

## **Papel de los Calcio-Antagonistas en el control de eventos Vaso-Oclusivos y Hemolíticos en Drepanocitosis. Estudio piloto con Nitrendipina**

*JC Serrano1, M Ball1, D Velásquez1 y M González2.*

1. Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas. UCV. Caracas.
2. Dirección Médica de Laboratorios LETI, Guarenas. Edo Miranda.

### **Resumen**

**Antecedentes:** Recientemente se inició el estudio de fármacos capaces de inhibir la pérdida de agua y K<sup>+</sup> del glóbulo rojo dependiente de Ca<sup>++</sup>, mediante el bloqueo del Canal de Gardos, como medida terapéutica para evitar el fenómeno de falciformación. Nuestro estudio intenta establecer el rol de la nitrendipina en el control de las manifestaciones clínicas y paraclínicas en drepanocitosis. **Métodos:** Se realizó un estudio clínico controlado con placebo, randomizado, bajo protocolo simple ciego, de grupos en paralelo, con dos niveles de dosis, de 10 semanas de duración. Se incluyeron 26 pacientes (16 mujeres y 10 hombres) aleatoriamente distribuidos en tres grupos para recibir placebo o nitrendipina a 20 mg/día o nitrendipina a 30 mg/día. **Resultados:** En ambos grupos de tratamiento con nitrendipina se apreció una tendencia hacia una menor frecuencia de eventos vaso-oclusivos con una menor proporción de pacientes afectados, pero sin lograr una diferencia estadísticamente significativa en las medias de evento por paciente, ni de intensidad media en cada grupo. La nitrendipina logró una reducción significativa en el porcentaje de reticulocitos y en los niveles de bilirrubina indirecta basales en ambos niveles de dosis con respecto al placebo (comparación intergrupo e intragrupo:  $p < 0.05$ ). El resto de los parámetros no se modificaron. La droga fue bien tolerada. **Conclusiones:** La nitrendipina redujo algunos marcadores de hemólisis (% de reticulocitos y BI). El verdadero potencial terapéutico de este agente debe ser confirmado en nuevos protocolos clínicos controlados.

**Palabras Clave:** Nitrendipina, Anemia drepanocítica, Estudio controlado, Canal de Gardos, Pérdida Potasio intraglobular.

### **ABSTRACT**

**Antecedents:** Recently began the study on drugs able to inhibit the loss of water and K<sup>+</sup>, dependent of calcium from the red cell, by means of the blockade of Gardo's Channel, as a therapeutic measure to avoid the sickling phenomenon. Our study tries to establish the rol of the nitrendipin in the control of the clinical and paraclinical manifestations in sickle cell disease. **Methods:** We carried out a randomized, placebo controlled clinical trial, on single blind fashion with groups in parallel, two dose levels, of 10 weeks of duration. Twenty six patients were included (16 women and 10 men) distributed at rabdom in three groups to receive placebo or nitrendipin to 20 mg/day or

nitrendipin to 30 mg/day. **Results:** In both treatment groups with nitrendipin, a tendency was appreciated toward a lower frequency of occlusive events with a smaller proportion of affected patients, but without achieving a statistically significant difference in the mean of events per patient or in mean intensity of pain in each group. The nitrendipin achieved a significant reduction in the reticulocyte percentage and in the basal levels of indirect bilirubin at both dose levels with regard to the placebo group (intergroup and intragroup comparison:  $p < 0.05$ ). The rest of the parameters didn't modify. The drug was safe and well tolerated. **Conclusions:** The nitrendipin reduced some haemolytic markers (% of reticulocytes and indirect bilirubin). The true therapeutic potential of this drug should be confirmed in new controlled trials.

**Key Words:** Nitrendipin, Sickle cell disease, Controlled study, Gardos channel, Intracellular Potassium.

## INTRODUCCIÓN

La anemia drepanocítica, descrita por primera vez por James Henrick en 1910, caracterizada por una alteración genética en la que se produce la sustitución de timina por adenina en el codón de ADN, que conlleva a la sustitución de valina por ácido glutámico en la posición 6 de la cadena beta de la hemoglobina(1). La forma homocigota de la enfermedad genera altas proporciones de hemoglobina S con una fuerte tendencia a agregarse en condiciones de desoxigenación, formando polímeros moleculares de menor solubilidad, que llevan a la gelificación de la hemoglobina intracorporal, generando eritrocitos poco deformables, con alteraciones morfológicas (drepanocitos irreversibles), que son las bases de las manifestaciones clínicas dado por fenómenos vaso-oclusivos en diversos órganos y los procesos de hemólisis crónica y/o agudizada. Donde pequeños aumentos en la concentración intracorporal de Hb S, potencian la polimerización de la misma, con la formación de células falciformes. En este sentido, la deshidratación celular juega un papel crucial como mecanismo iniciador del proceso de falciformación que todavía en fase reversible, pasan por etapas de oxigenación-desoxigenación de la Hb S, hasta generarse el drepanocito irreversible(1,2).

En los últimos 30 años se han investigado varias opciones terapéuticas en la enfermedad, como la inducción de hiponatremia y expansión celular con desmopresina(3), disminución de la concentración de Hb S por un aumento de la hemoglobina fetal mediante hidroxiurea(1,4), sola o en combinación con eritropoyetina(5) o con derivados del butirato(6,7,8).

No obstante, en el presente existe un mayor entendimiento de los mecanismos de transporte iónico e hídrico en la membrana globular que deriva un diferente abordaje terapéutico destinado a evitar la deshidratación celular del eritrocito, por un bloqueo específico del flujo de potasio y agua intracorporal(9). En el eritrocito existe una alta cantidad de potasio, bajo contenido de sodio y calcio, con una cantidad variable de cloro. Para mantener estas condiciones son necesarios una serie de mecanismos, como la membrana globular, sistemas de transporte activo dependientes de ATP, destacando la bomba de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  y la bomba de calcio; sistemas de transporte pasivo como el Cotransporte de  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ , y el Cotransporte de  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$ (1,9,10), sistemas de intercambio  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ , intercambiadores iónicos II y una variedad de canales transmembrana, donde destacan los canales de agua mediados por proteína integral AQP1, canales activados por voltaje, canales de  $\text{K}^+$  de conductancia intermedia

(canales IK activados por Ca<sup>+</sup>) y canales de K<sup>+</sup> activado por calcio o canal de Gardos(11,12).

De todos los sistemas antes mencionados los más importantes en proporción y función son el cotransporte de K-CL y el Canal de Gardos. El primero expulsa potasio y cloro fuera de la célula, es dependiente de volumen y pH, siendo indispensable la presencia de cloro en su funcionamiento, puede ser activado por estrés hipotónico, además de N-etil-maleimida y Acetil-fenil-hidrazina. Es altamente inhibido por cationes divalentes, como Mg<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Este efecto ha sido logrado "in vivo" en pacientes drepanocíticos mediante la administración de pidolato de magnesio a 42 mEq/día(9,12). Por otro lado, el canal de Gardos es el canal de baja conductancia más abundante del glóbulo rojo con  $120 \pm 36$  unidades/cel siendo de gran importancia en el control del flujo de K<sup>+</sup> y agua hacia el espacio extracelular, tanto en sujetos sanos como drepanocíticos(9,11,13).

Desde su descubrimiento por Gardos en 1958(14), la actividad fisiológica de este canal no ha sido completamente dilucidada, pero indicios experimentales plantean un rol protector contra la hemólisis coloidosmótica inducida por la activación de la cascada del complemento(15), así como también podría inducir a los eritrocitos a participar en la formación de trombos. Este último fenómeno parece estar mediado por la prostaglandina E2 de plaquetas activadas(16). En 1987 se demostró que pequeños y bruscos aumentos en la concentración del Ca<sup>+</sup> intracelular, disminuyen el volumen y la deformabilidad de eritrocitos humanos sanos, donde aumentos en rango micromolar del Ca<sup>+</sup> citosólico (K50 = 0.3 a 2 mM), son suficientes para activar el canal de Gardos(17). Estos procesos parecen estar regulados a través de la fosforilación del AMP, inducida por procesos de desoxigenación cíclicos(18).

Entre los primeros agentes con potencial terapéutico, capaces de bloquear el canal de Gardos figuran el Citiedil(19), la Quinidina, Efaroxan y el Bepridil(20,21,22), que en general demostraron una baja actividad anti-falciformación, solo en altas cocentraciones,  $>10^{-4}$  M(19). En 1989 se identificó la charidotoxina (toxina escorpiónica de la especie *Leiurus*), como el inhibidor más potente del canal de Gardos hasta entonces, desarrollándose luego derivados sintéticos como la iberotoxina, péptidos recombinantes de ChTX y Charidotoxina sintética, siendo esta última la más potente (CI50  $4.1 \pm 3$  nM)(20). A inicios de los 90, Brugnara y col. señalan al antimicótico clotrimazol como un potente inhibidor del canal de Gardos(21), con una capacidad inhibitoria independiente de receptores imidazolínicos **I1** e **I2**(22).

Se demostró en estudios experimentales in vivo, con ratones transgénicos SAD1 y ratones Hbbd/Hbbthal SAD1 (modelos de hemoglobinopatía SS y bthal/SAD, respectivamente), en que la administración oral de clotrimazol (160 mg/kg) y miconazol (a 100 mg/kg), permitió el bloqueo del canal de Gardos (CI50=  $75 \pm 2.2$ nM), logrando un aumento del K<sup>+</sup> intraglobular, con descenso en la concentración de hemoglobina corpuscular media y elevación del volumen corpuscular medio, además de la elevación en la hemoglobina y el hematócrito de esos ratones, luego de 7 días de tratamiento. Estos efectos se mantuvieron con dosis de clotrimazol de 80 mg/kg/día, durante 28 días. que fueron revertidos al suspender el fármaco(23). Hallazgos similares fueron obtenidos con cepas de ratones DBA/2J  $\beta$ -thal (modelo murino de  $\beta$ -talasemia intermedia humana), en los cuales aumentó el K<sup>+</sup> globular, disminuyó la CHCM y la densidad celular, pero sin cambios significativos en Hb y Hto, efecto que si fue logrado en la

combinación de clotrimazol + hidroxiurea + eritropoyetina, con diferencia significativa frente a la combinación hidroxiurea + eritropoyetina(24).

En voluntarios sanos, el clotrimazol oral a 15 mg/kg/dosis, demostró una inhibición del canal de Gardos de un 51 a 92%, entre 2 y 4 horas luego de la toma. El efecto fue logrado por metabolitos de la droga sin el anillo imidazólico con mayor potencial tóxico(3). Posteriormente Brugnara en un estudio clínico abierto administró Clotrimazol 5 pacientes con anemia drepanocítica en dosis de 10 mg/kg/día, aumentando 10 mg/kg/día cada semana durante 21 días A dosis de 20 mg/kg/día, todos los sujetos presentaban inhibición del canal de Gardos, evidenciada por un aumento del K+ globular, reducción en el número de células densas y elevación en los niveles de Hb y Hto, sin modificación del CHCM, VCM, reticulocitos; planteando mayor actividad en eritrocitos maduros(25).

El empleo a largo plazo de clotrimazol, presenta problemas de toxicidad hepática relativa con eventual inhibición del citocromo P-450, en este sentido, se dirigió la búsqueda hacia otros agentes bloqueantes del canal de Gardos y a comienzos de los 90, Kaji (1990) y Ellory (1992) demuestran que las 1,4-dihidropiridinas como la nifedipina y la nitrendipina no solo inhiben los canales L del calcio, sino que son potentes bloqueantes del Canal de Gardos(26). Esta última es un reconocido antihipertensivo que se comparó in vitro junto a otros calcio-antagonistas, demostrando una capacidad inhibitoria del canal de Gardos superior a la quinidina, cetiedil, fendilina, bepridil y sus esteroisómeros, siendo incluso 200 veces más potente que la nifedipina, evidenciando a concentración 1  $\mu$ M un 97% de inhibición del canal de Gardosn, en 0.1  $\mu$ M genera un 67% de inhibición. El efecto antihipertensivo se logra en rango de 0.01 a 0.1  $\mu$ M(26). Otros análogos de la nitrendipina, con menor actividad cardiovascular no han demostrado el mismo potencial anti-Gardos(27).

A pesar de que la capacidad inhibitoria in vitro de la nitrendipina sobre el canal de Gardos es equivalente al clotrimazol(28), existe escasa experiencia clínica en el uso de calcio antagonistas en pacientes con anemia drepanocítica. Rodgers, et al, emplearon nifedipina en 11 pacientes drepanocíticos, clínicamente estables, sin transfusiones en 4 meses previos. En forma gradual recibieron la droga a 10 mg/día, luego 10 mg c/8 horas y de acuerdo a respuesta se llevó a 60 mg/día, durante 5 días. El 80% de los pacientes toleró mas de 60 mg/día. Un grupo control con 10 sujetos no fueron tratados. En ese período se observó reducción significativa en la bilirrubina indirecta y hemoglobina plasmática, aunado a mejoría en la perfusión retiniana y conjuntival, así como en la visión a color. Curiosamente, los autores atribuyeron estos hallazgos a efectos vasodilatadores de la droga(29).

La única experiencia con nitrendipina fue un estudio abierto con 7 pacientes drepanocíticos, que recibieron la droga a razón de 10 mg/día durante una semana y luego a 20 mg/día por 5 semanas más. La nitrendipina falló en producir mejoría significativa en parámetros reológicos in vitro y en algunos marcadores de hemólisis paraclínicos. No se investigó la evolución clínica en el estudio(30). Este resultado se atribuyó al perfil farmacocinético de la droga, con absorción oral superior al 95%, un elevado metabolismo de 1er paso, una biodisponibilidad absoluta cerca del 25% y elevada unión a proteínas plasmáticas. La toma de nitrendipina en dosis de 10 a 20 mg, genera niveles séricos 0.01 y 0.1, que equivale al rango terapéutico como antihipertensivo(31).

Siendo la nitrendipina una droga con alta capacidad inhibitoria del canal de Gardos in vitro, es necesario plantear las siguientes interrogantes: ¿Es realmente capaz la nitrendipina de evitar la deshidratación celular y la consecuente formación de drepanocitos irreversibles in vivo, empleándose a dosis mayores?; además ¿Es esta droga útil en el control de las manifestaciones clínicas vaso-oclusivas y los procesos de hemólisis en pacientes con anemia drepanocítica, utilizándose a dosis mayores?. Por esta razón, considerando la farmacocinética lineal de la droga decidimos realizar un estudio clínico controlado contra placebo empleando dosis mayores de nitrendipina, dado que el bloqueo del canal de Gardos debe lograrse con niveles séricos superiores al rango antihipertensivo.

La nitrendipina ha sido empleada con seguridad en pacientes sanos, normotensos, durante estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos, en dosis entre 20 y 40 mg/día, con una excelente tolerancia. Solo 5% presentó cefaleas y palpitaciones leves que no obligan a suspender el tratamiento(31,32, 33), incluso la forma racémica se ha empleado en dosis hasta de 80 mg/día, sin observarse efectos adversos significativos(34). La experiencia clínica en pacientes normotensos, asmáticos(35) y con EBPOC, nos dio confianza para realizar este protocolo en pacientes drepanocíticos, que son por lo general normotensos.

## **POBLACIÓN Y MÉTODOS**

Fueron seleccionados 31 pacientes del Banco Municipal de Sangre del Distrito Federal y el servicio de Hematología del Hospital Universitario de Caracas, siendo elegibles para integrar el estudio. Del grupo inicial de treinta y un pacientes, 26 eran drepanocíticos (HbSS) y 5 casos presentaban síndrome drepanocítico Hb SC. Al final del estudio se excluyeron 4 pacientes por incumplimiento de protocolo y uno por farmacodependencia. Todos eran adultos con edades entre 16 y 48 años (media de  $26 \pm 8.1$ ), 10 de sexo masculino y 16 de sexo femenino. En todos los casos el diagnóstico estaba confirmado por electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa a pH 8.6 y gel de agar a pH 6.4, acompañados de prueba de solubilidad en buffer de alto contenido de fosfato, niveles de Hb A2 y determinación de hemoglobina fetal por los métodos tradicionales. En tres casos se confirmó Hb SC y en 23 Hb SS.

No fueron incluidos pacientes menores de 16 años, mujeres embarazadas o en la lactancia, evidencia reciente de procesos infecciosos (< de una semana de evolución), transfusiones de concentrados globulares en los últimos 3 meses previos al estudio, insuficiencia cardíaca congestiva y/o uso de drogas vasodilatadoras, hipotensión ortostática, tensión arterial diastólica menor de 60 mm de Hg, alergia a las dihidropiridinas y pacientes bajo tratamiento con hidroxurea, eritropoyetina, derivados del butirato, L-carnitina, nifedipina y clotrimazol. También se excluyeron pacientes con farmacodependencia y/o drogadicción.

El estudio se realizó bajo protocolo clínico controlado con placebo, aleatorio, en simple ciego, con grupos en paralelo, bajo dos niveles de dosis, durante diez semanas, donde los pacientes fueron designados al azar para conformar tres grupos: • Grupo con nitrendipina 20 mg/día, • Grupo con nitrendipina 30 mg/día y • Grupo Placebo. El grupo que recibió nitrendipina a 20 mg/día fue integrado por 9 pacientes, que inicialmente

recibieron tabletas de nitrendipina de 10 mg, V.O una vez al día (9:00 am), durante 7 días. Luego se aumentó la dosis a 10 mg cada 12 horas (20 mg/día) desde la segunda a la décima semana. El grupo de nitrendipina a 30 mg/día, incluyó 8 pacientes que recibieron 10 mg/día (9:00 am), en la primera semana, luego 10 mg cada 12 horas (20 mg/día) en la segunda semana y 10 mg cada 8 horas (30 mg/día) de la tercera a la décima semana. El grupo placebo recibió un esquema similar al grupo de tratamiento, con tabletas idénticas que solo contenían excipientes.

El esquema de dosificación progresiva se diseñó para mejorar la tolerancia en pacientes anémicos ante fármacos vasodilatadores. El diseño en protocolo simple ciego, facilitaría la vigilancia y seguimiento de pacientes de riesgo de un estudio clínico fase I. Luego de la distribución al azar en los tres grupos, se presentó un mayor número de mujeres en el grupo placebo y proporciones equivalentes en los grupos de tratamiento, no apreciándose diferencia estadísticamente significativa en la edad de los pacientes ( $p < 0.05$ ). En la evaluación clínica basal, se encontraron tres pacientes con elevada morbilidad en el grupo de tratamiento con 30 mg, que presentaban crisis vasooclusivas severas con 2 a 3 hospitalizaciones al año, mientras que el resto de la muestra estaba conformada por pacientes de baja morbilidad, con crisis de baja intensidad, ameritando una hospitalización o menos al año(36).

Antes de iniciar el protocolo, se realizó una valoración cardiovascular con Rx de tórax y E.K.G, historia clínica detallada en antecedentes y patrón clínico de morbilidad (hepatitis viral, frecuencia y severidad de eventos vaso-oclusivos, número de hospitalizaciones al año, consultas a facultativos y consumo de analgésicos. En la semana 0 se realizó evaluación basal de laboratorio que incluyó hematología completa con sistema COULTER STKS / ANA, (Coulter Corporation, Hialeah, Fl) reseñando los parámetros hematimetricosn (Hb, Hto, VCM, CHCM), porcentaje de reticulocitos absoluto y corregido en laminas de azul brillante de cresil. Bioquímica sanguínea con deshidrogenasa láctica, transaminasas, urea, creatinina bilirrubina total y fraccionada; utilizando equipo Express-Plus (Ciba-Corning Diagnostic Corporation, Medfield, MA) y reactivos de Chiron Diagnostics Corporation (East Walpole, MA).

Se realizaron evaluaciones semanales durante el primer mes, luego quincenales, hasta completar la semana 10 del estudio. En cada evaluación se registró el número de eventos vaso-oclusivos menores y mayores de cada semana del estudio, indicando la fecha y naturaleza del evento ya sea un síndrome doloroso, síndrome torácico agudo, etc. En cada episodio se especificó la intensidad bajo una escala visual análoga, donde se precisó la necesidad de analgesia, consulta a facultativos y/u hospitalización. En dicha escala los valores del 1 al 3 se correspondieron a dolor de baja intensidad que no ameritó consulta a facultativos y es resuelto con analgesia ambulatoria, siendo el #1, el dolor de menor intensidad. Los valores del 4 al 7 equivalen a dolor de mayor intensidad que si amerita consulta a médicos tratantes, para la administración de analgesia oral o endovenosa, aunado a hidratación parenteral ambulatoria sin requerir hospitalización. Los valores en la escala del 8 al 10, corresponden a eventos vaso-oclusivos de intensidad tope que requieren hospitalización, donde el #10 equivale al evento de mayor intensidad experimentado por ese paciente. Escalas semejantes a ésta han sido empleadas en el pasado por otros autores(37,38). Solo se registraron en las evaluaciones el número de consultas a médicos tratantes y de hospitalizaciones por causas relacionadas a la enfermedad de base, ya sea crisis dolorosas y/o hemolíticas; no incluyéndose los procesos infecciosos sin eventos vaso-oclusivos asociados.

También se registró semanalmente la frecuencia cardíaca y presión arterial (en posición decúbito dorsal), así como reporte completo de efectos adversos relacionados a la nitrendipina, estableciendo índice de tolerancia. Es importante señalar que la mayoría de los parámetros basales de laboratorio de cada grupo no presentaron diferencias estadísticamente significativas, con la excepción del % de reticulocitos en el grupo de nitrendipina 20 mg/día, con cifras inferiores en relación al grupo placebo y nitrendipina 30 mg/día ( $p < 0.05$ ). Además, en la bilirrubina indirecta y TGP se apreciaron discretas tendencias ( $p = 0.08$ ), sin alcanzar significancia estadística.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el sistema de software Graph PAD InSTAT 1989, versión 1.0 de H. Mothlsky; empleándose método ANOVA de una sola vía en la comparación de medias de los tres grupos por método. El tamaño de la muestra planteó la inclusión de un mínimo de 10 pacientes por grupo, para un total de 30 casos, lo cual se definió en base a un nivel a de 0.05 y un nivel b de 0.20, con un poder de la muestra de 0.80, como es convencionalmente aceptado. También se utilizó sistema SPSS versión V, adaptada para estudiantes (released 6.0.1; October 21. 1991), para los análisis de test de Student (*t* test) en la comparación de medias de muestras pareadas en datos de laboratorio basal vs final de cada grupo, estableciendo nivel de significancia estadística con  $p$  menor de 0.05.

## RESULTADOS

De los 31 pacientes del grupo inicial, fueron excluidos 5 pacientes, uno por farmacodependencia a agentes opiáceos, dos por no acudir a las citas programadas y dos por no cumplir tratamiento. Finalmente los grupos se conformaron con 9 casos en el grupo placebo, 9 en el grupo de nitrendipina a 20 mg/día y 8 en el grupo de nitrendipina a 30 mg/día. En el aspecto clínico, la frecuencia de eventos vaso-oclusivos de los grupos en 10 semanas, indica una mayor frecuencia de episodios en el grupo placebo, con un total de 15 eventos y una media de eventos / caso de  $1.66 \pm 2.12$ , donde el 55,5% (5 casos) de los pacientes presentó al menos un evento. La media en intensidad de eventos (escala EVA) fue de  $3,53 \pm 1,30$  puntos. Esta frecuencia fue superior a la observada en ambos grupos de tratamiento, dado que el grupo que recibió 20 mg/día presentó un total de 5 eventos, con una media de eventos por caso de  $0.55 \pm 1.01$ , siendo afectados un 33,3% (3 casos) de los pacientes, por al menos una crisis. Se registró una media de intensidad en escala EVA de  $3,8 \pm 1,30$  puntos. Se debe señalar que 4 de los 5 eventos ocurrieron en las 2 primeras semanas del estudio, en la fase de aumento de dosis. En el grupo que recibió 30 mg/día ocurrieron 4 eventos, con una media de evento / caso de  $0.50 \pm 0.75$ , siendo afectados un 37,5% (3 pacientes) de los pacientes por al menos un evento, la media en escala intensidad fue  $6 \pm 3,1$  puntos. En este grupo se produjeron dos eventos con la mayor intensidad, siendo de 8 y 9 puntos respectivamente, requiriéndose en ambos casos la hospitalización de los pacientes.

No obstante, la comparación en las medias de eventos por paciente de los tres grupos (ANOVA, una vía) mostró tendencia a una mayor frecuencia de eventos del grupo placebo, pero sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $f = 1.81$ ;  $p = 0,18$ ). Por otro lado, el análisis en las medias de intensidad de eventos, tampoco demostró una diferencia significativa en los grupos ( $f = 3.37$ ;  $p = 0.053$ ), aunque fue evidente la tendencia a una mayor media de intensidad en el grupo tratado con nitrendipina a 30 mg/día. Tampoco hubo diferencias en la frecuencia de consultas a facultativos entre los tres grupos.

En relación a variables paraclínicas, se tomaron puntos de corte en las semanas 4, 8 y 10. El análisis estadístico (ANOVA, una vía), de los niveles de hemoglobina en los tres grupos no evidenció diferencia significativa durante la semana 4 ( $p = 0.36$ ), semana 8 ( $p = 0.62$ ) y semana 10 ( $p = 0.32$ ). Resultados semejantes se observaron en valores de hematocrito ( $p = 0.55$ ,  $p = 0.51$  y  $p = 0.54$ , respectivamente) y concentración de hemoglobina corpuscular media ( $p > 0.8$ ,  $p = 0.55$  y  $p = 0.35$ , respectivamente). La comparación de los niveles basales de Hb, Hto y CHCM con relación a los valores finales del estudio en cada grupo, tampoco demostró una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ;  $t$  test, doble cola).

En el parámetro de reticulocitos corregidos, se determinó un menor porcentaje en la evaluación basal del grupo con nitrendipina a 20 mg/día ( $7.55 \pm 2.86$ ), en comparación al grupo placebo y al grupo de 30 mg ( $11.54 \pm 5.46$  y  $15.83 \pm 4.10$ , respectivamente,  $p = 0.0024$ ). Sin embargo, en las evaluaciones sucesivas se pudo observar un descenso notable en el % de reticulocitos del grupo a 20 mg/día, siendo aun mayor en la semana 8 y 10, manteniendo diferencia muy significativa con respecto a los otros grupos ( $p < 0.0001$ ). En este sentido, se tomó en cuenta el valor bajo inicial de reticulocitos de ese grupo, porque se comparó el % de reticulocitos en la semana 0 vs semana 10 del grupo con nitrendipina a 20 mg/día, detectándose diferencia significativa ( $p < 0.001$ ).

Igualmente, en el grupo tratado con 30 mg/día, se observó descenso en el % reticulocitos, que no fue tan marcado como en el otro grupo, pero mostró diferencia significativa en la comparación de valores basales vs finales ( $p = 0.009$ ;  $t$  test, doble cola). En el grupo placebo se observó discreto descenso en % de reticulocitos, que no alcanzó significancia estadística ( $p = 0.103$ ). Sin embargo, la comparación intergrupo de los valores de reticulocitos en el grupo placebo y de tratamiento con 30 mg/día, no evidenció diferencia en ninguna semana del estudio ( $p > 0.05$ , ANOVA de una vía). La comparación intergrupo en LDH sérica, no demostró diferencias en las evaluaciones de la semana 0, 4, 8 y 10 ( $p > 0.8$ ; ANOVA de una vía). En la comparación intragrupo se apreció discreta disminución en LDH del grupo placebo y de tratamiento con 30 mg/día, observándose descenso más pronunciado en el grupo de 20 mg de nitrendipina al día. En ninguno de los tres grupos se observó una diferencia notable al comparar valores basales en relación a finales. ( $p > 0.05$ ,  $t$  test, doble cola).

Con respecto a la bilirrubina indirecta, se registraron valores basales equivalentes en los tres grupos. Posteriormente se observó descenso paulatino en la BI de los tres grupos que fue más significativo en el grupo de tratamiento con 30 mg/día y en menor grado en el grupo de 20 mg/día. De hecho, en la octava y sexta semana del protocolo se apreciaron niveles significativamente inferiores en el grupo de nitrendipina a 30 mg/día, con relación a los otros dos grupos ( $p < 0.0001$ ). Sin embargo, en la comparación basal vs final del grupo de 30 mg/día, se observó también un descenso no significativo ( $p = 0.32$ ). En el análisis de los valores basales frente a los finales del grupo de nitrendipina a 20 mg/día, se apreció notable descenso en cifras de bilirrubina indirecta, estableciendo diferencia intragrupal ( $p < 0.006$   $t$  test, doble cola), pero no intergrupala ( $p < 0.05$ ; ANOVA). Este fenómeno no se produjo en el grupo placebo ( $p = 0.066$ ). Los niveles de bilirrubina directa, no mostraron modificaciones en ningún grupo durante el estudio, en análisis intragrupo o intergrupo ( $p > 0.05$ ).

En la tabulación de tolerabilidad se encontró en el grupo de nitrendipina a 20 mg/día una frecuencia de efectos adversos en 66% (6 de 9 casos) de los pacientes, con un total



de 23 eventos y una media de 2.5 eventos por caso. Datos semejantes se registraron en el grupo con nitrendipina a 30 mg/día, en 75% (6 de 8 casos) de los casos. El síntoma más comúnmente reportado fue la cefalea con 43.4 y 75% (respectivamente), palpitaciones 21,7%, mareos 8.6 y 10% (respectivamente), somnolencia 10% y rubor facial 8.6%). En menor grado se observó temblores, náuseas, edemas y congestión nasal, todos con un 4.3% (un evento). En general, el 65,2%(15) de los eventos fue de leve intensidad y solo el 34.7%(8) fue de intensidad moderada, en el grupo de 20 mg/día y un 85%(17) de los eventos fue de baja intensidad y el 15%(3) fue de intensidad moderada en el grupo de 30 mg/día. Pero esta frecuencia de eventos adversos en ambos grupos de tratamiento, no fue significativamente diferente a la observada en el grupo placebo, ya que un 77.7% (7 de 9 casos) de los pacientes reportó eventos adversos con un total de 37, siendo más común la cefalea con 54% (20 eventos), luego mareos y somnolencia con un 13.5%(5), seguido de náuseas 8.1%(3), hipotensión y rubor facial 5.4% (2 eventos). El 64.8%(24) de los eventos fue de intensidad leve y el 35.14% fue de intensidad moderada(13).

En cuanto a la presión arterial del grupo tratado con nitrendipina a 20 mg/día, no se registraron variaciones significativas en las cifras de presión arterial sistólica y diastólica, en ningún momento del protocolo ( $p > 0.05$ ). Patrón similar se apreció en el grupo tratado con 30 mg/día, donde las cifras de presión arterial diastólica no mostraron fluctuaciones significativas cuando se compararon los valores basales contra los finales ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, las cifras de presión arterial sistólica registraron un descenso de 9 mm de Hg (promedio) al compararse cifras basales vs finales ( $p = 0.004$ ). Curiosamente, se observó en el grupo placebo descenso discreto de la presión arterial sistólica en la semana 6 y 8 con respecto a valores basales ( $p > 0.05$ ), pero sí fue significativamente menor en la semana 10 ( $p = 0.035$ ). Por el contrario, en la presión arterial diastólica del grupo placebo presentó importante aumento en las 2 semanas finales del estudio ( $p > 0.0001$ ). Con relación a la frecuencia cardíaca, las cifras basales y finales de cada grupo fueron equivalentes en los tres grupos ( $p > 0.05$ ). En la evaluación de laboratorio, se pudo comprobar que la nitrendipina no produjo modificaciones en los niveles de aminotransferasas (TGO y TGP), así como tampoco, en las cifras de urea y creatinina en ningún momento de los grupos estudiados ( $p > 0.05$ ).

## **DISCUSIÓN**

En el análisis de los resultados en este protocolo deben considerarse aspectos relativos a la anemia drepanocítica, la cual posee una gran variabilidad de expresiones clínicas y paraclínicas que están determinadas genéticamente, estas manifestaciones que son expresión de un proceso vaso-oclusivo, pueden tener un patrón diferente de paciente a paciente(39). De hecho, en datos obtenidos del grupo cooperativo de estudio de la enfermedad de células falciformes, con más de 3500 casos evaluados, evidenció una frecuencia de crisis vaso-oclusivas dolorosas en pacientes Hb-SS de 0.8 crisis/paciente/año; en sujetos Hb SC de 0.4 episodios/ paciente/año y en sujetos Hb Sb0 ta1, presentaron 1 episodio/paciente/año. No obstante, 39% de los pacientes de ese grupo no presentaron crisis, contrastando con una minoría del 1% que presentó hasta 6 eventos al año. También hubo una mayor incidencia de eventos entre los 5 y 30 años de edad, con alta correlación entre el número de crisis vaso-oclusivas y la mortalidad(36).

A ésto debemos agregar que tradicionalmente ha existido una carencia de criterios objetivos para evaluar las crisis vaso-oclusivas, en términos de intensidad, duración e incluso frecuencia de eventos, lo cual ha constituido un gran impedimento en la investigación de estrategias terapéuticas en crisis dolorosas(40). Este aspecto es de particular importancia, dado que la definición de crisis vaso-oclusivas ha sido muy discutida(41). En nuestro estudio se utilizó una escala visual análoga (EVA) para estudiar la intensidad de los eventos vaso- oclusivos mayores o menores, con criterios de puntuación bien establecidos en base a la necesidad de analgesia oral o parenteral, consulta o no a su médico tratante, con eventual necesidad de hospitalización o atención en salas de emergencia en forma ambulatoria, que representan un grupo importante de casos. Escalas semejantes, compartiendo los mismos criterios, han sido utilizadas en experiencias previas con drepanocitosis(37,38), siendo además aceptadas en estudios clínicos controlados fase II y fase III para evaluar procesos dolorosos de cualquier etiología.

En otras experiencias que investigaron la frecuencia y severidad de eventos vaso-oclusivos en drepanocíticos adultos, se determinó que hasta un 63% de los eventos no requieren hospitalización, siendo un 33% de corta duración (de 2 a 48 horas), donde más del 20% de los casos duraron menos de 24 horas. También, se comprobó que los eventos "menores" se relacionaron notablemente a clima frío e infecciones(37). Adicionalmente se planteó la presencia de reactantes de fase aguda en el estado estable de pacientes drepanocíticos, que sugirieren presencia proceso inflamatorio de bajo grado, en el contexto de episodios isquémicos subclínicos(42).

Todas estas consideraciones, justifican la investigación a fondo de los aspectos clínicos en protocolos con medicamentos empleados para modificar la historia natural de la enfermedad. En nuestro estudio se observó un menor número de eventos vaso-oclusivos de baja intensidad (puntuación EVA del 1 al 6) en los grupos de tratamiento con nitrendipina a 20 y 30 mg/día, con relación al grupo placebo (5 y 4 eventos respectivamente, vs 15). que en el análisis estadístico no estableció diferencia significativa entre las frecuencias medias de eventos por paciente de los grupos.

Hallazgo similar se observó en el análisis de medias de intensidad, donde tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa, a pesar de una tendencia a favor de mayor intensidad media del grupo con nitrendipina a 30 mg/día ( $6 \pm 3.1$ ). Estos resultados deben evaluarse con sentido crítico, considerándose cuatro factores. El primero dado por el tamaño de la muestra, donde en muestras pequeñas, inevitablemente se debilita el poder estadístico imposibilitan captar pequeñas modificaciones en los grupos, por lo cual se plantea el empleo un número mayor de casos.

El segundo factor está determinado por la distribución heterogénea de los patrones de morbilidad de los tres grupos, donde el grupo placebo y el grupo tratado con nitrendipina a 20 mg/día presentaban pacientes con muy baja morbilidad, incluso con casos que no han presentado crisis vaso-oclusivas en años. Pero en cambio, en el grupo tratado con nitrendipina a 30 mg/día, estaban incluidos tres casos de muy alta morbilidad; de hecho, 2 de los 4 eventos registrados en ese grupo presentaron la intensidad más elevada (8 y 9 pts, respectivamente), requiriéndose incluso la hospitalización de esos casos. Aunque debe recordarse que no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las medias de intensidad de eventos en los tres grupos. En todo caso, es necesaria una distribución más homogénea

de los patrones de morbilidad entre los grupos a estudiarse. Un tercer elemento lo constituye la duración del estudio, ya que en un protocolo clínico con pacientes de anemia drepanocítica, con baja frecuencia de eventos anuales, es imprescindible una evaluación durante largos períodos, un año como mínimo. El protocolo fue de 10 semanas, lo cual permitió un muestreo limitado de eventos, aunque en un estudio piloto controlado con placebo, las tendencias observadas en los resultados son útiles en la planificación de futuros estudios.

El cuarto factor se relaciona a cuadros infecciosos intercurrentes en los pacientes evaluados; de hecho, en el grupo con nitrendipina a 30 mg/día, se demostró una infección entérica por *Shigella* ssp en un caso. Debe recordarse que los pacientes drepanocíticos poseen elevada predisposición a infecciones(36,37,43), por lo cual debería incorporarse esta variable en el análisis de protocolos mas prolongados, en forma de análisis multivariado.

En las variables paraclínicas, se presenta la misma situación planteada anteriormente, dado que varios parámetros han sido propuestos en la evaluación y seguimiento de pacientes drepanocíticos y que además puedan monitorizar la actividad terapéutica de un agente en particular(40). En este sentido, se empleó el conteo de drepanocitos irreversibles (ISCs), el % de células densas, aspectos hematimétricos como: amplitud de distribución eritrocitaria (ADE), amplitud de distribución de hemoglobina (ADH), Volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), niveles séricos de deshidrogenasa láctica, mioglobina y creatina fosfoquinasa, así como otros índices de destrucción globular y/o tisular. Algunos estudios hacen énfasis en pruebas reológicas como ektacitometría, determinación de viscosidad sanguínea, flujo sanguíneo localizado con velocimetría doppler láser, RMN, etc(40). Inicialmente se prestó gran interés al % de células densas para el monitoreo de enfermedad, pero evidencias actuales indican que el % de células densas durante la fase de estado estable, no predice la incidencia de crisis dolorosas, ni son indicadores de severidad de la enfermedad, lo que indica participación de otros fenómenos a nivel de microcirculación(44). Solo es de utilidad el descenso intracrisis vasoclusiva del conteo para predecir un futuro evento en la mitad de los casos(45,46). Estas pruebas en general tienen un valor potencial y solo se han utilizado en estudios con muestras pequeñas, siendo además costosas y muy complicadas(47).

Con respecto a la concentración de hemoglobina corpuscular media y la proporción de células densas, algunos autores han señalado una correlación positiva débil ( $p < 0.001$ ,  $r^2 < 0.20$ )(45,48). Así como también, una correlación positiva significativa entre la amplitud de distribución de hemoglobina y el porcentaje de células densas ( $p < 0.001$ ,  $r^2 < 0.48$ )(45). Por esta razón, los parámetros antes mencionados se consideran indicadores de hidratación globular, que son pertinentes en un protocolo con nitrendipina. En estudios con hidroxiurea se ha demostrado un aumento en el volumen corpuscular medio, que ocurre a expensas del aumento en hemoglobina fetal y por ende del agua intraglobular(49).

En la evaluación de parámetros de laboratorio en nuestro estudio, consideramos el lapso de diez semanas como suficiente para demostrar cambios en los aspectos hematimétricos. Este razonamiento parte del mecanismo de acción de fármacos con inhibición del canal de Gardos(25) y en la fisiopatología de la anemia drepanocítica, donde la vida media globular del drepanocito irreversible es notablemente más corta con

relación a sujetos normales, permaneciendo pocos días en la circulación sistémica(50). En el estudio no se registraron variaciones estadísticamente significativas en los niveles de hemoglobina y hematocrito, cuando fueron comparados ambos grupos de tratamiento con el grupo placebo y los niveles iniciales de Hb y Hto de cada grupo frente a los resultados finales. Estos resultados no reproducen los incrementos de hemoglobina y hematocrito evidenciados con el clotrimazol en estudios de farmacodinamia experimental de ratones transgénicos SAD(23) y en pacientes con anemia drepanocítica(25). Pero debe aclararse que la única experiencia en humanos con la enfermedad fue un estudio abierto de solo cinco pacientes, donde no se precisó grado de morbilidad, ni niveles basales de hemoglobina fetal.

En el contexto clínico de factores de riesgo para crisis vaso-oclusivas se determinó que aumentos del hematocrito con bajos niveles de hemoglobina fetal se asocian con un incremento en la frecuencia de crisis vaso-oclusivas, por lo que el verdadero beneficio clínico quizás resida en mantener niveles estables de hemoglobina y hematocrito, con una reducción significativa de las demandas transfusionales, tal como lo demostró la hidroxiurea en un estudio clínico controlado con placebo, donde se evidenció un aumento neto de la hemoglobina fetal, manteniendo niveles relativamente estables del hematocrito(51).

La CHCM no mostró cambios en los grupos en ninguna fase del estudio, pero debe destacarse que los valores medios de CHCM de los tres grupos, tanto al comienzo como al final del estudio, oscilaron entre  $31.9 \pm 2.62$  y  $33.9 \pm 3.18$  gr/dl, los cuales no difieren significativamente de los registrados en sujetos sanos; además todas las muestras se tomaron en el estado estable de un grupo con predominio de individuos de baja morbilidad. Con respecto al conteo de reticulocitos corregido, se pudo observar en niveles basales de los grupos que existía un % significativamente menor en el que fue tratado con 20 mg/día con respecto a los otros dos grupos ( $p = 0.0024$ ), no obstante, en determinaciones siguientes se apreció un descenso aun mayor en el % de reticulocitos, siendo la diferencia aun más significativa hacia el final del estudio ( $p < 0.0001$ ). Incluso al compararse % basal vs final, en el grupo de 20 mg/día, también existió diferencia importante ( $p < 0.001$ ). Igualmente, en el grupo con 30 mg/día, se apreció descenso en % de reticulocitos iniciales vs finales ( $15.9 \pm 4.1$  vs  $13.1 \pm 3.7$ ), que fue significativo ( $p = 0.009$ ). En el grupo placebo no hubo modificaciones. La variación en el grado de disminución del % medio de reticulocitos del grupo de nitrendipina a 20 mg/día con relación al tratado con 30 mg/día, podría estar en relación con diferencias en categorías de morbilidad observadas en los grupos, a pesar de haber suministrado dosis mayores en este último.

En ambos grupos de tratamiento se registró descenso considerable en valores de bilirrubina indirecta. De hecho, al comparar cifras de la semana 0 vs semana 10, se alcanzó diferencia significativa en el grupo con 20 mg/día ( $p = 0.006$ ) y una clara tendencia en el grupo tratado con nitrendipina a 30 mg/día. Sin embargo, en este último se registraron valores significativamente inferiores con relación a los observados en el grupo placebo y el grupo de 20 mg/día, siendo mas evidente desde la semana 8. En el grupo placebo solo se registró discreto descenso no significativo. Debe recordarse que en estudios sobre la farmacocinética y el metabolismo de la nitrendipina no se señalan propiedades inductoras del metabolismo en este fármaco, o sea, no hay efectos sobre enzimas del citocromo p450(52,53); a diferencia del clotrimazol, que si es un reconocido inductor del metabolismo, en cuyo caso los cambios en la concentración de

bilirrubina indirecta podrían cuestionarse(54). Los cambios en el % de reticulocitos corregidos y niveles de bilirrubina indirecta, sugieren una mejoría en los parámetros de hemólisis posiblemente relacionada al bloqueo del canal de Gardos, aunque llama la atención, la poca modificación en los niveles séricos de deshidrogenasa láctica de los grupos con nitrendipina ( $p > 0.05$ ).

Con respecto a los efectos adversos, un 66% y 75% de los pacientes reportaron eventos adversos en los grupos tratados con nitrendipina a 20 y 30 mg/día, respectivamente, pero estas frecuencias no difirieron significativamente de la reportada en el grupo placebo (77.7%,  $p > 0.05$ ). Además entre el 64 y 85% de los eventos adversos en los grupos fueron de leve intensidad, no requiriéndose la suspensión de la nitrendipina en ningún paciente. No así ocurrió en el grupo placebo, donde un paciente se retiró por intolerancia. El tipo de evento más comúnmente reportado fue la cefalea, seguido de mareos, palpitaciones y rubor facial. Esto sugiere una buena tolerancia del agente, como ha sido descrito en reportes anteriores(55). El resto de las evaluaciones no reportaron cambios importantes durante el estudio en ningún grupo.

Las modificaciones en variables de laboratorio como el conteo de reticulocitos y niveles de bilirrubina indirecta, así como una tendencia a una menor frecuencia de eventos vaso-oclusivos menores luego de la administración oral de nitrendipina en pacientes con anemia drepanocítica, plantea un potencial terapéutico de medicamentos capaces de disminuir la pérdida de potasio y agua intraglobular dependiente del canal de Gardos. No obstante, las propiedades terapéuticas a largo plazo y algunos parámetros de laboratorio, no pudieron ser exploradas por las condiciones ya comentadas, lo cual deja interrogantes, sobre todo en el contexto de un fármaco con limitaciones conocidas en el área farmacocinética, dado por la biodisponibilidad de la nitrendipina (alrededor del 25%) que está en relación al metabolismo de primer paso hepático, de carácter no saturable, incluso a dosis de 120 mg/día(53). Esto podría limitar el mantener niveles plasmáticos en rango terapéutico para bloqueo en canal de Gardos, lo cual podría limitar la efectividad terapéutica de este medicamento.

En todo caso para poder comprobar la verdadera efectividad terapéutica de fármacos como la nitrendipina o cualquier otro agente capaz de bloquear el canal de Gardos, es imprescindible llevar a cabo más estudios clínicos controlados contra placebo, en doble ciego, con un número significativo de pacientes que presenten categorías de morbilidad uniformemente distribuidas, y realizado durante un período no menor de un año. Practicándose monitoreo terapéutico por escalas clínicas estandarizadas y métodos de laboratorio que incluyan pruebas reológicas, deformabilidad globular y medición de cationes intraglobulares que sean revisadas y aceptadas por comités internacionales, además realizando ensayos comparativos en monoterapia o protocolos con combinaciones de nitrendipina + hidroxiurea u agentes en investigación como el pidolato de magnesio, que es capaz de bloquear el sistema de Cotransporte  $K^+-Cl^-$ (56). En un futuro deberán incorporar ensayos con nuevas opciones terapéuticas que exploran las nuevas fronteras en la fisiopatología de esta enfermedad, tal como lo es la interacción con óxido nítrico(57) y la arginina, que se han planteado sobre la base de mecanismos de disfunción endotelial y las interacciones de célula a célula.

## **CONCLUSIONES**

En los grupos tratados con nitrendipina se observó una tendencia hacia una menor frecuencia de eventos vaso-oclusivos menores con respecto al grupo placebo, observándose una menor proporción de pacientes afectados; sin embargo, la media de eventos por paciente de cada grupo, no demostró una diferencia estadísticamente significativa.

La nitrendipina administrada a 20 mg/día produjo una reducción significativa en el conteo de reticulocitos corregidos al realizar la comparación intragrupo e intergrupo. Igualmente, en el grupo tratado con nitrendipina a 30 mg/día también se produjo una reducción significativa en el conteo de reticulocitos basales con respecto a los valores finales, pero en la comparación intergrupo no se apreció diferencia significativa. En el grupo placebo no se produjo modificación importante. La concentración de bilirrubina indirecta disminuyó en forma significativa en el grupo tratado con nitrendipina a 20 mg/día cuando se compararon los valores basales vs finales. En el grupo tratado con nitrendipina a 30 mg/día se evidenció también una reducción en los niveles de bilirrubina indirecta con diferencia significativa en comparación intergrupo desde la semana 8 del tratamiento. El descenso en el grupo placebo no fue significativo.

No se observaron diferencias en los parámetros de Hb, Hto, CHCM ni LDH en ninguno de los grupos durante el estudio. El potencial papel terapéutico de la nitrendipina en el tratamiento de la anemia drepanocítica necesita ser confirmado en nuevos protocolos clínicos controlados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T. Williams Hematology. Fifth Edition. Mac Graw- Hill international. 1995; 616-650.
2. Bunn F, Epstein F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N Engl J Med. 1997; 337(11): 762-769.
3. Brugnara C, Armsby C, Sakamoto M, Rifal N, Platt A, Platt O. Oral administration of clotrimazol and blockade of human erythrocytes  $Ca^{++}$ -activated  $K^{+}$  channel; The imidazole ring is not required for inhibitory activity. J Pharmacol Exp Therap. 1994; 273(1): 266-272.
4. Charache S. Hydroxyurea as treatment for sickle cell anemia. Hematology/Oncology Clinic of North America. 1991; 5(3): 571-596.
5. McDonagh K, Dover G, Donahue R, Nathan D, Agricola B, Byrne E, Nienhuis A. Hydroxyurea induced HbF production in anemic primates: augmentation by erythropoietin growth factors and sodium butyrate. Exp. hematol. 1992; 20: 1156-1164.
6. Perrine S, Olivieri N, Faller D, Vichinsky E, Dover G, Ginder G. Butyrate Derivatives. New agents for stimulating fetal globin production in b-Globin disorders. Am J. Pediat Hematol/Oncol. 1994; 16(1): 67-71.

7. Perrine S, Faller D. Butyrate-induced reactivation of fetal globin genes: A molecular treatment for the  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Am J Pediat Hematol/Oncol*. 1993; 49: 133-137.
8. Loukopoulos D. New therapies for haemoglobinopathies. *J Int Med*. 1997; 242(Suppl 7-10): 43-48.
9. Brugnara C. Erythrocyte membrane transport physiology. *Curr Opin Hematol*. 1997; 4: 122-127.
10. Maridonneau-Parini I. Effect de la Trimétazidine sur les alterations membranaires induites par les radicaux libres oxygénés dans les globules rouges humains. *La Presse Médicale*. 1986; 15(35): 1762-1764.
11. Garay R, Nazaret C, Diez J, Etienne A, Bourgain R, Braquet P. Stimulation of  $K^+$  fluxes by diuretics drugs in human red cells. *Biochem Pharmacol*. 1984; 33(13): 2013-2020.
12. Orringer E. A further characterization of the selective  $K$  movements observed in human red blood cells following acetylphenylhydrazine. *Am J Hematol*. 1984; 16: 355-366.
13. Jensen BS, Strobaek D, Christophersen P, Jorgensen DT, Hansen C, Silahatoglu A. Characterization of the cloned human intermediate-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel. *Am J Physiology*. 1998; 275(44): C848-C856.
14. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta*. 1958; 30: 653-654.
15. Halperin JA, Brugnara C, Nicholson-Weller A.  $Ca^{++}$  activated efflux limits complement mediated lysis of human erythrocytes. *J Clin Invest*. 1989; 83: 1466-1477.
16. Li Q, Jungmann V, Kiyatkin A, Lowt P. Prostaglandin  $E_2$  stimulates a  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability. *J Bio Chem*. 1996; 271(31): 18651-18655.
17. Dodson R, Hinds T, Vincenzi F. Effects of calcium and A23187 on deformability and volume of human red blood cell. *Blood Cells*. 1987; 12: 555-561.
18. Ortiz O, Lew V, Bookchin R. Calcium accumulated by sickle cell disease anemia does not affect their potassium ( $^{86}Rb$ ) flux components. *Blood*. 1986; 67(3): 710-715.
19. Berkowitz L, Orringer E. An analysis of the Mechanism by which cetedil inhibits the Gardos phenomenon. *Am J Hematol*. 1984; 17: 217-223.

20. Brugnara C, De Franceschi L, Alper SL. Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> transport in the erythrocytes. Comparison of Binding and inhibition by scorpion toxins. *J Bio Chem.* 1993; 268(12): 8760-8768.
21. Brugnara C, De Franceschi L, Alper SL. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> transport and cell deshidration in sickle erythrocytes by CTL and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 1993; 92: 520.
22. Coupry I, Armsby C, Alper S, Brugnara C, Parini A. Clotrimazol and efaroxan inhibit red cell Gardos channel indepently of imidazoline II y I2 binding sites. *Eur J Pharmacol.* 1996; 295: 109-112.
23. De Franceschi L, Saadane N, Trudel M, Alper S, Brugnara C, Beuzard Y. Treatment with oral clotrimazole blocks Ca<sup>2+</sup>- ativated transport and reverses erythrocytes deshidration in transgenic SAD mice. A model for therapy of sickle cel disease. *J Clin Invest.* 1994; 93: 1670-1676.
24. De Franceschi L, Rouyer-Fessard P, Alper S, Jouault H, Brugnara C, Beuzard. Combination therapy of erithropoietin, hydroxyurea and clotrimazol in a b-thalasemic mouse: A model for Human Therapy. *Blood.* 1996; 27(15): 1188-1195.
25. Brugnara C, Gee B, Arsmsby C, Kurth S, Sakamoto, Rifal N, Alper S. Therapy with oral clotrimazole induced inhibition of the Gardos Channel and reduction of erythrocytes deshydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest.* 1996; 97: 1227-1234.
26. Ellory JC, Nash GB, Stone PCW, Culliford SJ, Horwitz E Stuart J. Mode of action and comparative efficacy of pharmacological agents that inhibit calcium-dependent deshydration of sickle cell. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 106: 972-977.
27. Ellory JC, Culliford SJ, Smith PA, Wolowyk MW, Knaus EE. Specific inhibition of Ca-activated K channel in red cell by selected dihydropyridine derivatives. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 167: 219-222.
28. Stuart J, Mojiminivi BO, Stone PCW, Culliford SJ, Ellory JC. Additive in vitro effects of attisickling drugs. *Br. J. Hematol.* 1994; 86: 820-823.
29. Rodgers G, Roy M, Noguchi C, Schechter A. Is there a role for selective vasodilation in the management of sickle cell disease. *Blood.* 1988; 71(3): 597-602.
30. Nash GB, Millar B, Al saady N, Bennett ED, Evans J, Bevan DH. Nitrendipine treatment and blood rheology in patients with sickle cell disease. *Br. J. Hematol.* 1991; 78: 588-589.



31. Hansson L, Andrén L, Öro L, Ryman T. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters in patients treated with nitrendipine. *Hypertension*. 1983; 5(suppl II): II-25-II-28.
32. Soons PA, Boer AG, Van Brummelen P, Breimer DD. Oral asorption profile of nitredipine in healthy subjects: A kinetic and dinamic study. *Br. J. Clin Pharmacol*. 1989; 27 (2): 179-189.
33. Soons PA, Breimer DD. Stereoselective pharmacokinetics of oral and intravenous nitrendipine in healthy male subjetc. *Br J Clin Pharmacol*. 1991; 32(1): 11-16.
34. Mikus G, Mast V, Ratge D, Wisser H, Eichelbaum M. Stereoselectivity in cardiovascular and biochemical action of calcium antagonists: Studies with the enantiomers of the dyhidropyridine nitrendipine. *Clin Pharmacol Ther*. 1995; 57(1): 52-61.
35. Mulloy EM, Cormie P, Harvey J and Marley JE. Nitrendipine therapy in asthmatics subjetc. *Br. J. Clin Pharmacol*. 1990; 30: 493-495.
36. Platt OS, Thortington BD, Brambilla DJ, Milner P, Rosse WF, Vichinsky E and Kinney TR. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*. 1991; 325: 11-6.
37. Westerman MP, Bailey K, Freels S, Schiegel R and Williamson P. Assessment of painful episodes frecueny in sickle-cell disease. *Am J Hematol*. 1997; 54: 183-188.
38. Jacobson S, Kopecky P, Joshi P and Babul N. Randomizad trial of oral morphine for painful episodes of sickle cell disease in children. *Lancet*. 1997; 350: 1358-1361.
39. Powars D, Chan LS, Schroeder WA. The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. *Sem Hematol*. 1990; 27: 360-376.
40. Fabry ME and Kaul D. Sickle cell – vaso-occlusion. *Hemoglobinopaties. Hematology / Oncology Clinics of North America*. 1991; 5(3): 375-398.
41. Pearson HA, Whethers D, Johnson S. Pain in sickle cell disease (letter). *N Engl J Med*. 1991; 325: 1747.
42. Singhal A, Doherty JF, Raynes JG, McAdam K, Thomas P, Serjeant B, Serjeant G. Is there an acute-phase response in steady state sickle cell disease ?. *Lancet*. 1993; 341: 651-653.
43. Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J and Rodgers G. *Wintrob's Clinical Hematology*. ; 10th edition. 1998; 1: 1346-1404.

44. Billett HH, Kim K, Fabry ME, Nagel RL. The percentage of dense red cells does not predict incidence of sickle cell painful crisis. *Blood*. 1986; 68 (1): 301-3.
45. Ballas SK, Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of sickle cell painful crisis. *Blood*. 1992; 79(8): 2154-2163.
46. Ballas SK. Sickle cell anemia with few painful crisis is characterized by decreased red cell deformability and increased number of dense cells. *Am J. Hematol*. 1991; 36(2): 122-130.
47. Comunicación Personal con el Dr. Samir K Ballas del departamento de Medicina de Cardeza Foundation for Hemalogic Research. Jefferson Medical College. Thomas Jefferson University. 3 de Marzo de 1999.
48. Clark MR, Mohandas N, Embury S and Lubin B. A simple laboratory alternative to irreversibly sickled cell (ISC) counts. *Blood*. 1982; 60(3): 659-662.
49. Ballas SK, Dover GJ, Charache S. Effects of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. *Am J. Hematol*. 1989; 32(2): 104-111.
50. Bertles JF y Milner PF. Irreversible sickled erithrocytes. A consequence of the heterogeneous distribution of hemoglobine, types of sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1968; 47: 1731-1741.
51. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert RP et al. Effects of hydroxyurea on the frequency of painful crisis in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1995; 332(20): 1317-1322.
52. Goa KL and Sorkin EM. Nitrendipine: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties, and its therapeutic efficacy in the treatment of hypertension. *Drugs*. 1987; 33: 123-155.
53. Mikus G, Mast V, Fischer C, Machleidt C, Kuhlmann U and Eichelbaum M. Pharmacokinetics, bioavailability, metabolism and acute and chronic antihypertensive effects of nitrendipine in patients with chronic renal failure and moderate to severe hypertension. *Br. J. Clin Pharmacol*. 1991; 31: 313-322.
54. Sayer PR, Brogden RN, Pinder RM, Speight TM, Avery GS. Clotrimazol: A review of its antifungal activity and therapeutic efficacy. *Drugs*. 1975; 9: 424-447.
55. Stoepel K, Deck K, Corsing C, Ingram C, Vanov S. Aspectos sobre la seguridad del tratamiento a largo plazo con nitrendipina. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984; 6(suppl): 12-15.

56. De franceschi L, Bachir D, Galacteos F, Tchemia G, Cynober T, Alper S, Pratt O, Beuzard Y, Brugnara C. Dietary magnesium supplementation reduces pain crisis in patients with sickle cell disease. *Blood*. 1997; 90: 264.