

Avaliação das concentrações de malonaldeído e nitrito em pacientes com anemia falciforme em tratamento ou não com hidroxiureia

Evaluation of the concentration of malondialdehyde and nitrite in patients with sickle cell anemia treated or not with hydroxyurea

Darcielle Bruna Dias Elias¹, Rivelilson Mendes de Freitas², Romélia Pinheiro Gonçalves³, Hemerson Yuri Ferreira Magalhães⁴, Jacqueline Holanda de Sousa⁵, Sílvia Maria Meira Magalhães⁶

RESUMO

Objetivo: Determinar os níveis séricos de malonaldeído e de nitrito em pacientes com anemia falciforme em tratamento ou não com hidroxiureia e em acompanhamento ambulatorial. **Métodos:** Dos 65 pacientes com diagnóstico de anemia falciforme selecionados para o estudo, 51 não fizeram tratamento com hidroxiureia (Grupo 1) e 14 fizeram uso crônico de hidroxiureia (Grupo 2), sendo que 20 indivíduos não tinham hemoglobinopatias (Grupo Controle). **Resultados:** O Grupo Controle possuía menor e mais homogênea concentração dos níveis de malonaldeído em relação aos outros grupos. Os resultados do Grupo 1 e do Grupo 2 mostraram valores aumentados dos níveis de malonaldeído quando comparados ao Grupo Controle. Quando comparados os valores dos Grupos 1 e 2, não foram observadas alterações significativas nos níveis de malonaldeído. Não houve diferença significativa nos níveis séricos de nitrito entre os grupos. Verificou-se que, no Grupo 2, houve uma correlação estatisticamente significativa dos níveis séricos de malonaldeído com as variáveis clínicas investigadas. Por sua vez, o Grupo 1 mostrou correlação somente com a ocorrência de três ou mais crises vaso-oclusivas. Não se verificou nenhuma correlação nos níveis de nitrito com as variáveis clínicas. **Conclusão:** Os resultados revelaram que, durante o estabelecimento da patogênese da anemia falciforme, pode ser observado um aumento na peroxidação lipídica. Por outro lado, durante o tratamento com a hidroxiureia, não foi detectada nenhuma alteração nos parâmetros oxidativos, provavelmente devido ao curto período de tratamento dos pacientes em estudo.

Descritores: Anemia falciforme/quimioterapia; Malonaldeído; Substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico; Nitrito; Estresse oxidativo; Hidroxiureia/uso terapêutico

ABSTRACT

Objective: To determine the serum levels of malondialdehyde and nitrite in patients with sickle cell anemia treated or not with hydroxyurea in outpatient's setting. **Methods:** Of the 65 patients with sickle cell anemia selected for the study, 51 of them were not treated with hydroxyurea (Group 1), 14 made chronic use of hydroxyurea (Group 2) and 20 individuals had no hemoglobinopathies (Control Group). **Results:** The Control Group had a lower and more homogeneous concentration of malondialdehyde levels as compared to the other groups. The results of Groups 1 and 2 showed increased values of malondialdehyde levels when compared to the Control Group. Considering the values of Groups 1 and 2, there were no significant changes in the malondialdehyde levels. There was no significant difference in the serum levels of nitrite between the groups. Group 2 presented a statistically significant correlation between serum malondialdehyde levels and the clinical variables investigated. In turn, Group 1 showed correlation only with occurrence of three or more vaso-occlusive crises. There was no correlation between nitrite levels and the clinical variables. **Conclusion:** The results revealed that during the pathogenesis of sickle cell anemia, an increase in lipid peroxidation was observed. On the other hand, no changes in oxidative parameters were detected during treatment with hydroxyurea, probably due to the short period of treatment of the patients studied.

Keywords: Anemia, sickle cell/drug therapy; Malondialdehyde; Thiobarbituric acid reactive substances; Nitrite; Oxidative stress; Hydroxyurea/therapeutic use

Trabalho realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio – HUWC, Fortaleza (CE), Brasil.

¹ Farmacêutica Analista Clínica; Pós-graduanda (Doutorado) em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza (CE), Brasil.

² Professor Adjunto da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina (PI), Brasil.

³ Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza (CE), Brasil.

⁴ Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza (CE), Brasil.

⁵ Médica; Hospital Universitário Walter Cantídeo da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza (CE), Brasil.

⁶ Professora Adjunta da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza (CE), Brasil.

Autor correspondente: Darcielle Bruna Dias Elias Rua Miguel Gonçalves, 66, apto. 202, Montese – CEP 60420-480 – Fortaleza (CE), Brasil – Tel.: (85) 3292-0416 – e-mail: darcielle.bruna@gmail.com

Data de submissão: 28/6/2010 – Data de aceite: 2/10/2010

INTRODUÇÃO

A produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERN) pode ser observada durante o metabolismo humano em diversas reações fisiológicas. O organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar tais reações. Após o desequilíbrio entre os sistemas pró- e antioxidantes, pode ocorrer o estresse oxidativo, conduzindo a danos estruturais e/ou funcionais⁽¹⁾.

O organismo humano sofre ação constante de radicais livres. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radiculares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$); e os não radiculares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN, temos o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nítrico (N_2O_3), ácido nítrico (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Enquanto alguns deles podem ser altamente prejudiciais ao organismo, lesionando membranas dos eritrócitos, proteínas e DNA, outros reagem apenas com os lipídeos, produzindo peroxidação lipídica⁽²⁻⁵⁾. Dentre as classes de moléculas que podem ser lesadas pelas EROs, os lipídeos são os mais suscetíveis à oxidação. A degradação dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como malonaldeído (MDA) e outros aldeídos, são especialmente danosos, reduzindo a viabilidade das células durante a anemia falciforme (AF)⁽⁶⁾.

A AF é uma doença hereditária da síntese de hemoglobina determinada pela homozigose da hemoglobina S (Hb SS), e pode ser caracterizada pela elevada taxa de morbidade e mortalidade devido à elevada frequência de episódios vaso-oclusivos⁽⁷⁾.

A Hb S é menos solúvel quando desoxigenada e se polimeriza em fibras rígidas, provocando oclusão da microcirculação. Além disso, a Hb S é menos estável, ocasionando altas concentrações de EROs durante AF. As células falciformes são mais frágeis do que os eritrócitos normais e, por essa razão, apresentam menor tempo de vida⁽⁸⁾.

Pacientes com AF são frequentemente 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)^(7,9).

O paciente com AF apresenta vasculopatia devido à produção de radicais livres e pela diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO)⁽⁹⁾. Recentemente, tem sido investigado o papel fisiopatológico do NO . Devido à disfunção endotelial nos pacientes falciformes,

os níveis de endotelina são maiores do que os níveis de NO , contribuindo para a vasoconstrição. Dados da literatura sugerem que o NO pode ter um papel importante na fisiopatologia da AF, particularmente durante o estresse oxidativo^(7,10).

A hidroxiureia (HU) vem sendo utilizada no tratamento da AF com a finalidade de elevar os níveis de hemoglobina fetal (Hb F) e, com isso, diminuir as crises vaso-oclusivas⁽¹¹⁾. Cokic et al., em 2008, demonstraram níveis de GMPc significativamente elevados em pacientes com AF em uso de hidroxiureia⁽¹¹⁾. Outros estudos demonstraram propriedades antioxidantes da HU por meio da inibição da peroxidação lipídica induzida pela formação de meta-hemoglobina, justificando seu uso no tratamento da AF^(12,13).

OBJETIVO

Investigar os níveis de séricos de MDA e de nitrito em pacientes com AF em tratamento ou não com a HU e em acompanhamento ambulatorial, correlacionando esses parâmetros ao conteúdo de MDA e de nitrito e com as variáveis clínicas observadas nos pacientes com AF.

MÉTODOS

Desenho do estudo

O estudo foi do tipo transversal descritivo e realizado em Fortaleza (CE), Brasil, com pacientes adultos com AF atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), no período de Abril de 2008 a Janeiro de 2009. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará (nº 113.12.07).

No total, 65 pacientes foram recrutados e estudados de forma randomizada, de acordo com critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: adultos com diagnóstico de AF confirmado por biologia molecular que fizeram uso ou não de HU durante seis meses de tratamento. Foram excluídos do estudo crianças com AF, adultos que tenham realizado terapia transfusional nos últimos três meses ou em uso de quelante de ferro e aqueles que se recusaram a participar do estudo. O grupo foi estratificado de acordo com o uso de HU, sendo o Grupo 1 (n = 51) de pacientes com AF que não fizeram uso da HU e o Grupo 2 (n = 14) de pacientes que fizeram uso de HU. O Grupo 3 ou controle (n = 20) foi constituído por indivíduos sem hemoglobinopatias. As variáveis clínicas foram obtidas nos prontuários dos pacientes, assim como as informações sobre o uso ou não da HU em dose habitual de 20 mg/kg.

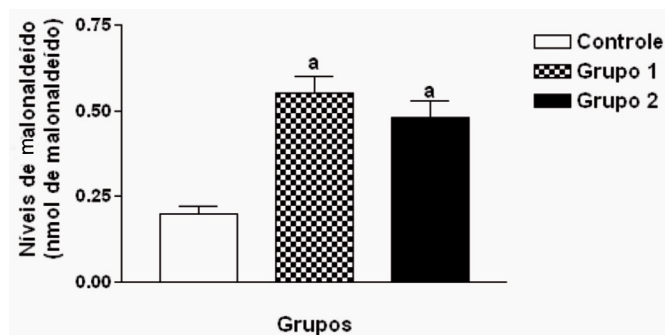
Determinação dos níveis de malonaldeído e nitrito

Foram colhidas amostras de sangue venoso de cada paciente em tubo contendo anticoagulante heparina, isolando-se o plasma para as dosagens de MDA e nitrito e em EDTA para a confirmação de Hb SS por meio de PCR-AE⁽¹⁴⁾ nos pacientes com anemia falciforme e para confirmação de Hb AA por HPLC nos indivíduos sem hemoglobinopatias.

O método empregado para determinar o MDA baseou-se em sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS)⁽¹⁵⁾. A concentração de nitrito foi determinada segundo o método de Green⁽¹⁴⁾.

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm EPM e analisados por meio do programa estatístico SPSS 15.0. Também foi utilizado o teste *t* de Student para comparar as variáveis clínicas com os níveis de MDA e do nitrito. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$.



Grupo 1: Pacientes com AF que não fizeram tratamento com HU; Grupo 2: Pacientes com AF que fizeram tratamento com HU; Grupo Controle: Indivíduos sem hemoglobinopatias; MDA: Malonaldeído; AF: Anemia falciforme; HU: hidroxiureia.

* $p < 0,05$ (ANOVA e Teste *t* de Student).

Figura 1. Concentração de malonaldeído (MDA) em pacientes com anemia falciforme.

RESULTADOS

Verificou-se um predomínio do sexo feminino ($n = 33$) e média de idade de $31,37 \pm 11,29$ anos nos pacientes com AF. O Grupo Controle possuía menor e mais homogênea concentração dos níveis de MDA em relação aos outros grupos. Os resultados do Grupo 1 ($p < 0,0001$) e do Grupo 2 ($p < 0,0001$) mostraram valores aumentados dos níveis de malonaldeído quando comparados ao Grupo Controle (Figura 1). Quando comparados os valores dos Grupos 1 e 2, não foram observadas alterações significativas nos níveis de MDA ($p = 0,3154$) (Figura 1).

Quando comparados os níveis de MDA com as variáveis clínicas nos pacientes com AF, observou-se que no Grupo 1 houve uma correlação com as crises vaso-oclusivas ($p < 0,0051$). Já no Grupo 2, a correlação foi estatisticamente significativa com as variáveis clínicas: duas ou mais transfusões no decorrer do ano ($p < 0,0469$), presença de úlcera de perna maleolar ($p < 0,0400$) e a ocorrência de três ou mais crises vaso-oclusivas ($p < 0,0031$) (Tabela 1).

Em relação aos níveis séricos de nitrito, verificou-se uma razoável assimetria positiva para os três grupos. Não foram observadas alterações significativas no conteúdo de nitrito do Grupo 1 ($p = 0,2015$) e do Grupo 2 ($p = 0,1305$) quando comparados ao Grupo Controle. Por sua vez, também não foi detectada alteração significativa nos níveis de nitrito entre os Grupos 1 e 2 ($p = 0,0966$). Os níveis séricos de nitrito para ambos os grupos não apresentaram nenhuma correlação significativa com as variáveis clínicas.

DISCUSSÃO

A análise dos dados obtidos revelou que todos os pacientes com AF apresentaram níveis elevados de MDA, porém os que fizeram tratamento com a HU apresentaram

Tabela 1. Comparação dos fatores das variáveis clínicas em relação ao nível de malonaldeído (MDA)

Variáveis clínicas	MDA						
	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		
	Média \pm EPM	Valor p	Média \pm EPM	Valor p	Média \pm EPM	Valor p	
Sexo	Feminino	0,50 \pm 0,14	0,0934	0,59 \pm 0,07	0,1233	0,54 \pm 0,11	0,1233
	Masculino	0,44 \pm 0,11		0,49 \pm 0,15		0,45 \pm 0,12	
Transfusões por ano	0 a 1	0,47 \pm 0,14	0,2711	0,54 \pm 0,12	< 0,0469*	0	-
	2 ou mais	0,52 \pm 0,10		0,63 \pm 0,04		0	
Crises vaso-oclusivas	1 ou 2	0,43 \pm 0,12	< 0,0051**	0,43 \pm 0,14	< 0,0031*	0	-
	3 ou mais	0,53 \pm 0,13		0,6 \pm 0,05		0	
Úlceras de perna/maleolar	Não	0,47 \pm 0,12	0,3292	0,54 \pm 0,06	< 0,0400*	0	-
	Sim	0,51 \pm 0,15		0,64 \pm 0,12		0	
Infecções recorrentes	Nenhuma	0,46 \pm 0,15	0,3790	0,54 \pm 0,11	0,1114	0	-
	Pelo menos 1	0,50 \pm 0,11		0,64 \pm 0,02		0	

Grupo 1: Pacientes com AF que fizeram tratamento com HU; Grupo 2: Pacientes com AF que não fizeram tratamento com HU; Grupo 3: Indivíduos sem hemoglobinopatias (grupo controle); MDA: malonaldeído; AF: anemia falciforme; HU: hidroxiureia; EPM: erro padrão da média.

$p < 0,05$ (ANOVA e Teste *t* de Student).

*Significativo.

menor e mais homogênea concentração de MDA em relação aos pacientes com AF que não fizeram tratamento com HU e ao Grupo Controle. Estes resultados sugerem que houve dano oxidativo em todos os pacientes, independentemente do tratamento com a HU. Em pesquisa realizada em 2008 por Manfredini et al., foi constatada a presença de níveis elevados de MDA em pacientes com AF sem uso de HU quando comparados aos pacientes do grupo controle⁽¹⁶⁾. Os resultados do presente estudo demonstraram que, nesses pacientes, a HU não exerceu ação inibitória da peroxidação lipídica. Pode-se sugerir que essa discrepância se deva a vários fatores, dentre eles o curto período de tratamento com a HU^(3,4).

Ao se avaliar a correlação dos níveis de MDA com a quantidade de crises vaso-oclusivas no último ano, observou-se um aumento de MDA estatisticamente significativo nos dois grupos de pacientes com AF que tiveram três ou mais crises de vaso-oclusão ($p < 0,005$ para Grupo 1 e $p < 0,0031$ para o Grupo 2). O mesmo ocorreu em relação aos níveis de MDA com as variáveis duas ou mais transfusões no decorrer do ano ($p < 0,0469$) e com presença de úlcera de perna maleolar ($p < 0,0400$) nos pacientes com AF que fizeram tratamento com a HU. Esses resultados são relevantes, pois demonstram que os níveis de MDA são diretamente proporcionais aos moduladores de prognóstico na AF. Em 2007, Fasola et al. avaliaram a relação entre a frequência de crises vaso-oclusivas e o *status* total antioxidante (TAS), observando que a média de TAS em 25 pacientes com AF foi menor para aqueles que apresentaram três ou mais crises de vaso-oclusão no último ano⁽¹⁷⁾.

Estudos recentes sugerem que pacientes com AF sofrem decréscimo das reservas de NO principalmente durante as crises vaso-oclusivas e na síndrome de seqüestro agudo^(3,4), sendo os níveis de NO inversamente proporcionais aos sintomas dolorosos, de forma que a diminuição da biodisponibilidade do NO pode contribuir para a fisiopatologia da AF⁽¹⁸⁾.

A estimativa dos níveis de NO, neste estudo, foi realizada por meio 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 três grupos estudados não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, provavelmente devido ao fato de se tratar de pacientes assintomáticos. Verificou-se que o uso da HU pode não modificar o conteúdo sérico do nitrito, provavelmente devido ao curto período de tratamento. Este achado difere de alguns trabalhos que demonstram um aumento transitório de NO durante as crises vaso-oclusivas em pacientes com AF que fizeram tratamento com a HU^(2,19,20). Morris et al. demonstraram um aumento dos níveis de NO em pacientes com AF assintomática em

uso de HU, sendo que esse aumento foi potencializado pela associação com a arginina durante o tratamento⁽²¹⁾. Por sua vez, Lopez et al., em 2003, observaram baixos níveis de L-arginina e de NO em pacientes adultos com AF durante crises vaso-oclusivas quando comparados com pacientes com AF assintomáticos⁽²²⁾.

Sabe-se que existem três possíveis mecanismos para a redução da disponibilidade de NO em pacientes com anemia falciforme: primeiro, os baixos níveis plasmáticos de L-arginina; segundo, o aumento do consumo de NO pelas EROs; e terceiro, o consumo de NO por meio da hemoglobina liberada no plasma durante a hemólise. Estudos recentes indicam que 50% dos pacientes com anemia falciforme apresentam disfunção endotelial devido principalmente ao consumo de NO pela hemoglobina livre no plasma⁽¹⁸⁾.

Com base nesses resultados, demonstrou-se que há uma real importância na realização dos estudos com pacientes portadores de AF, uma vez que é considerada atualmente como uma doença inflamatória crônica, possuindo peculiaridades quanto a alterações no estresse oxidativo. Ressalta-se, ainda, a relevância dos achados apresentados que não corroboram com a literatura, no entanto, são raros os trabalhos que abordam a temática do presente estudo. Espera-se, então, contribuir para a melhor compreensão do envolvimento do processo de peroxidação lipídica e nos níveis séricos de nitrito em pacientes adultos com anemia falciforme. Estes dados podem fornecer subsídios para que outros estudos verifiquem os efeitos crônicos do tratamento com a HU durante a patogênese do estresse oxidativo observado durante a anemia falciforme, contribuindo para diminuir os impactos desse grave problema de saúde pública.

Não pudemos comprovar o efeito inibidor da HU no estresse oxidativo por estarmos comparando dois grupos de pacientes, um assintomático e outro com evolução desfavorável da doença com indicação de uso da HU, sendo que esses últimos apresentam quadro mais crítico da doença, comprovados por maiores níveis de MDA. Estudos sequenciais avaliando apenas os pacientes em tratamento crônico com HU e em diferentes momentos devem ser realizados, a fim de esclarecer o mecanismo de ação da HU na anemia falciforme.

CONCLUSÃO

Os resultados revelaram que, durante o estabelecimento da patogênese da AF, pode ser observado um aumento na peroxidação lipídica. Por outro lado, durante o tratamento com a HU, não foi detectada nenhuma alteração nos parâmetros oxidativos, provavelmente devido ao curto período de tratamento dos pacientes em estudo.

REFERÊNCIAS

1. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato MS, Manfredini V, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30(5):1323-38.
2. Barreiros ALBS, David JM. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Quim Nova*. 2006;29(1):113-23.
3. Amer J, Filbach E. Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta-thalassaemia patients. *Br J Haematol*. 2005;129(3):435-41.
4. Klings ES, Farber HW. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Resp Res*. 2001;2(5):280-5.
5. Chan A, Chow C, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;222(3):274-82.
6. Tukamoto Jr NC. Influência do polimorfismo de GST e peroxidação lipídica no fenótipo de Hb S e mutantes no gene HFE. [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2008.
7. Wood KC, Grander DN. Sickle cell disease: Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol*. 2007;34(9):926-32.
8. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Rad Biol Méd*. 2008;44(8):1506-28.
9. Dhananjay K, Kaul XDL, Xiaoquin Z, Li M, Carleton JCH, Nagel RL. Inhibition of sickle red cell adhesion and vasoocclusion in the microcirculation by antioxidants. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*. 2006;291:167-75.
10. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood*. 2007;21(1):37-47.
11. Cokic VP, Andric SA, Stojkovic SS, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. *Blood*. 2008;111(3):1117-23.
12. Cannalli AA. Increased adhesive properties of the neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Hematol J*. 2008;9(4):605-9.
13. Agil A, Sadzadeh SMH. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Report*. 2000;5(1):29-34.
14. Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*. 1981;312(4490):56-8.
15. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421-31.
16. Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH, Santin AP, Brandão VDM, Wagner S, et al. Blood antioxidant parameters sickle cell anemia patients steady state. *J Nat Med Assoc*. 2008;100(8):897-902.
17. Fasola F, Adepo K, Anetor J, Kuti M. Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. *J Natl Med Assoc*. 2007;99(8):891-4.
18. Mack AK, Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *Int J Biochem. Cell Biol*. 2006;38(8):1237-43.
19. 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;116(2):436-44.
20. King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Rad Biol Med*. 2004;37(6):737-44.
21. Morris CR, Vichinsky EP, Van Warmendam 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 Pediatric Hematol Oncol*. 2003;25(8):629-34.
22. Lopez BL, Kreshak AA, Morris CR, Davis-Moo L, Ballas SK, Ma XL. L-arginine levels are diminished in adult acute vaso-occlusive sickle cell crisis in the emergency department. *Br J Haematol*. 2003;120(3):532-4.