K. I.; *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2009**, 2009, 54.
90. Navaid, M.; Melvin, T.; *Am. J. Hosp. Palliat. Care* **2010**, *27*, 215.
91. Telen, M. J.; *Semin. Hematol.* **2001**, *38*, 315.
92. Adams, R. J.; McKie, V. C.; Hsu, L.; Files, B.; Vichinsky, E.; Pegelow, C.; Abboud, M.; Gallagher, D.; Kutlar, A.; Nichols, F. T.; Bonds, D. R.; Brambilla, D.; *New Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 5.
93. Benite, A. M. C.; Machado, S. P.; Machado, B. C.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1155.
94. Cappellini, M. D.; Piga, A.; *Curr. Mol. Med.* **2008**, *8*, 663.
95. Ilnat, P. M.; Vennerstrom J. L.; Robinson, D. H.; *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1525.
96. Rodgers, S. J.; Raymond, K. N.; *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 439.
97. Kontoghioghes, G. J.; Eracleous, E.; Economides, C.; Kolnagou, A.; *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2663.
98. Wang, W. C.; *Curr. Opinion Hematol.* **2007**, *14*, 191.
99. Mirre, E.; Brousse, V.; Berteloot, L.; Lambot-Juhan, K.; Verlhac, S.; Boulat, C.; Dumont, M.; Lenoir, G.; Montalembert, M.; *Eur. J. Haematol.* **2010**, *84*, 259.
100. Hider, R. C.; Zhou, T.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1054*, 141.
101. Orringer, E. P.; Casella, J. F.; Ataga, K. I.; Koshy, M.; Adams-Graves, P.; Luchtman-Jones, L.; Wun, T.; Watanabe, M.; Shafer, F.; Kutlar, A.; Abboud, M.; Steinberg, M.; Adler, B.; Swerdlow, P.; Terregino, C.; Saccante, S.; Files, B.; Ballas, S.; Brown, R.; Wojtowicz-Praga, S.; Grindel, J. M.; *JAMA* **2001**, *286*, 2099.
102. Ballas, S. K.; Files, B.; Luchtman-Jones, L.; Benjamin, L.; Swerdlow, P.; Hilliard, L.; Coates, T.; Abboud, M.; Wojtowicz-Praga, S.; Grindel, J. M.; *Hemoglobin* **2004**, *28*, 85.
103. Wambebe, C.; Khamofu, H.; Momoh, J. A.; Ekpeyong, M.; Audu, B. S.; Njoku, O. S.; Bamgboye, E. A.; Nasipuri, R. N.; Kunle, O. O.; Okogun, J. I.; Enwerem, M. N.; Audam, J. G.; Gamaniel, K. S.; Obodozie, O. O.; Samuel, B.; Fojule, G.; Ogunyale, O.; *Phytomedicine* **2001**, *8*, 252.
104. Iyamu, E. W.; Turner, E. A.; Asakura, T.; *Br. J. Haematol.* **2003**, *122*, 1001.
105. Oniyangi, O.; Cohal, D. H.; *Cochrane Database Syst. Rev.* **2010**, *10*, CD004448.
106. Akojie, F. O.; Fung, L. W.; *Planta Med.* **1992**, *58*, 317.
107. Akinsulie, A. O.; Temiye, E. O.; Akanmu, A. S.; Lesi, F. E.; Whyte, C. O.; *J. Trop. Pediatr.* **2005**, *51*, 200.
108. Johnson, F. L.; Look, A. T.; Gockerman, J.; Ruggiero, M. R.; Dalla-Pozza, L.; Billings, F. T.; *New Engl. J. Med.* **1984**, *311*, 780.
109. Gaziev, J.; Lucarelli, G.; *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2010**, *24*, 1145.
110. Papanikolaou, E.; Anagnou, N. P.; *Curr. Gene Ther.* **2010**, *10*, 404.