

DREPANOCITOSE: NOVAS PERSPECTIVAS DA ABORDAGEM TERAPÊUTICA

Cristina Gonçalves¹, João Silva Marques², Henrique Luz Rodrigues³,

ABSTRACT

Sickle cell Anaemia: the new perspectives in treatment

The current sickle cell disease therapy relies on symptoms relieve and prevention of disease complications. Hydroxyurea, whose mechanisms of action aren't entirely known, is one of the drugs used in the prevention of vascular complications of this genetic disease.

Disturbances in the expression of adhesion molecules on the surface of red blood cells, leukocytes, platelets and endothelium and their secretion to the vascular lumen appear to be involved in this disease's pathogenesis. Cellular dehydration and altered production or bioavailability of nitric oxide, erythropoietin and TNF- α also seem to be related to this process. New experimental drugs developed in consideration of the new recent physiopathologic findings have been targeting inhibition of cell adhesion to endothelium, decrease cellular dehydration and stimulate fetal haemoglobin synthesis.

Key-words: Sickle cell anaemia, Therapeutics, Pathophysiology

RESUMO

A actual terapêutica da drepanocitose baseia-se no alívio de sintomas e na prevenção das complicações. A hidroxiureia, cujo mecanismo de acção é parcialmente conhecido, é um dos fármacos utilizados na profilaxia das complicações vasculares que estão associadas a esta doença genética.

¹ Docente livre de Introdução à Clínica da Faculdade de Medicina de Lisboa (FML). Investigadora voluntária do Instituto de Farmacologia e Neurociências da FML. Interna de Pediatria Hospital de Santa Maria

² Docente livre de Farmacologia (Instituto de Farmacologia e Neurociências da FML). Interno de Cardiologia Hospital Distrital de Santarém

³ Professor Auxiliar de Farmacologia (Instituto de Farmacologia e Neurociências da FML). Especialista em Farmacologia Clínica e Nefrologia

Correspondência

João Silva Marques
Rotunda Dr.ª Laura Aires n.º 1-A 6.º esq., Massamá
2745-758 Queluz
j.m@oninetspeed.pt

Neste artigo procuramos rever o conhecimento recente dos mediadores envolvidos na fisiopatologia da drepanocitose numa perspectiva de definir novos alvos terapêuticos.

A expressão das moléculas de adesão na superfície dos eritrócitos, leucócitos, plaquetas e endotélio, e a sua secreção para o lúmen vascular parecem ser factores relevantes na patogénese da doença. A desidratação eritrocitária, a alteração da produção ou da biodisponibilidade do monóxido de azoto, a eritropoietina e o TNF- α também parecem estar envolvidos neste processo. As novas abordagens terapêuticas experimentais ao tomarem em consideração a recente informação fisiopatológica têm procurado inibir a adesão das células ao endotélio, minimizar a desidratação celular e estimular a síntese da hemoglobina fetal.

Palavras-chave: Drepanocitose, Terapêutica, Fisiopatologia

1. INTRODUÇÃO

A introdução da hidroxiureia na terapêutica da drepanocitose melhorou significativamente a qualidade de vida destes doentes, mas teve um impacto limitado na sobrevida^{1,2}. O melhor conhecimento das alterações biológicas subjacentes e a identificação de mediadores patogénicos talvez possam contribuir para a investigação de moléculas mais selectivas e efectivas na terapêutica farmacológica destes doentes.

O objectivo deste artigo é rever o actual conhecimento das alterações microvasculares induzidas pela alteração genética da estrutura da hemoglobina nas células falciformes, numa perspectiva de obter novos alvos terapêuticos.

2. FISIOPATOLOGIA DA DREPANOCITOSE

A troca do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia da β -globina torna a hemoglobina susceptível à polimerização, quando de-

soxigenada. Formam-se agregados intra-eritrocitários que modificam a estrutura do eritrócito, levando a uma diminuição da sua deformabilidade. Este factor hemorreológico tem especial importância a nível dos vasos capilares, onde estas células mais rígidas originam fenómenos vasoclusivos. Múltiplos factores contribuem ou derivam destas alterações hemorreológicas (Quadro I).

2.1. Eritrócitos

2.1.1. Adesão ao Endotélio (Fig. 1)

Como acontece com as outras anemias hemolíticas, a drepanocitose na crise hemolítica está associada a reticulocitose. Os reticulócitos expressam na sua superfície a integrina *very late activation antigen 4* ($\alpha 4\beta 1$ ou VLA-4), que tem a capacidade de se ligar à fibronectina³ e à *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)⁴. Estas moléculas de adesão são também expressas na superfície endotelial na presença de citocinas inflamatórias (TNF- α) ou em condições de

<p>Eritrócito Expressão de moléculas de adesão ao endotélio</p> <ul style="list-style-type: none"> – VLA-4 – VCAM-1 – Glicanos sulfatados – CD36 – CD47 – B-CAM/Lu <p>Alteração estrutural da Membrana Eritrocitária</p> <ul style="list-style-type: none"> – Exteriorização de fosfatidilserina <p>Desidratação eritrocitária</p> <ul style="list-style-type: none"> – Activação do canal de Gardos – Activação do Canal K⁺-Cl⁻ 	<p>Endotélio Actividade pró-coagulante</p> <ul style="list-style-type: none"> – factor tecidual <p>Actividade pró-adesiva</p> <ul style="list-style-type: none"> – VCAM-1 – selectinas E e P – fibronectina – ICAM-1 – CD36 <p>Actividade pró-inflamatória</p> <ul style="list-style-type: none"> – NF-kB <p>Indução de descontinuidade endotelial</p> <ul style="list-style-type: none"> – Trombina
<p>Leucócitos Actividade inflamatória</p> <ul style="list-style-type: none"> – activação e desgranulação – ↑ expansão respiratória – ↑ leucotrieno B4 <p>Adesão endotelial</p> <ul style="list-style-type: none"> – ↓ actividade da selectina L 	<p>Coagulação Actividade pró-coagulante</p> <ul style="list-style-type: none"> – Protrombina 1.2 <p>Actividade pró-adesiva</p> <ul style="list-style-type: none"> – Trombina <p>NO Inativado pela hemoglobina Inibe a activação dos leucócitos</p>
<p>Plaquetas Libertação de mediadores</p> <ul style="list-style-type: none"> – trombospondina-1 <p>Activação plaquetar</p> <ul style="list-style-type: none"> – ↑ Agonistas – adrenalina – trombina – ADP 	<p>EPO Efeito pró-trombótico?</p> <p>TNF-α Efeito pró-inflamatório</p>

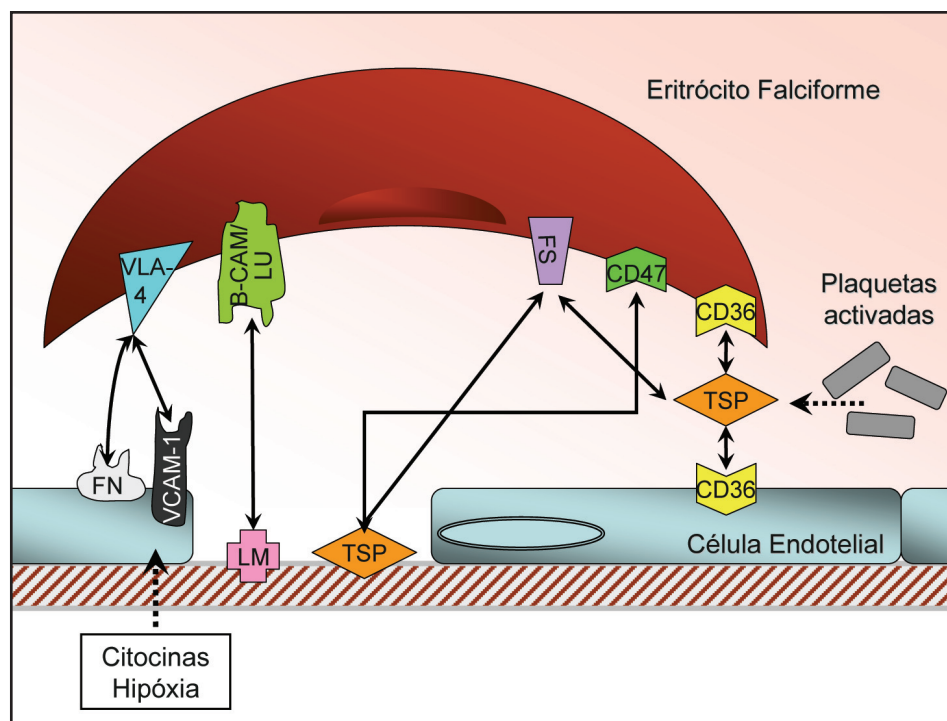
VLA-4 – very late activation antigen 4; VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule 1; B-CAM/LU – basal cell adhesion molecule/Lutheran.

Quadro I. Mecanismos Fisiopatológicos da Drepanocitose

hipoxia, levando à adesão dos reticulócitos ao endotélio.

A trombospondina, uma proteína plasmática secretada pelas plaquetas activadas e que se liga aos glicanos sulfatados nas células SS⁵, à semelhança do que acontece com outras moléculas plasmáticas de alto peso molecular, como o factor de *von Willebrand*, contribui para a adesão endotélio-eritrócito durante o *stress*

inflamatório. Os reticulócitos e as células endoteliais expressam CD36 que se liga à trombospondina secretada por plaquetas activadas⁶. Como a trombospondina possui mais do que um local de ligação ao CD36, este mecanismo leva à adesão indirecta dos reticulócitos ao endotélio. Outro mecanismo pelo qual os eritrócitos se ligam à trombospondina imobilizada no subendotélio é através da proteína



FN – fibronectina; TSP – trombospondina; LM – laminina; FS – fosfatidilserina; VLA-4 – very late activation antigen 4; VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule 1; B-CAM/LU – basal cell adhesion molecule/Lutheran.

Figura 1. Moléculas de adesão envolvidas na interação endotélio-eritrócito.

CD47⁷, uma molécula associada ao complexo Rhesus.

Existem ainda mecanismos pró-adesivos não mediados por receptores que envolvem os glicolípidos sulfatados e a fosfatidilserina dos eritrócitos^{5,8}.

A laminina endotelial liga-se aos eritrócitos deformados via *basal cell adhesion molecule/Lutheran* (B-CAM/Lu)⁹. Esta interação é potenciada pela adrenalina, o que pode explicar a associação do stress com o início de crises vasclusivas¹⁰.

2.1.2. Alterações estruturais da membrana

A distribuição de fosfolípidos na membrana celular de eritrócitos é assimétrica: colina, esfingomiéline e fosfatidilcolina dispõem-se na camada externa da membrana e os amino-fosfolípidos – fosfatidilserina e fos-

fatidiletanolamina – localizam-se principalmente na camada interna¹¹. Esta disposição é mantida por sistemas de translocação de fosfolípidos, como a flipase. Os eritrócitos de doentes com drepanocitose apresentam disrupção da arquitectura da membrana com exteriorização da fosfatidilserina¹². Os macrófagos ligam-se a estes eritrócitos^{13,14} e fagocitam-nos, levando ao agravamento da anemia.

A alteração da disposição dos fosfolípidos na membrana celular também é responsável pela activação de factores de coagulação^{15,16}. Na génese deste estado pró-coagulante parecem estar envolvidos repetidos ciclos de falciformização-desfalciformização que levam a anomalias na interacção da membrana eritrocitária com o citoesqueleto¹⁷. A hemoglobina fetal (HbF) pode ter aqui um papel protector, pois os eritrócitos que a

expressam em maior concentração apresentam menor exposição de fosfatidilserina e assim, geram menor quantidade de trombina¹⁵.

2.1.3. Canais Iônicos

A velocidade de polimerização da hemoglobina e consequente falciformização do eritrócito está dependente da concentração celular de HbS¹⁸. Um dos factores mais importantes para o aumento da concentração de HbS é a desidratação dos glóbulos vermelhos, para a qual contribuem o co-transporte potássio-cloro e o efluxo de potássio activado pelo cálcio (canal de Gardos). Nos indivíduos normais, estes mecanismos só estão activos nos reticulócitos, mas nos doentes com HbC e com HbS as trocas iónicas estão aumentadas mesmo nos eritrócitos maduros^{19,20}. Em zonas de circulação lenta há acidificação do meio e consequente estimulação do co-transporte potássio-cloro, levando à formação de células em alvo¹⁹. A falciformização eritrocitária promove a ruptura de vesículas de armazenamento de cálcio, o qual activa os canais de Gardos e de potássio, contribuindo para a desidratação dos glóbulos²¹.

2.2. Leucócitos

Os leucócitos foram recentemente implicados na fisiopatologia da drepanocitose. O aumento da contagem de leucócitos é um factor predictor de maior morbidade²² e mortalidade¹. A redução do número de leucócitos circulantes pela hidroxúria relaciona-se com melhoria do prognóstico²³.

Os leucócitos dos doentes com drepanocitose evidenciam várias par-

ticularidades: 1) um fenótipo activado^{24,25}; 2) maior adesão ao endotélio²⁵; 3) reduzida actividade da selectina L (molécula da superfície leucocitária que inibe a adesão ao endotélio)²⁴; e 4) um aumento da concentração do leucotrieno B₄^{24,25}.

Os neutrófilos intervêm neste processo patogénico ao formarem agregados heterocelulares com os eritrócitos irreversivelmente deformados²⁶ perturbando a hemorreologia da microcirculação. Ao migrarem através das *gap junctions* do endotélio, os neutrófilos ampliam a reacção inflamatória que é responsável pela expressão de moléculas de adesão à superfície do endotélio.

2.3. Plaquetas

As plaquetas não parecem ter grande relevância na oclusão microvascular destes doentes, embora sejam quantitativa e qualitativamente alteradas. A trombocitose está presumivelmente relacionada com a asplenia funcional, comum nos doentes com drepanocitose após os primeiros anos de vida. A alteração qualitativa traduz-se por um estado de activação plaquetar, que parece estar relacionado com um número elevado de megacariócitos circulantes e um aumento da concentração de alguns agonistas plaquetares como a adrenalina, trombina e ADP^{27,28}. Os marcadores da activação plaquetar – selectina P, CD40-L²⁹, factor 4 e β -tromboglobulina³⁰ – estão elevados e há diminuição da concentração de trombospondina-1 plaquetar, em provável relação com a prévia activação e desgranulação das plaquetas³¹.

2.4. Endotélio

Os doentes com drepanocitose apresentam disfunção da actividade endotelial³², e expressam o factor tecidual (factor III da coagulação)³³, a VCAM-1, a ICAM-1, e as selectinas E e P³². A activação de muitas destas moléculas é modulada pelo factor nuclear NF-kB em resposta a citocinas inflamatórias. Outros factores de transcrição que poderão ter um papel neste processo são o *Early Growth Response protein-1* (EGR-1) e o *Adaptor Protein-1* (AP-1). A activação crónica do endotélio parece ser responsável pela vasculopatia dos grandes e pequenos vasos¹⁰.

O endotélio apresenta, assim, actividade pró-coagulante, pró-adesiva e pró-inflamatória.

2.5. Coagulação

Os doentes com drepanocitose têm alterações da coagulação quer por alterações da função plaquetar, quer por alterações dos sistemas pró-coagulantes, anticoagulantes e fibrinolítico.

A avaliação indirecta dos níveis plasmáticos da trombina sugere que os doentes com drepanocitose tenham níveis aumentados. Registaram-se aumentos do fragmento 1.2 da protrombina, de D-dímeros e de complexos trombina-antitrombina³⁴ e diminuição do factor V e das proteínas C e S³⁵.

A trombina induz a expressão de moléculas de adesão promovendo a interacção leucócito-endotélio^{36,37}. Esta adesão desencadeia a libertação de espécies reactivas de oxigénio e de proteases que levam à separação das células endoteliais da membrana basal causando defeitos na continuidade do revesti-

mento endotelial³⁸ com exposição do subendotélio. Deste modo, a trombina actua na matriz extra-celular exposta, induzindo a expressão de factores pró-adesivos, como a selectina P.

O fragmento da protrombina 1.2, marcador da formação de trombina, está associado a eritrócitos positivos para a fosfatidilserina¹⁵. Este marcador relaciona-se com maior risco de acidente vascular cerebral trombótico em crianças com drepanocitose³⁹.

A avaliação dos níveis de anti-trombina não mostrou resultados sobreponíveis, já que está descrito o seu aumento⁴⁰ e diminuição⁴¹ em doentes com drepanocitose.

Os títulos de anticorpos antifosfolípidos, que têm um efeito pró-coagulante e pró-trombótico, estão frequentemente aumentados nestes doentes⁴².

Apesar de estas alterações dos factores da coagulação estarem presentes nos períodos intercricos, ainda não está esclarecido se se prolongam durante a crise vasclusiva. Provavelmente devido à dificuldade em definir o início e a duração da crise, os resultados são díspares relativamente à actividade e concentração da trombina, factor tecidual, proteínas C e proteína S⁴³. Durante a crise, observou-se redução do número de plaquetas e megacariócitos⁴⁴ seguido por um aumento nos dias subsequentes⁴⁵. Neste período, também ocorre activação plaquetar e aumento dos níveis de factor plaquetar 4, β -tromboglobulina³⁰ e trombospondina³¹ circulantes.

2.6. Monóxido de Azoto (NO)

O NO é sintetizado pela NO sintase a partir do aminoácido L-arginina⁴⁶ e reage com o ião ferroso do grupo

heme da guadinilato ciclase solúvel, com aumento dos níveis de GMPc e indução do relaxamento vascular⁴⁷.

O NO também é inibidor da agregação plaquetar (por um mecanismo dependente do GMPc que aumenta a concentração de AMPc)⁴⁷, da adesão leucocitária⁴⁸, da proliferação do músculo liso, para além de evidenciar uma acção anti-oxidante e anti-inflamatória. As plaquetas também geram NO que inibe a activação plaquetar por um mecanismo de *feedback* negativo.

O NO produzido pelas células endoteliais difunde-se na corrente sanguínea, e é inativado pela oxihemoglobina eritrocitária⁴⁹, com formação de metahemoglobina e íões nitrato. A velocidade desta reacção é normalmente reduzida devido à hemoglobina estar confinada ao interior dos eritrócitos. Também contribuem para a limitada difusão do NO, a membrana eritrocitária e as proteínas do citoesqueleto dos eritrócitos⁵⁰. O NO pode ainda reagir com os grupos heme da desoxihemoglobina, formando ferrocitocromo, e com a cisteína na posição 93 da cadeia β da hemoglobina, formando a S-nitrosohemoglobina, que se comportam como fontes bioactivas de NO⁵¹. Assim, a hemoglobina pode actuar quer como inactivadora de NO, quer como transportadora deste gás na circulação⁴⁹.

Na crise hemolítica da drepanocitose, aumenta a inactivação do NO pela hemoglobina extra-eritrocitária⁵². A diminuição marcada da resposta vasodilatadora a infusões de nitroglicerina e nitroprussiato de sódio⁵³ sugere que o NO também é inativado. Esta diminuição de NO é justificada pelo aumento dos níveis plasmáticos de oxihemoglobina, devido a hemólise intravascular. A oxihemoglobina tem

a capacidade de bloquear as respostas ao monóxido de azoto endógeno e exógeno, promovendo a diminuição da actividade da guadinilato ciclase que conduz à redução da vasodilatação e da anti-agregação plaquetar com consequente disfunção de vários órgãos. A inactivação do NO também parece poder contribuir para a hipertensão pulmonar e úlceras dos membros inferiores dos doentes drepanocíticos⁴⁹.

A arginina, o precursor do NO, pode apresentar níveis reduzidos quando ocorre hemólise devido à libertação da arginase eritrocitária, a qual converte a L-arginina em ornitina⁵⁴. Outro possível mecanismo para a redução de NO é a diminuição da síntese de L-arginina a nível renal, pois que a insuficiência renal é frequente nos doentes com drepanocitose⁵⁵. O papel patogénico destas alterações do metabolismo da L-arginina é realçado pela constatação de uma relação inversa entre a razão [arginina]/[ornitina] se relacionar com a gravidade da hipertensão pulmonar e aumento da mortalidade⁵⁵.

A xantina oxidase está elevada em doentes com drepanocitose⁵⁶. Durante os ciclos de hipóxia-oxigenação, a xantina oxidase é libertada pelo fígado para a circulação e cataliza a produção de anião superóxido e peróxido de hidrogénio. Estes radicais, ao interagirem com o NO, contribuem para a sua diminuição.

A importância destes mecanismos de alteração do metabolismo do NO parece ser relevante nas crises vaso-oclusivas agudas da drepanocitose. A redução significativa do NO em doentes com dor persistente quando comparado com doentes com dor de resolução mais célere⁵⁷ sugere que este gás deva ser considerado como um marcador da gravidade da crise.

2.7. Eritropoietina

A eritropoietina (EPO) é produzida no aparelho justaglomerular renal em resposta à hipoxia e actua na medula estimulando a produção de novos eritrócitos. A concentração deste mediador encontra-se aumentada nos doentes com drepanocitose em resposta à hemólise crónica. No entanto, esse aumento é inferior ao verificado em doentes com anemia por outras causas⁵⁸. Doentes com anemia não associada a hemoglobinopatias apresentam uma subida marcada da concentração de EPO para valores de hemoglobina (Hb) menores que 12g/dl. Nos doentes com drepanocitose essa resposta só ocorre para valores de Hb inferiores a 9g/dl⁵⁸, observando-se uma correlação inversa com a idade dos doentes⁵⁸. Uma das possíveis explicações para esta observação é a progressiva disfunção renal que os drepanocíticos frequentemente apresentam⁵⁸. Por outro lado, a alteração da afinidade da HbS interfere com a regulação fisiológica da produção de eritropoietina⁵⁸.

A administração da EPO não aumenta a HbF^{59,60}. De igual modo, a associação da EPO à hidroxiureia não potenciou o aumento da HbF^{59,60,61}. Não se observou qualquer relação entre a administração de EPO e a ocorrência de eventos trombóticos.

2.8. TNF- α

Os níveis séricos de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, são superiores em doentes drepanocíticos quando comparados com indivíduos normais⁶² e este aumento não difere entre o estado basal e a crise vasclusiva. O TNF- α

estimula a expressão de moléculas de adesão vascular como a VCAM-1⁶³ e a actividade da sintase indutível do NO⁶⁴ podendo desempenhar um papel importante na expressão de moléculas de adesão e na promoção de um estado pró-inflamatório.

3. TERAPÊUTICA

O conhecimento da fisiopatologia e o desenvolvimento da abordagem terapêutica permitiram uma melhoria substancial do prognóstico dos doentes com drepanocitose. A estimativa actual da esperança de vida dos doentes homocigóticos para o tipo S da β -globina é de 42 anos para os homens e de 48 anos para as mulheres¹. Nesta revisão procuramos fazer uma análise das terapêuticas actuais e experimentais (Quadro II) realçando as indicações, o benefício e as novas perspectivas que se abrem na utilização das modalidades terapêuticas disponíveis.

As medidas para alívio dos sintomas na terapêutica da drepanocitose também são importantes no contexto das crises. Todavia, dado que não interferem com os mecanismos da doença que analisamos, consideramos que saem do âmbito desta revisão, pelo que não as abordaremos.

3.1. Terapêutica actual

3.1.1. Transplante de Medula Óssea

O objectivo da transplantação de células de medula óssea na terapêutica da drepanocitose é a substituição da eritropoiese das células falciformes. O impacto clínico esperado é a

Terapêutica Actual	Terapêuticas Experimentais
<ul style="list-style-type: none"> – Transplante de Medula Óssea <ul style="list-style-type: none"> – Eliminação das células com alteração genética da cadeia da β-globina – Transfusões sanguíneas <ul style="list-style-type: none"> – \uparrow [Hb] – \downarrow [Hb S] – Hidroxiureia <ul style="list-style-type: none"> – \uparrow HbF – \downarrow Neutrófilos, monócitos, reticulócitos – \downarrow Adesão dos eritrócitos ao endotélio – \uparrow NO – Outras Medidas Terapêuticas <ul style="list-style-type: none"> – Profilaxia da infecção – Hidratação – Suplementação de Ácido fólico? – IECAs na Insuficiência Renal? 	<ul style="list-style-type: none"> – Ácidos Gordos de Cadeia Curta <ul style="list-style-type: none"> – \uparrow HbF por modulação da transcrição – Decitabina <ul style="list-style-type: none"> – \uparrow HbF – Fármacos que actuam nos Canais Iónicos <ul style="list-style-type: none"> – \downarrow Da desidratação intracelular – NO <ul style="list-style-type: none"> – \downarrow Pressão sistólica na artéria pulmonar – Fármacos que interferem na adesão endotelial <ul style="list-style-type: none"> – Sulfazalazina (inibidor do NF-kB) – Glicocorticóides (inibem o NF-kB e \downarrow a produção de citocinas) – Anticorpos monoclonais anti-αVβ3 – Antagonistas das integrinas leucocitárias – Heparina (<i>in-vitro</i> inibe a selectina P) – Anti-agregantes (sem benefício) – Poloxamer 188 – Eritropoietina – Terapêutica génica

Quadro II. Terapêutica da Drepanocitose

eliminação ou melhoria substancial das complicações causadas pela precipitação ou polimerização da hemoglobina intra-eritrocitária.

A transplantação de células hematopoiéticas tem potencial curativo no tratamento da drepanocitose^{65,66,67}. A maioria dos protocolos clínicos têm incluído doentes com idade inferior a 17 anos e com complicações da doença^{67,68,69,70} pelo que os resultados obtidos não se podem generalizar a toda a população com drepanocitose.

A terapêutica pré-transplante tem consistido na associação de doses mieloablativas de bussulfano (14-16mg/kg) e ciclofosfamida (200mg/kg) com ou sem a adição de anticorpos anti-linfócitos T ou radiação linfóide total^{67,68,69,70}. Na imunossupressão pós-transplante os

fármacos mais utilizados são a associação de ciclosporina e metotrexato.

Os riscos e benefícios da terapêutica mieloablativa no tratamento da drepanocitose foram avaliados em vários ensaios clínicos^{67,68,69,70}. Apesar dos doentes seleccionados apresentarem já complicações, os resultados foram encorajadores. A probabilidade de sobrevivência (Fig. 2) após transplante varia entre 92-94% e a sobrevivência sem recorrência da doença ou rejeição do enxerto entre 75-84%^{68,69}. Os doentes que sobrevivem têm uma diminuição da progressão subclínica da doença: estabilização da função pulmonar e da vasculopatia do sistema nervoso central⁷⁰.

À medida que a relação risco/benefício da transplantação na terapêutica

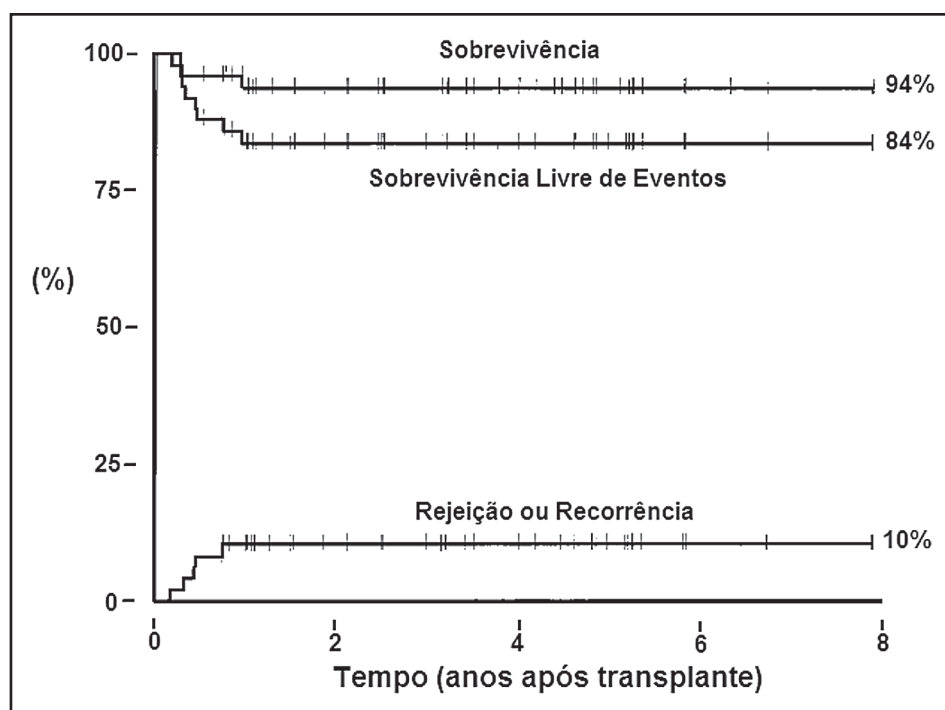


Figura 2. Prognóstico de doentes drepanocíticos após transplante de medula óssea⁷⁰

reactiva vai sendo avaliada, cresce o interesse de saber se esta terapêutica pode ter um carácter pró-ativo⁷¹.

Atendendo a que cerca de 25% de doentes com drepanocitose desenvolvem quimerismo estável após transplante de irmãos HLA-idênticos⁷² e que pode haver quimerismo entre dador e hospedeiro após transplante e terapêutica mieloablativa sem desvantagem no prognóstico⁷³, foi equacionada a terapêutica não mieloablativa nestes doentes. Ela baseia-se na utilização de uma terapêutica pré-transplantação menos agressiva, que permita o enxerto de células do dador na medula óssea doente. A maior sobrevivência dos eritrócitos normais face aos drepanocíticos no sangue periférico⁷⁴ e a eritropoiese ineficaz da medula óssea afectada pela doença⁷⁵ conferem vantagem competitiva às células progenitoras eritróides do enxerto. Assim, foram ensaiados diversos esquemas de condicionamen-

to não-mieloablativo^{76,77,78,79,80}. A sua utilização pode, pela menor toxicidade, permitir que um maior número de doentes possa aceder à terapêutica curativa. No entanto, ainda não foi possível identificar um regime terapêutico imunossupressor que não provoque rejeição das células do dador, não desencadeie doença do enxerto significativa contra o hospedeiro e que, simultaneamente, confira vantagem na segurança clínica, face à terapêutica convencional.

Apesar de estar estabelecido o potencial curativo do transplante de medula óssea de irmãos compatíveis em doentes com hemoglobinopatias, apenas 30-35% dos doentes têm um potencial dador⁸¹. Assim, para tornar o tratamento acessível a mais doentes torna-se necessária a obtenção de células estaminais de outras fontes. O aloenxerto e enxerto haploidêntico com incompatibilidade de antígenos HLA foram testados em doentes com

β -talassémia⁸². A histoincompatibilidade entre dador e hospedeiro relacionou-se com a rejeição e falência do enxerto. Houve maior incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro, o que contribuiu para uma sobrevivência livre de eventos de apenas 21%⁸². Foi demonstrado que as células estaminais do cordão umbilical são adequadas para transplantação^{83,84,85}. A sobrevivência livre de eventos em doentes com hemoglobinopatias após transplante de células de cordão umbilical de irmãos HLA-idênticos foi de 49% num seguimento de 3 a 38 meses⁸⁶. Talvez uma imunossupressão mais efectiva possa mostrar melhores resultados, mas são necessários ensaios clínicos que o demonstrem.

O transplante de medula óssea é a única modalidade terapêutica potencialmente curativa. A obtenção de terapêuticas com menor toxicidade e uma maior disponibilidade de células dadoras poderão tornar o transplante mais acessível no futuro.

3.1.2. Transfusão sanguínea

A terapêutica transfusional é um componente importante no tratamento dos doentes com anemia falciforme^{87,88}. Ela leva a um aumento da capacidade transportadora de oxigénio do sangue porque aumenta a concentração de hemoglobina e diminui a percentagem de eritrócitos drepanocíticos.

As indicações para transfusão dividem-se em: 1) episódicas, que têm como finalidade estabilizar ou reverter as complicações agudas, e 2) profiláticas, que visam prevenir estas complicações⁸⁹. Não foram realizados ensaios clínicos controlados na avaliação do papel das transfusões nas situações agudas que ameaçam a vida dos doentes com drepanocitose pelo que as recomendações se baseiam na opinião de especialistas (Quadro III)⁹⁰. No entanto, a transfusão agressiva num número limitado de doentes com falência multi-órgãos melhorou a recuperação funcional orgânica⁹¹. A anemia basal,

	Transfusões Episódicas	Transfusões Crónicas
Indicações	<ul style="list-style-type: none"> – Sequestração esplénica – Aplasia medular – Crise hemolítica grave – Insuficiência cardíaca aguda – Síndrome torácico agudo – AVC – Falência multi-órgãos – Cirurgia major 	<ul style="list-style-type: none"> – Prevenção de AVCs – Dor crónica – Hipertensão pulmonar – Anemia da insuficiência renal – Insuficiência cardíaca crónica
Indicações Controversas	<ul style="list-style-type: none"> – Priapismo – Úlcera de perna – Gravidez – Contraste radiológico 	<ul style="list-style-type: none"> – Perturbações Neurocognitivas
Contra-indicações	<ul style="list-style-type: none"> – Crise dolorosa não complicada – Infecção – Cirurgia minor – Necrose asséptica da anca/ombro – Gravidez não complicada 	<ul style="list-style-type: none"> – Anemia crónica basal

Quadro III. Indicações clínicas para transfusão⁹⁰

as crises dolorosas não complicadas e as cirurgias *minor* não devem ser tratadas com transfusão sanguínea⁹⁰. Já a síndrome torácico agudo, a insuficiência cardíaca, a falência multi-órgãos, os acidentes vasculares cerebrais, os episódios de sequestração esplênica e a anemia aplástica são indicações bem estabelecidas para suporte transfusional⁸⁷. A transfusão crónica está indicada quando a evicção de complicações justifica o risco de aloimunização, infecção e sobrecarga de ferro^{88,92}. Nestes casos a exsanguíneo-transfusão pode ser útil, por reduzir a sobrecarga de ferro⁹³.

Para evitar complicações secundárias a um aumento da viscosidade sanguínea, a concentração de hemoglobina para valores superiores a 10-11g/dl deve ser evitada^{92,94,95}.

A transfusão pré-operatória de doentes submetidos a cirurgias major foi avaliada num ensaio clínico multicêntrico⁹⁶. Não houve diferenças na ocorrência de complicações perioperatórias entre uma abordagem transfusional agressiva para reduzir a Hb S a 30 % e um regime conservador desenhado para aumentar a concentração de Hb para 10 mg/dl⁹⁶. No entanto, as complicações foram mais frequentes em doentes que não foram transfundidos, pelo que está indicada a transfusão conservadora pré-operatória em cirurgias major.

A transfusão na gravidez foi avaliada num ensaio clínico que não encontrou diferenças no prognóstico obstétrico e pediátrico quando se comparou terapêutica profilática com o objectivo de manter concentrações de hemoglobina de 10 mg/dl com uma abordagem de transfundir apenas se os valores de hemoglobina fossem inferiores a 6 g/dl⁹⁷.

3.1.3. Hidroxiureia

O mecanismo básico das complicações da drepanocitose decorre da falciformização dos eritrócitos. Esta deve-se à polimerização das moléculas de hemoglobina S ($\alpha_2\beta_2^S$). A hemoglobina fetal (Hb F) ($\alpha_2\gamma_2$), que não possui a cadeia beta mutada, inibe a falciformização por interferir com a polimerização da hemoglobina S. A constatação de que a administração de citotóxicos em animais⁹⁸ e doentes com drepanocitose⁹⁹ estimula a síntese de Hb F levou a um interesse crescente na terapêutica com um citotóxico de baixa toxicidade. A hidroxiureia foi um dos fármacos. A redução da síntese de ADN por inibição da redutase de ribonucleótidos é um dos seus mecanismos de acção.

A utilidade clínica da terapêutica com hidroxiureia foi avaliada num ensaio clínico aleatorizado com dupla ocultação, contra placebo: o Estudo Multicêntrico da Hidroxiureia na Anemia de Células Falciformes¹⁰⁰. Em doentes homocigóticos para a Hb S, com mais de 18 anos de idade e com três ou mais crises dolorosas por ano, a terapêutica com hidroxiureia durante um período médio de 21 meses levou a uma diminuição significativa, do ponto de vista estatístico e clínico, do número de crises/ano, da ocorrência de síndrome torácico agudo e da necessidade de suporte transfusional.

Nove anos após o início do Estudo Multicêntrico da Hidroxiureia na Anemia de Células Falciformes, o acompanhamento observacional não revelou diferenças na mortalidade dos 2 grupos inicialmente aleatorizados². Porque houve sobreposição na terapêutica com hidroxiureia em ambos os grupos, os autores optaram por fazer

a avaliação prognóstica ajustada para intervalos de 3 meses, que revelou uma diminuição de 40 % na mortalidade nos doentes que faziam hidroxiureia nesses 3 meses². A sobrevivência relacionou-se directamente com a concentração de HbF e inversamente com a frequência de fenómenos vasclusivos. Estes dados justificam que a hidroxiureia seja recomendada em doentes com episódios frequentes (≥ 3 vezes/ano) de crises dolorosas de intensidade moderada a grave.

Os efeitos da hidroxiureia não resultam apenas da estimulação da produção de HbF. Têm também impacto a nível dos factores patogénicos: 1) redução da contagem de neutrófilos, monócitos e reticulócitos¹⁰¹; 2) redução da adesão dos eritrócitos ao endotélio¹⁰² por diminuição da expressão de moléculas de adesão²⁸; e 3) aumento das concentrações de NO e GMPC¹⁰³.

A administração isolada de arginina não aumenta a produção de NO¹⁰⁴. Todavia, a administração deste aminoácido, associado a hidroxiureia, aumenta a produção de NO¹⁰⁴. Estes dados sugerem que a hidroxiureia possa actuar não só como um dador directo de NO, mas também como activadora da sintase do NO.

Os níveis de GMPC eritrocitários, que são modulados pela acção do NO, estão mais elevados nos doentes medicados com hidroxiureia do que nos doentes sem esta terapêutica e nestes são maiores do que nos indivíduos normais¹⁰⁵. Nos doentes submetidos a terapêutica com hidroxiureia, os níveis de GMPC correlacionaram-se com a HbF¹⁰⁶, sugerindo que o GMPC aumenta a produção da cadeia γ -globina por activação de proteínas-quinases.

Apesar dos efeitos benéficos a nível da expressão de moléculas de ade-

são e da redução de leucócitos circulantes, os efeitos da hidroxiureia não se devem a diminuição da expressão da citocina inflamatória TNF- α ¹⁰⁷.

Os efeitos adversos da hidroxiureia prendem-se com o efeito supressor sobre a medula óssea, teratogenicidade e potencial carcinogénico. Após paragem do tratamento a depressão hematopoiética tem curta duração¹⁰⁰. Embora a administração de altas doses de hidroxiureia em animais seja teratogénica¹⁰⁸ estão relatados casos de gestações em humanos sem complicações¹⁰⁹. O potencial carcinogénico da hidroxiureia é enfatizado pelos resultados do Grupo de Estudos da Policitemia Vera, que, após um acompanhamento médio de 8,6 anos, registou um aumento significativo da incidência de leucemia aguda de 5,9 % contra 1,5 % no grupo a fazer flebotomia¹¹⁰. Todavia, o risco carcinogénico da hidroxiureia na drepanocitose parece ser bastante inferior ao observado em doenças mieloproliferativas, para além de que a mortalidade por complicações inerentes à própria patologia é, pelo menos, 10 vezes superior à incidência de leucemia². Assim, é consensual que a relação risco/benefício da hidroxiureia é favorável nos doentes que reúnam as indicações clínicas referidas acima.

3.1.4. Outras medidas

3.1.4.1. Vacinação e Antibioterapia profilática

Os doentes com drepanocitose têm maior predisposição a infecções, pelo que se torna importante a vacinação, a antibioterapia profilática e a detecção precoce de sinais sépticos.

A causa mais frequente de morte em crianças com drepanocitose é a sépsis a *Streptococcus pneumoniae*^{111,112}. Esta susceptibilidade acrescida deve-se a asplenia e a incapacidade de adquirir respostas imunes IgG mediadas aos antigénios polissacáridos. A prevenção desta temida complicação baseia-se na vacinação com vacina anti-pneumocócica 23-valente¹¹³ e na administração profilática de penicilina¹¹⁴. No entanto, a resposta imunológica à vacinação das crianças drepanocíticas é subnormal, permitindo apenas atingir concentrações de anticorpos comparáveis às das crianças saudáveis não vacinadas¹¹⁵. Apesar de a vacinação em crianças não ter demonstrado redução da doença pneumocócica invasiva de uma forma consistente¹¹⁶ e de se comparar desfavoravelmente com a profilaxia com penicilina¹¹⁷ a sua utilização concomitante está recomendada devido a uma favorável relação entre o baixo risco de complicações e o potencial benefício. A administração profilática de penicilina oral em duas tomas diárias mostrou reduzir a incidência de sépsis pneumocócica em 80%¹¹⁸. A sua utilização só está recomendada em crianças até aos 5 anos já que não foi demonstrado benefício na utilização continuada em faixas etárias superiores¹¹⁹.

Também é recomendada a vacinação anti-*Haemophilus influenzae* tipo b⁹⁰. A *Neisseria meningitidis*, um organismo capsulado, que pode causar infecções em doentes esplenectomizados, não é um agente frequente na drepanocitose pelo que a vacinação anti-menigococos só é recomendada no contexto de surtos da doença⁹⁰.

As infecções virais a *Influenza* causam morbidade acrescida aos

doentes com drepanocitose pelo que é recomendada a vacinação para este agente⁹⁰.

3.1.4.2. Hidratação

A complicação renal mais frequente da drepanocitose é a incapacidade de concentração máxima da urina: a isostenúria¹²⁰. Como resultado desta alteração, os doentes com drepanocitose são mais susceptíveis a desidratação, que é um factor desencadeante de fenómenos vasoclusivos. Está recomendado um aumento do consumo de água para compensar a perda de líquidos promovida pela isostenúria⁹⁰.

3.1.4.3. Ácido Fólico

A administração de folato (1 mg/kg) tem sido preconizada em crianças com drepanocitose⁹⁰. A utilização de suplementos de ácido fólico pretende impedir a sua deficiência desencadeada pelo aumento de eritropoiese em resposta a hemólise crónica¹²¹. No entanto, a suplementação de folato não demonstrou benefício clínico na comparação com placebo num ensaio clínico em 117 crianças com drepanocitose¹²². Assim, não está indicada a suplementação de ácido fólico a todas as crianças com drepanocitose.

3.1.4.4. Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina II

A utilização de captopril num pequeno ensaio clínico mostrou reduzir a microalbuminúria em 37 % quando comparado com placebo¹²³. No entanto, não existem dados sobre se esta redução se traduz numa diminuição das complicações renais e sistémicas da drepanocitose.

3.2. Terapêuticas Experimentais

O conhecimento mais profundo das alterações fisiopatológicas na drepanocitose tem permitido o estudo de novas moléculas e a procura de novas indicações para fármacos já conhecidos.

3.2.1. Ácidos Gordos de Cadeia Curta

Os níveis de HbF mostraram ser factor de prognóstico em doentes com drepanocitose². Este facto levou à procura de formas de aumentar a concentração desta molécula e levantou o interesse na identificação de novos estimuladores da sua síntese.

Nos recém nascidos, a HbF é gradualmente substituída por HbA como resultado da expressão de β -globina em vez de γ -globina. Esta substituição ocorre à 12.^a semana de vida.

A cadeia γ -globina em cultura de células progenitoras eritróides de doentes com drepanocitose pode ser aumentada com a adição de butirato de sódio ou ácido amino-n-butírico¹²⁴. Em estudos clínicos, quer a administração oral de fenilbutirato de sódio quer a administração endovenosa de butirato de arginina mostraram aumentar a produção de HbF nos doentes com drepanocitose^{125,126,127}. A elevação dos níveis de HbF ocorre devido ao aumento da tradução do ARN mensageiro da γ -globina¹²⁸.

No entanto, apesar de já terem sido demonstrado o aumento da concentração de HbF com a utilização de ácidos gordos de cadeia curta, desconhece-se o seu impacto na clínica e no prognóstico dos doentes. Torna-se necessária a realização de estudos clínicos adequados que avaliem estes parâmetros para recomendar o seu uso.

3.2.2. 5-azacitadina e Decitabina

A 5-azacitabina, um anti-neoplásico que inibe a metilação do ADN, foi o primeiro fármaco que mostrou modular a síntese de HbF em animais. No entanto, deixou de ser utilizado devido ao seu potencial carcinogénico.

A decitabina é um análogo da 5-azacitabina mais seguro que num pequeno número de doentes resistentes à acção da hidroxiureia mostrou aumentar a concentração de Hb total e de HbF¹²⁹. No entanto, dada a inexistência de estudos mais alargados, não é possível estabelecer o papel deste fármaco na terapêutica da drepanocitose.

3.2.3. Fármacos que actuam nos Canais Iónicos

A desidratação tem um papel na falciformização eritrocitária ao aumentar a concentração de hemoglobina intracelular. O fluxo de iões e água para fora da célula processa-se através dos canais de Gardos e de K^+ -Cl⁻, pelo que se procuram formas de bloquear estes canais.

O clotrimazole, um antifúngico, bloqueia o canal de Gardos e reduz a densidade eritrocitária aumentando o conteúdo intracelular em potássio em doentes com drepanocitose^{130,131}. No entanto, este fármaco tem toxicidade hepática dependente da dose administrada, pelo que a sua utilização não pode ainda ser preconizada.

O ICA-17043, por sua vez, é um bloqueador dos canais iónicos eritrocitários desenvolvido a partir da estrutura química do clotrimazole. Em eritrócitos humanos isolados e em modelos animais inibe a actividade do

canal de Gardos e a desidratação intracelular¹³². Encontra-se actualmente em ensaios clínicos de fase III¹³³.

No contexto da diminuição da desidratação intra-eritrocitária, o transportador K-Cl tem sido também alvo de atenção. O aumento dos níveis de Mg^{2+} no eritrócito é um mecanismo de bloqueio deste sistema¹³⁴ e a suplementação oral com este sal reduz a desidratação celular em doentes com drepanocitose¹³⁵. O principal efeito adverso relatado é a diarreia, que atinge uma percentagem significativa dos doentes, pelo que esta não é uma alternativa terapêutica que possa, pelo menos ainda, ser recomendada.

3.2.4. Monóxido de Azoto

Os efeitos do NO na adesão endotelial, na actividade leucocitária e plaquetar e na isquémia induzida pela polimerização (ver acima), fazem admitir que esta molécula possa ter um papel na terapêutica da drepanocitose. O pulmão é um dos órgãos lesados pelas perturbações do metabolismo deste gás. A redução do NO exalado está associada à predisposição para episódios de síndrome torácico agudo¹³⁶.

A inalação de NO em modelos animais de síndrome torácico agudo reduz o aumento previsível dos leucócitos e proteínas broncoalveolares¹³⁷. A administração inalatória de NO nas crianças com drepanocitose em crise vasoclusiva aguda melhora subjectivamente as queixas de dor e associa-se a um menor uso de opióides¹³⁸. Estes resultados são encorajadores mas são necessários mais estudos nesta área com maior número de doentes.

As concentrações de L-arginina estão também diminuídas durante os episódios de síndrome torácico agu-

do¹³⁹. A administração de arginina oral a doentes com drepanocitose diminui significativamente a pressão sistólica na artéria pulmonar¹⁴⁰. No entanto, os estudos efectuados envolveram pequenos grupos de doentes, pelo que é prematuro recomendar a sua utilização com base nestas conclusões.

3.2.5. Fármacos que interferem com a adesão endotelial

O endotélio tem nesta patologia um papel pró-coagulante, pró-inflamatório e pró-adesivo. Desta forma, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas diversas acções do endotélio poderão funcionar como alvos de acção farmacológica.

A sulfazalazina inibe o NF- κ B¹⁴¹ que, por sua vez, modula a resposta inflamatória endotelial. Este fármaco, quando administrado a doentes com drepanocitose diminui a expressão de VCAM, ICAM, e E-selectina nas células endoteliais circulantes. Com vista a uma possível utilização desta abordagem terapêutica são necessários estudos que comprovem o seu benefício clínico.

Os glicocorticóides também inibem o NF- κ B, reduzem a produção de citocinas e mostraram reduzir a duração da terapêutica analgésica em doentes em crise vasoclusiva. No entanto, a sua administração relaciona-se com recorrências mais frequentes das crises¹⁴². A sua utilização é ainda limitada pelos seus efeitos adversos, como a susceptibilidade à infecção e pela necessidade de desmame terapêutico.

O factor de *von Willenbrand* e a trombospondina são importantes mediadores na interacção entre as células SS e o endotélio e ligam-se a este tecido através dos receptores $\alpha V\beta 3$. A

utilização de anticorpos monoclonais para esta integrina diminui a oclusão vascular no mesentério do rato com drepanocitose¹⁴³, faltando mostrar os potenciais benefícios clínicos.

O reconhecimento do papel da hipercoagulabilidade na patogênese dos fenómenos vasoclusivos levou a questionar o papel da heparina. Ela inibe a adesão eritrócito-endotélio pela inibição da selectina P *in-vitro*¹⁴⁴, mas carece de ensaios clínicos que comprovem o seu benefício nos doentes com drepanocitose.

Os anti-agregantes plaquetares surgiram inicialmente como fármacos promissores, dado o papel da agregação plaquetar na fisiopatologia dos fenómenos oclusivos. No entanto, a administração de anti-agregantes plaquetares nos doentes com anemia falciforme não mostrou o benefício destes agentes na prevenção ou tratamento da crise vasclusiva^{145,146}, pelo que o seu uso não pode ser recomendado.

3.2.6. Poloxamer 188

O Poloxamer 188 é um polímero surfactante não iónico que melhora o fluxo da microcirculação e diminui a viscosidade sanguínea, a trombose e a inflamação por um mecanismo não completamente esclarecido^{147,148}. Este fármaco mostrou-se eficaz, num estudo piloto realizado em doentes com drepanocitose: diminuiu a duração das crises e a utilização de analgésicos¹⁴⁹. Num ensaio clínico com um maior número de doentes, o poloxamer 188 mostrou ser um fármaco seguro, e embora a sua utilização se tenha relacionado com uma diminuição na duração dos episódios, essa associação foi mais significativa em crianças e em doentes em terapêutica

concomitante com hidroxiureia¹⁵⁰. Torna-se importante o estudo do poloxamer 188 em estudos prospectivos nestas populações.

3.2.7. Eritropoietina

A eritropoietina, quando administrada a animais aumentou a produção de HbF por estimulação dos progenitores eritróides que produzem este tipo de proteína^{151,152}. A eritropoietina humana recombinante também estimula a produção de HbF e melhora as características reológicas dos eritrócitos quando administrada alternadamente com hidroxiureia a doentes com drepanocitose¹⁵³.

Por outro lado, os estudos realizados em doentes drepanocíticos com insuficiência renal sugerem que as necessidades de eritropoietina destes doentes são superiores quando comparadas com doentes com insuficiência renal sem drepanocitose¹⁵⁴.

Alguns estudos realizados *in vitro* sugeriram que a utilização de eritropoietina pode aumentar os níveis de HbF¹⁵⁵. O aumento desta proteína na maioria dos estudos realizados com a administração de hidroxiureia traduziu-se numa melhoria em termos de sobrevida¹⁵⁶. No entanto, a resposta da HbF à administração de eritropoietina, foi variável em diversos ensaios realizados. É provável que a eritropoietina possa ser utilizada como potenciador do efeito da hidroxiureia¹⁵⁷.

A administração de eritropoietina está associada a um aumento do risco de trombose em doentes com condições pro-coagulantes, como as neoplasias, daí que exista uma preocupação com esta terapêutica em doentes com drepanocitose. Actualmente, não

existem dados suficientes acerca do risco de trombose nestes doentes.

3.2.8. *Terapêutica génica*

O objectivo da terapêutica génica centra-se na redução do impacto clínico da doença através da transfecção viral em células estaminais hematopoiéticas, que sintetizam cadeias de β -globina que não tenham capacidade de falciformizar. Esta terapêutica é muito promissora podendo ter vantagens relativamente ao transplante de células hematopoiéticas por poder obviar algumas das restrições e da morbilidade que lhe estão associadas.

A terapêutica génica implica a extracção de células estaminais da sua localização habitual, a cultura destas células com o vector de transfecção do gene, a ligação eficaz do vector à célula e a posterior transfecção do gene para o núcleo celular^{158,159}. Deste modo, existem diversos passos a controlar neste processo, pelo que o progresso tem sido lento¹⁶⁰.

Actualmente, procuram-se as células estaminais óptimas para esta técnica que parecem ser as células sanguíneas do cordão umbilical¹⁶¹ ou as células estaminais circulantes colhidas após estimulação com factores de crescimento¹⁶². Procura-se também identificar o vector ideal para a transfecção génica. Inicialmente, foram utilizados onco-retrovírus que acarretavam alguns problemas de instabilidade e variabilidade na expressão do gene da β -globina. Os lentivírus, estudados mais recentemente parecem ter maior eficácia na transfecção¹⁶³. Outro aspecto reside na necessidade de expansão das células transfectadas para que exista uma quantidade suficiente de HbA

para evitar a falciformização¹⁶⁴. Por fim, é necessário garantir a estabilidade da expressão do gene transfectado. Apesar dos progressos alcançados, esta terapêutica não atingiu ainda o sucesso na cura da doença e mantém-se com carácter experimental. A transfecção do gene da β -globina está a ser alvo de um ensaio clínico de fase I/II em doentes com β - β -talassémia, mas não em doentes com drepanocitose¹⁶⁵.

A terapêutica génica parece desta forma ser uma realidade ainda distante dado que faltam controlar múltiplas variáveis. No entanto, grande parte da esperança da cura da drepanocitose reside nesta abordagem terapêutica.

4. CONCLUSÃO

A actual terapêutica da drepanocitose baseia-se em grande parte em medidas de suporte, de alívio dos sintomas e de prevenção das complicações.

A clarificação dos mecanismos patogénicos pode identificar novos alvos terapêuticos capazes de aumentar a sobrevivência destes doentes e simultaneamente melhorar a qualidade de vida. O maior conhecimento dos fenómenos vasoclusivos, em particular, dos mediadores envolvidos na adesão do eritrócito ao endotélio e dos mecanismos das trocas iónicas ao nível da membrana eritrocitária possibilitaram o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. No entanto, a maior expectativa para a modificação da história natural da doença permanece na terapêutica génica, mas o caminho a percorrer para atingir este objectivo parece-nos ainda longínquo.

BIBLIOGRAFIA

1. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, *et al.* Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; 330:1639-44.
2. Steinberg MH, Barton F, Castro O *et al.* Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA*. 2003; 289:1645-51.
3. Kumar A, Eckmann JR, Swerlick RA, Wick TM. Phorbol ester stimulation increase sickle erythrocyte adherence to endothelium: a novel pathway involving $\alpha 4\beta 1$ integrin receptors on sickle reticulocytes and fibronectin. *Blood* 1996; 88: 4348-58.
4. Gee BE, Platt OS. Sick cell reticulocytes adhere to VCAM-1. *Blood* 1995; 85:268-74.
5. Hillery CA, Du MC, Montgomery RR, Scott JP. Increased adhesion of erythrocytes to components of the extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin. *Blood* 1996; 87: 4879-86.
6. Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Heibel RP. Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood* 1992; 80:2634-42.
7. Brittain JE, Mlinar KJ, Anderson CS, Orringer EP, Parise LV. Integrin-associated protein is an adhesion receptor on sickle red blood cells for immobilized thrombospondin. *Blood* 2001; 97:2159-64.
8. Manodori AB, Barabino GA, Lubin BH, Kuypers FA. Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. *Blood* 2000; 95:1293-300.
9. Hines PC, Zen Q, Burney SN *et al.* Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM-Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. *Blood* 2003; 101:3281-87.
10. Stuart MJ, Nagel RL. Sick cell disease. *Lancet* 2004; 364:1343-60.
11. Schroit AJ, Zwaal RFA. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1071:313-29.
12. Tait JF, Gibson D. Measurement of membrane phospholipids asymmetry in normal and sickle-cell erythrocytes by means of annexin V binding. *J Lab Clin Med* 1994; 123:741-8.
13. Tanaka Y, Schroit, AJ. Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red cells. Recognition by autologous macrophages. *J. Biol. Chem* 1983; 258:11335-3.
14. McEvoy LP, Schlegel RA. Membrane phospholipids asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1986; 83:3311-5.
15. Setty BN, Kulkarni S, Rao AK, Stuart MJ. Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation. *Blood* 2000; 96:1119-24.
16. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89:1121-32.
17. Franck PFH, Bevers EM, Lubin BH *et al.* Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer: the cause of accelerated phospholipids flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickle cells. *J Clin Invest* 1985; 75:183-90.
18. Eaton WA, Hofrichter J, Hemoglobin S gelation and sickle cell disease, *Blood* 1987; 70:1245-66.
19. Brugnara C, Bunn HF, Tosteson DC. Regulation of erythrocyte cation and water content in sickle cell anemia. *Science* 1986; 232: 388-90.
20. Canessa M, Spalvins A, Nagel RL. Volume-dependent and NEM-stimulated K_{Cl} transport is elevated in oxygenated SS, SC and CC human red cells. *FEBS Lett* 1986; 200: 197-220.
21. Bunn HF. Mechanisms of Disease: Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 1997; 337:762-9.
22. Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH *et al.* Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *N Engl J Med* 2000; 342:83-89.
23. Benkerrou M, Delarche C, Brahim L *et al.* Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H2O2 production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood* 2002; 99: 2297-303.
24. Lard LR, Mul FP, de Haas M, Roos D, Duits AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leukoc Biol* 1999; 66:411-5.
25. Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC *et al.* Blood polymorphonuclear leucocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 1998; 91:266-74.
26. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leucocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3047-51.
27. Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 1997; 129:507-16.
28. Setty BN, Rao AK, Stuart MJ. Thrombophilia in sickle the red cell connection. *Blood* 2001; 98:3228-33.
29. Lindmark E, Tenno T, Siegbahn A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2322-8.
30. Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 2001; 137:398-407.
31. Browne PV, Mosher DF, Steinberg MH, Heibel RP. Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. *Am J Hematol* 1996; 51:296-301.
32. Sowemimo-Coker SO, Meiselman HJ, Francis RB Jr. Increased circulating endothelial cells in sickle cell crises. *Am J Hematol* 1989; 31:2635.
33. Solovey A, Gui L, Key NS, Heibel RP. Tissue factor endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 1998; 101:1899-904.
34. Kurantsin-Mills J, Ofosu FA, Safa TK, Siegel RS, Lessin LS. Plasma factor VII and thrombin-anti-thrombin III levels indicate increased tissue factor activity in sickle cell patients. *Br J Haematol*. 1992; 81:539-44.
35. Westerman MP, Green D, Gilman-Sachs A *et al.* Antiphospholipid antibodies, protein C and S, and coagulation changes in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 1999; 134:352-62.
36. Carveth HJ, Shaddy RE, Whatley RE, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Regulation of platelet-activating factor (PAF) synthesis and PAF-mediated neutrophil adhesion to endothelial

- cells activated by thrombin. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18:126-34.
37. Sugama Y, Tiruppathi C, Janakidevi K, Andersen TT, Fenton JW, Malik AB. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: A mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol* 1992; 119: 935-44.
 38. Lum H, Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 1994; 267: L223-41.
 39. Styles L, de Jong K, Vichinsky E, Lubin B, Adams R, Kuypers F. Increased RBC phosphatidylserine exposure in sickle cell disease patients at risk for stroke by transcranial Doppler screening. [abst.] *Blood* 1997; 90:604a.
 40. Peters M, Plaat BE, ten Cate H, Wolters HJ, Weening RS, Brandjes DP. Enhanced thrombin generation in children with sickle cell disease. *Thromb Haemost* 1994; 71: 169-72.
 41. Cacciola E, Giustolisi R, Musso R, Longo A, Cacciola E. Antithrombin III concentrate for the treatment of chronic leg ulcers in sickle cell β -thalassemia: a pilot study. *Ann Intern Med* 1989; 111:534-6.
 42. De Ceulaer K, Khamashta MA, Harris EN, Sergeant GR, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies in homozygous sickle cell disease. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:671-2.
 43. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in Sickle Cell Disease: A Curious Paradox. *Am J Med* 2003; 115:721-8.
 44. Freedman ML, Karpatikin S. Elevated platelet count and megathrombocyte number in sickle cell anemia. *Blood* 1975; 46:579-82.
 45. Haut MJ, Cowan DH, Harris JW. Platelet function and survival in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 1973; 82:44-53.
 46. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine and Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-12.
 47. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12 Suppl 5:S115-8.
 48. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:4651-5.
 49. Schechter AN, Gladwin MT. Hemoglobin and the Paracrine and Endocrine Functions of Nitric Oxide. *N Engl J Med* 2003; 348:1483-5.
 50. Huang KT, Han TH, Hyduke DR *et al.* Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:11771-6.
 51. McMahon TJ, Moon RE, Luschinger BP *et al.* Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med* 2002; 8: 711-7.
 52. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002; 8:1383-9.
 53. Eberhardt RT, McMahon L, Duffy SJ *et al.* Sickle cell anemia is associated with reduced nitric oxide bioactivity in peripheral conduit and resistance vessels. *Am J Hematol*. 2003; 74:104-11.
 54. Schnog JJ, Jager EH, van der Dijs FP *et al.* Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2004; 83:371-5.
 55. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M *et al.* Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005; 294: 81-90.
 56. Aslan M, Ryan TM, Townes TM *et al.* Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem* 2003; 278:4194-204.
 57. Lopez BL, Davis-Moon L, Ballas SK, Ma XL. Sequential nitric oxide measurements during the emergency department treatment of acute vasoocclusive sickle cell crisis. *Am J Hematol* 2000; 64:15-9.
 58. Sherwood JB, Goldwasser E, Chilcote R, Carmichael LD, Nagel RL. Sickle cell anemia patients have low erythropoietin levels for their degree of anemia. *Blood* 1986; 67:46-9.
 59. Goldberg MA, Brugnara C, Dover GJ, Schapira L, Charache S, Bunn HF. Treatment of sickle cell anemia with hydroxyurea and erythropoietin. *N Engl J Med* 1990; 323:366-72.
 60. Goldberg MA, Brugnara C, Dover GJ, Schapira L, Lacroix L, Bunn HF. Hydroxyurea and erythropoietin therapy in sickle cell anemia. *Semin Oncol* 1992; 19(3 Suppl 9):74-81.
 61. el-Hazmi MA, al-Momen A, Warsy AS *et al.* The pharmacological manipulation of fetal haemoglobin: trials using hydroxyurea and recombinant human erythropoietin. *Acta Haematol* 1995; 93:57-61.
 62. Malave I, Perdomo Y, Escalona E *et al.* Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. *Acta Haematol* 1993; 90(4):172-6.
 63. Brown MD, Wick TM, Eckman JR. Activation of vascular endothelial cell adhesion molecule expression by sickle blood cells. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20:47-72.
 64. Deng W, Thiel B, Tannenbaum CS, Hamilton TA, Stuehr DJ. Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1993; 151:322-9.
 65. Johnson FL, Look AT, Gockerman J, Ruggiero MR, Dalla-Pozza L, Billings FT. Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 1984; 311:780.
 66. Vermynen C, Cornu G, Philippe M *et al.* Bone marrow transplantation in sickle cell anaemia. *Arch Dis Child* 1991; 66:1195.
 67. Walters MC, Patience M, Leisenring W *et al.* Bone marrow transplantation for sickle cell disease. *N Engl J Med* 1996; 335:369-76.
 68. Bernaudin F, Souillet G, Vannier Jp *et al.* Report of the French experience concerning 26 children transplanted for severe sickle cell disease. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(suppl 2):112-5.
 69. Vermynen C, Cornu G, Ferster A *et al.* Haematopoietic stem cell transplantation for sickle cell anaemia: the first 50 patients transplanted in Belgium. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:1-6.
 70. Walters MC, Storb R, Patience M *et al.* Impact of bone marrow transplantation for symptomatic sickle cell disease: an interim report. *Blood* 2000; 95:1 918-24.
 71. Piomelli S. Sickle cell diseases in the 1990s: the need for active and preventive intervention. *Semin Hematol* 1991; 28:227.
 72. Walters MC, Patience M, Leisenring W *et al.* Multicenter Investigation of Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle cell anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7:665-73.

73. Andreani M, Nesci S, Lucarelli G *et al.* Long-term survival of ex-thalassemic patients with persistent mixed chimerism after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:401-4.
74. Wu CJ, Gladwin MT, Krishnamurti L *et al.* Mixed chimerism following nonmyeloablative stem cell transplantation for sickle cell disease prevents intravascular hemolysis and restores endothelial function [abstract]. *Blood* 2004; 104:467a.
75. Wu CJ, Krishnamurti L, Kutok JL *et al.* Evidence for ineffective erythropoiesis in patients with severe sickle cell anemia [abstract]. *Blood* 2004; 104:33a.
76. Iannone R, Casella JF, Fuchs EJ *et al.* Results of minimally toxic nonmyeloablative transplantation in patients with sickle cell anemia and beta-thalassemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9:519-28.
77. Schleunig M, Stoetzer O, Waterhouse C, Schlemmer M, Ledderose G, Kolb HJ. Hematopoietic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning as treatment of sickle cell disease. *Exp Hematol* 2002; 30:7-10.
78. van Besien K, Bartholomew A, Stock W *et al.* Fludarabine based conditioning for allogeneic transplantation in adults with sickle cell disease. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:445-9.
79. Krishnamurti L, Blazar BR, Wagner JE. Bone marrow transplantation without myeloablation for sickle cell disease. *N Engl J Med* 2001; 344:68.
80. Horan JT, Liesveld JL, Fenton P, Blumberg N, Walters MC. Hematopoietic stem cell transplantation for multiply transfused patients with sickle cell disease and thalassemia after low-dose total body irradiation, fludarabine, and rabbit antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35:171-7.
81. Sullivan KM, Parkman R, Walters MC. Bone Marrow Transplantation for Non-Malignant Disease. *Hematology* 2000; 2000:319-38.
82. Gaziev D, Galimberti M, Lucarelli G *et al.* Bone marrow transplantation from alternative donors for thalassemia: HLA-phenotypically identical relative and HLA-nonidentical sibling or parent transplants. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:815-21.
83. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995; 346:214.
84. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chamhard A *et al.* Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997; 337:373-81.
85. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML *et al.* Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996; 335:157-66.
86. Minihero R, Rocha V, Saracco P *et al.* Cord blood transplantation (CBT) in hemoglobinopathies. Eurocord. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:S78-9.
87. Vichinsky E, ed. Transfusion-related iron overload in sickle cell anemia. *Seminars in hematology*, ed. NS Young and P Beris. Vol 38:1-5, 14-23. Philadelphia, PA: Harcourt Health Sciences, 2001.
88. Styles LA, Vichinsky E. Effects of a long-term transfusion regimen on sickle cell-related illnesses. *J Pediatr* 1994; 125:909-11.
89. Ohene-Frempong K. Indications for red cell transfusion in sickle cell disease. *Sem Hematol* 2001; 38:5-13.
90. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, and Division of Blood Diseases and Resources. The management of sickle cell disease. Bethesda, MD: NIH. (NIH Publication No 02-2117.)
91. Hassell KL, Eckman JR, Lane PA. Acute multiorgan failure syndrome: a potentially catastrophic complication of severe sickle cell pain episodes. *Am J Med* 1994; 96:155-62.
92. Vichinsky E. Consensus document for transfusion-related iron overloads. *Sem Hematol* 2001; 38:2-4.
93. Singer ST, Quirolo K, Nishi K, Hackney-Stephens E, Evans C, Vichinsky EP. Erythrocytapheresis for chronically transfused children with sickle cell disease: an effective method for maintaining a low hemoglobin S level and reducing iron overload. *J Clin Apheresis* 1999; 14:122-5.
94. Schmalzer EA, Lee JO, Brown AK, Usami S, Chion S. Viscosity of mixtures of sickle cells and normal red cells at varying hematocrit levels: implications for transfusion. *Transfusion* 1987; 1987:228-33.
95. Rosse WF, Telen M, Ware R. *Transfusion Support for Patients with Sickle Cell Disease*. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 1998.
96. Vichinsky EP, Haberkern CM, Neumayr L *et al.* A comparison of conservative and aggressive transfusion regimens in the perioperative management of sickle cell disease. The Preoperative Transfusion in Sickle Cell Disease Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333:206-13.
97. Koshy M, Burd L, Wallace D, Moawad A, Baron J. Prophylactic red-cell transfusions in pregnant patients with sickle cell disease. A randomized cooperative study. *N Engl J Med* 1988; 319:1447-52.
98. DeSimone J, Heller P, Hall L, Zwiers D. 5-Azacytidine stimulates fetal haemoglobin synthesis in anemic baboons. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 4428.
99. Charache S, Dover GJ, Smith KD, Talbot CC. Treatment of sickle cell anemia with 5-azacytidine results in increased fetal haemoglobin production and is associated with non-random hypomethylation of DNA around the γ - δ - β globin gene complex. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80:4842.
100. Charache S, Terrin ML, Moore RD *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 1995; 332:1317-22.
101. Charache S, Barton FB, Moore RD *et al.* Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *Medicine (Baltimore)* 1996; 75:300-26.
102. Adragna NC, Fonseca P, Lauf PK. Hydroxyurea affects cell morphology, cation transport, and red blood cell adhesion in cultured vascular endothelial cells. *Blood* 1994; 83:553-60.
103. Nahavandi M, Tavakkoli F, Wyche MQ, Perlin E, Winter WP, Castro O. Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Br J Haematol* 2002; 119:855-7

104. Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J *et al.* Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25:629-34.
105. Conran N, Oresco-Santos C, Acosta HC, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. *Br J Haematol* 2004; 124:547-54.
106. Ikuta T, Ausenda S, Cappellini MD. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:1847-52.
107. Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Hematology* 2004; 9:61-4.
108. DePass LR, Weaver EV. Comparison of teratogenic effects of aspirin and hydroxyurea in the Fisher 344 and Wistar strains. *J Toxicol Environ Health* 1982; 10:297-305.
109. Jackson N, Shukri A, Ali K. Hydroxyurea treatment for chronic myeloid leukaemia during pregnancy. *Br J Haematol* 1993; 85:203-4.
110. Fruchtman SM, Kaplan ME, Peterson P, Mark K, Berg PD, Wasserman LR. Acute leukaemia (AL), hydroxyurea (HU), and polycythemia vera (PV): an analysis of risk from the Polycythemia Vera Study Group. *Blood* 1994; 84:581a. abstract.
111. Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics* 1989; 84:500-8.
112. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ *et al.* Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative study of sickle cell disease. *Blood* 1995; 86:776-83.
113. Lottenberg R, Hassell KL. An evidence-based approach to the treatment of adults with sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005; 58-65.
114. Riddinton C, Owusu-Ofori S. Prophylactic antibiotics for preventing pneumococcal infection in children with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; cd003427.
115. Bjornson AB, Falletta JM, Verter JI *et al.* Serotype specific immunoglobulin G antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in children with sickle cell anemia: effects of continued penicillin prophylaxis. *J Pediatr* 1996; 129:828-35.
116. Fiore A, Levine O, Elliott J, Facklam R, Butler J. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine for preschool-age children with chronic disease. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:828-31.
117. John AB, Ramlal A, Jackson H, Maude GH, Waight-Sharma A, Serjeant GR. Prevention of pneumococcal infection in children with homozygous sickle cell disease. *BMJ* 1984; 288:1567-70.
118. Gaston MH, Verter JI, Woods G *et al.* Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. A randomized trial. *N Engl J Med* 1986; 314:1593-9.
119. Falletta JM, Woods GM, Verter JI *et al.* Discontinuing penicillin prophylaxis in children with sickle cell anemia. Prophylactic Penicillin Study II. *J Pediatr* 1995; 27:685-90.
120. Allon M. Renal abnormalities in sickle cell disease. *Arch Intern Med* 1990; 150:501-4.
121. Lindenbaum J. Folic acid requirement in situations of increased need. In: Workshop on Human Folate Requirements, ed. Folic acid: biochemistry and physiology in relation to the human nutrition requirement. Washington, D.C.: National Academy of Sciences 1977; 256-76.
122. Rabb LM, Grandison Y, Mason K, Hayes RJ, Serjeant B, Serjeant GR. A trial of folate supplementation in children with homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol* 1983; 54:589-94.
123. Foucan L, Bourhis V, Bangou J, Merault L, Etienne-Julan M, Salmi RL. A randomized trial of captopril for microalbuminuria in normotensive adults with sickle cell anemia. *Am J Med* 1998; 104:339-42.
124. Perrine SP, Miller BA, Faller DV *et al.* Sodium butyrate enhances fetal globin gene expression in erythroid progenitors of patients with Hb SS and beta thalassemia. *Blood* 1989; 74:454-9.
125. Atweh GF, Sutton M, Nassif I *et al.* Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in SCD. *Blood* 1999; 93:1790-7.
126. Sher GD, Ginder GD, Little J, Yang S, Dover GJ, Olivieri NF. Extended therapy with intravenous arginine butyrate in patients with beta-hemoglobinopathies. *N Engl J Med* 1995; 332:1606-10.
127. Dover GJ, Brusilow S, Charache S. Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood* 1994; 84: 339-43.
127. Weinberg RS, Ji X, Sutton M *et al.* Butyrate increases the efficiency of translation of gamma-globin mRNA. *Blood* 2005; 15; 105:1807-9.
129. DeSimone J, Koshy M, Dorn L *et al.* Maintenance of elevated fetal hemoglobin levels by decitabine during dose interval treatment of sickle cell anemia. *Blood* 2002; 99:3905-8.
130. Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL. Inhibition of Ca(2+)-dependent K+ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest* 1993; 92:520-6.
131. Brugnara C, Gee B, Armsby CC *et al.* Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest* 1996; 97:1227-34.
132. Stocker JW, De Franceschi L, McNaughton-Smith GA, Corrocher R, Beuzard Y, Brugnara C. ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice. *Blood* 2003; 101:2412-8.
133. <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00102791>, consulta a 24 de Fevereiro de 2007.
134. Brugnara C, Tosteson DC. Inhibition of K transport by divalent cations in sickle erythrocytes. *Blood* 1987; 70:1810-5.
135. De Franceschi L, Bachir D, Galacteros F *et al.* Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest* 1997; 100:1847-52.
136. Sullivan KJ, Kissoon N, Duckworth LJ *et al.* Low exhaled nitric oxide and a polymorphism in the NOS1 gene is associated with acute chest syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:2186-90.
137. de Franceschi L, Baron A, Scarpa A *et al.* Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. *Blood* 2003; 102:1087-96.

138. Weiner DL, Hibberd PL, Betit P, Cooper AB, Botelho CA, Brugnara C. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA* 2003; 289:1136-42.
139. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22:515-20.
140. Morris CR, Morris SM Jr, Hagar W et al. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:63-9.
141. Solovey AA, Solovey AN, Harkness J, Hebbel RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood* 2001; 97:1937-41.
142. Griffin TC, McIntire D, Buchanan GR. High-dose intravenous methylprednisolone therapy for pain in children and adolescents with sickle cell disease. *N Engl J Med* 1994; 330:733-7.
143. Kaul DK, Tsai HM, Liu XD, Nakada MT, Nagel RL, Collier B. Monoclonal antibodies to alphaV-beta3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. *Blood* 2000; 95:368-74.
144. Matsui NM, Varki A, Embury SH. Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin. *Blood* 2002; 100:3790-6.
145. Semple MJ, Al-Hasani SF, Kioy P, Savidge GF. A double-blind trial of ticlopidine in sickle cell disease. *Thromb Haemost* 1984; 51:303-6.
146. Greenberg J, Ohene-Frempong K, Halus J, Way C, Schwartz E. Trial of low doses of aspirin as prophylaxis in sickle cell disease. *J Pediatr* 1983; 102:781-4.
147. Armstrong JK, Meiselman HJ, Fisher TC. Inhibition of red blood cell-induced platelet aggregation in whole blood by a nonionic surfactant, poloxamer 188 (RheothRx injection). *Thromb Res* 1995; 79:437-50.
148. Grover FL, Kahn RS, Heron MW, Paton BC. A nonionic surfactant and blood viscosity. Experimental observations. *Arch Surg* 1973; 106:307-10.
149. Adams-Graves P, Kedar A, Koshy M et al. RheothRx (poloxamer 188) injection for the acute painful episode of sickle cell disease: a pilot study. *Blood* 1997; 90:2041-6.
150. Orringer EP, Casella JF, Ataga KI et al. Purified poloxamer 188 for treatment of acute vaso-occlusive crisis of sickle cell disease: A randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 286:2099-106.
151. Umemura T, Al-Khatti A, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Fetal hemoglobin synthesis in vivo: direct evidence for control at the level of erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:9278-82.
152. Umemura T, al-Khatti A, Donahue RE, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Effects of interleukin-3 and erythropoietin on in vivo erythropoiesis and F-cell formation in primates. *Blood* 1989; 74:1571-6.
153. Rodgers GP, Dover GJ, Uyesaka N, Noguchi CT, Schechter AN, Nienhuis AW. Augmentation by erythropoietin of the fetal-hemoglobin response to hydroxyurea in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1993; 328:73-80.
154. Roger SD, Macdougall IC, Thuraisingham RC, Raine AE. Erythropoietin in anemia of renal failure in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1369-70.
155. McGlave PB, Zanjani ED. Erythropoietin and haemoglobin switching. *Tex Rep Biol Med* 1980; 40:125-35.
156. Brttenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the haemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood* 1985; 65:183-9.
157. Little JA, McGowan VR, Kato GJ et al. Combination erythropoietin-hydroxyurea therapy in sickle cell disease: experience from the National Institute of Health and a literature review. *Haematologica* 2006; 91:1076-83.
158. Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 2001; 294:2368-71.
159. Walters MC. Stem Cell Therapy for Sickle Cell Disease: Transplantation and Gene Therapy. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2005; 66-73.
160. Bank A. Hematopoietic stem cell gene therapy: selecting only the best. *J Clin Invest* 2003; 112:1478-80.
161. Imren S, Fabry ME, Westerman KA et al. High-level betaglobin expression and preferred intragenic integration after lentiviral transduction of human cord blood stem cells. *J Clin Invest* 2004; 114:953-62.
162. Persons DA, Allay ER, Sawai N et al. Successful treatment of murine beta-thalassemia using in vivo selection of genetically modified, drug-resistant hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 102:506-13.
163. Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood* 2004; 104:3445-53.
164. Jin L, Siritanaratkul N, Emery DW et al. Targeted expansion of genetically modified bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:8093-7.
165. Bank A, Dorazio R, Leboulch P. A Phase I/II Clinical Trial of {beta}-Globin Gene Therapy for {beta}-Thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054:308-16.