

The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies

Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias

Maria de Fátima Sonati¹, Fernando Ferreira Costa²

Resumo

Objetivo: Sumarizar os dados disponíveis na literatura recente sobre os aspectos fisiopatológicos, de diagnóstico e tratamento das doenças falciformes e da talassemia β , hemoglobinopatias hereditárias de maior relevância nas populações.

Fontes dos dados: MEDLINE e SciELO, utilizando os termos hemoglobinopatias hereditárias, doenças falciformes e talassemia beta, no período de 2003 a maio de 2008. Dois livros e dois capítulos de livro foram também incluídos.

Síntese dos dados: Foram encontrados mais de 2.000 artigos, sendo selecionados aqueles de maior pertinência e amplitude.

Conclusões: As taxas de morbidade e a mortalidade das doenças falciformes e da talassemia β são ainda bastante expressivas e constituem importante desafio. Um maior conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos tem permitido avanços significativos nas formas de tratamento e prevenção dessas doenças.

J Pediatr (Rio J). 2008;84(4 Supl):S40-51: Hemoglobinopatias hereditárias, doenças falciformes, talassemia β .

Introdução

Anemia representa uma alteração muitas vezes observada no período neonatal e na infância, que pode levar a significativas morbidade e mortalidade^{1,2}. As causas são multifatoriais, mas, entre as mais freqüentes, encontram-se as doenças intrínsecas dos eritrócitos, especialmente as hemoglobinopatias¹⁻³. Estas representam as formas mais comuns de anemia hemolítica hereditária. Constituem um grupo de alterações autossômicas, na maioria das vezes recessivas, caracterizadas pela produção de hemoglobinas (Hb) estruturalmente anormais (as variantes da Hb) ou pelo desequilíbrio no ritmo de síntese das cadeias globínicas (as talassemias); com menor freqüência, ambos os fenótipos podem estar associados (presença concomitante de variante estrutural e de redução de síntese)³⁻⁶.

Abstract

Objective: To summarize recently published data on the pathophysiology, diagnosis and treatment of sickle cell diseases and β -Thalassemias, the most relevant hereditary hemoglobinopathies in the global population.

Sources: Searches were run on the MEDLINE and SCIELO databases, limited to the period from 2003 to May 2008, using the terms hereditary hemoglobinopathies, sickle cell diseases and β -thalassemia. Two books and two chapters were also included.

Summary of the findings: More than 2,000 articles were identified; those providing the most important information and broadest views were selected.

Conclusions: Morbidity and mortality rates from sickle cell diseases and β -thalassemia are still very high and represent an important challenge. Increased understanding of pathophysiological aspects has led to significant improvements in treatment and prevention of these diseases.

J Pediatr (Rio J). 2008;84(4 Suppl):S40-51: Hereditary hemoglobinopathies, sickle cell diseases, β -thalassemia.

As hemoglobinopatias estão entre as doenças monogênicas mais comumente encontradas nas populações, com mais de 1.000 diferentes alelos mutantes caracterizados em nível molecular⁷. As principais, do ponto de vista clínico, são as doenças falciformes (DF) e a talassemia β , que acometem populações originárias do continente africano, da Região Mediterrânea, do Sudeste Asiático e do Oriente Médio e Extremo Oriente⁸. Cerca de 1-2% da população mundial é composta de heterozigotos da Hb S e 3% de heterozigotos da talassemia β ⁹.

Historicamente, a maioria das crianças portadoras dessas doenças morria de suas complicações ainda durante a primeira década de vida. Recentes e importantes avanços têm, entretanto, estendido a vida média dos pacientes e melhorado significativamente sua qualidade de vida. Uma melhor

1. Livre-docente. Professora associada, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP.

2. Professor titular, Departamento de Clínica Médica, Unicamp, Campinas, SP. Pesquisador, Hemocentro, Unicamp, Campinas, SP.

Fonte financiadora: FAPESP (02/13801-7) e CNPq.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Como citar este artigo: Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(4 Supl):S40-51.

doi:10.2223/JPED.1802

compreensão da etiologia e dos mecanismos da anemia, o diagnóstico mais precoce, as novas abordagens terapêuticas e o melhor gerenciamento da sobrecarga de ferro transfusional têm alterado dramaticamente esses quadros¹⁰. O presente artigo sumariza os dados disponibilizados mais recentemente na literatura acerca dos aspectos fisiopatológicos, de diagnóstico e tratamento das DF e da talassemia β .

As hemoglobinopatias hereditárias

As Hb humanas são tetrâmeros globulares formados pela combinação de duas cadeias polipeptídicas (globinas) do "tipo α " (α ou ζ) com duas cadeias do "tipo β " (β , δ , ϵ , γ , δ ou ϵ). Cada cadeia está associada a um grupo prostético heme, que se liga reversivelmente à molécula de oxigênio (O_2), cumprindo assim a função primária da Hb, que é o transporte de O_2 dos pulmões para os tecidos periféricos¹¹⁻¹³.

A síntese de globinas está sob o controle de genes distintos, separados em dois agrupamentos (*clusters*); os genes que codificam as cadeias α e ζ (*cluster* α) estão localizados na região telomérica do braço curto do cromossomo 16 (16p 13.3), ao passo que aqueles que codificam as cadeias β , δ , γ e ϵ (*cluster* β) estão no braço curto do cromossomo 11 (11p 15.5). No período embrionário, são produzidas as Hb embrionárias Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland I ($\zeta_2\gamma_2$); no período fetal, estas são substituídas pela Hb fetal ou F ($\alpha_2\gamma_2$), que, por sua vez, dá lugar às Hb A ($\alpha_2\beta_2$) e A₂ ($\alpha_2\delta_2$) na vida adulta. Seis meses após o nascimento, a Hb A é absolutamente predominante, compondo mais de 95% do total da Hb celular, enquanto a A₂ se mantém em níveis entre 2-3%, e a fetal entre 0-2%¹¹⁻¹³.

Mutações que afetam os genes de globinas levam às hemoglobinopatias, que, genericamente, podem ser classificadas em dois grandes grupos: as alterações de estrutura, com a formação de Hb anômalas, e as alterações de síntese (talassemias), com a supressão parcial ou total de um ou mais tipos de cadeias; menos freqüentemente, esses dois fenótipos podem ocorrer em associação¹¹⁻¹³.

As hemoglobinopatias estruturais são, geralmente, causadas por substituições simples, pequenas inserções ou deleções de bases que afetam as regiões codificantes dos genes e levam à substituição de aminoácidos na cadeia protéica¹¹⁻¹³. Dentre elas, destaca-se a Hb S ($\alpha_2\beta^S_2$), uma variante que, na posição 6 da cadeia β , tem o ácido glutâmico substituído pela valina ($\beta^6 \text{Glu} \rightarrow \text{Val}$). Ela foi descrita por Linus Pauling et al., em 1949, como uma Hb encontrada nas hemácias de pacientes com anemia falciforme (AF), com migração eletroforética diferenciada daquela observada em indivíduos normais. A Hb S, em seu estado desoxigenado (desoxi-Hb S) e em concentração elevada, polimeriza, resultando em hemácias anormalmente rígidas e não deformáveis (hemácias falcizadas). Estas, por sua vez, levam à hemólise crônica e à vaso-oclusão, bases fisiopatológicas da doença^{5,14}.

As talassemias decorrem da diminuição ou ausência de produção de um ou mais tipos de cadeia globínica, levando ao

acúmulo do outro tipo cuja síntese está preservada. As cadeias em excesso são instáveis e precipitam, levando a alterações da membrana eritrocitária e à destruição precoce das células. Além disso, a hemoglobinizacão deficiente dos eritrócitos resulta em hipocromia e microcitose, anormalidades características deste grupo de doenças^{6,11,13,15-18}. As talassemias são classificadas em α , β , γ , δ , $\delta\beta$ e $\gamma\delta\beta$, conforme o(s) tipo(s) de cadeia cuja produção está prejudicada. As mais freqüentes são as talassemias α e β ; enquanto as primeiras são majoritariamente causadas por deleções que removem os genes α as talassemias β são geralmente resultantes de substituições de bases nos éxons, íntrons e regiões promotoras dos genes β ¹⁵⁻¹⁸. As hemoglobinopatias estão entre os polimorfismos genéticos selecionados positivamente pela malária^{19,20}. Por resultarem em alteração da estrutura e/ou função dos eritrócitos, conferem aos heterozigotos maior resistência à infecção pelo *Plasmodium falciparum* e, conseqüentemente, maior sobrevivência, particularmente das crianças, em áreas onde a malária é endêmica. Nessas regiões, os genes de hemoglobinopatias chegam a atingir freqüências extremamente elevadas. Os movimentos migratórios, seguidos de miscigenação, levam esses genes para outras regiões e para outras populações, caso dos países americanos e do Norte da Europa^{7,9}.

As doenças falciformes

Da homozigose do gene β^S (20 GAG \rightarrow GTG) decorre a AF, a primeira "doença molecular" descrita²¹. Uma única substituição de base no gene da globina β resulta em um conjunto de alterações celulares, teciduais e orgânicas conhecidas como efeitos pleiotrópicos do gene β^S .

Na molécula de Hb A, os resíduos externos são polares, conferindo solubilidade e prevenindo interações intermoleculares, ao passo que os internos são apolares, criando um ambiente no qual o O_2 pode ser ligado sem que a oxidação do heme ocorra. Tetrâmeros individuais dentro de uma hemácia não interagem uns com os outros. As hemácias são capazes de sofrer deformação, o que permite que elas atravessem a circulação e carreguem o O_2 para todos os tecidos do corpo. Quando a Hb S passa para a forma desoxigenada, a valina, ao invés do ácido glutâmico, que é polar, é exposta na superfície da cadeia β^S . Isto permite interações intermoleculares hidrofóbicas e polimerização da Hb. As hemácias contendo Hb S polimerizada são rígidas e indeformáveis, o que contribui para o processo de oclusão microvascular que leva os tecidos à isquemia e disfunção orgânica^{5,14}.

As complicações clínicas na AF incluem anemia hemolítica crônica, de intensidade moderada ou grave, episódios dolorosos e intermitentes de vaso-oclusão, risco permanente de infecções como resultado de auto-infarto esplênico, síndrome torácica aguda, acidentes vasculares cerebrais (AVC), priapismo, retinopatia e danos cumulativos em múltiplos órgãos^{5,22-30}. Hipertensão pulmonar tem também sido reconhecida como uma séria complicação, particularmente em

adultos³¹⁻³⁶. Inflamação, ativação endotelial, anormalidades da membrana eritrocitária, adesão de leucócitos, ativação e agregação plaquetária, ativação da coagulação e biodisponibilidade anormal de vários fatores vasoativos desempenham importante papel nos fenômenos vasooclusivos⁶. Aparentemente, existe um estado de inflamação crônica nos pacientes com AF. Crianças possuem elevado risco de infartos nas grandes artérias cerebrais, resultado de um processo vascular envolvendo as grandes artérias do círculo de Willis²⁵.

Da associação da Hb S com outras variantes estruturais e com a talassemia β resultam as DF, SC, SD e S- β talassemia, respectivamente. As DF, SC, SD e S- β^+ talassemia correspondem a quadros que podem ter apresentação mais benigna que o da AF, com anemia hemolítica de menor intensidade e, ocasionalmente, esplenomegalia. Já a associação da Hb S com a talassemia β^0 leva a manifestações clínicas bastante similares àquelas da AF^{37,38}.

Os heterozigotos da Hb S (AS) são, via de regra, assintomáticos e protegidos da infecção pela malária^{19,20,30}. Em algumas regiões africanas endêmicas, a frequência do gene β^S chega a ser superior a 40%³⁸. No Brasil, as regiões de maior prevalência são a Sudeste e a Nordeste, com cerca de 8% de heterozigotos entre os indivíduos de descendência africana^{22,39}. Esta é, no entanto, uma estimativa média, já que, em algumas populações, como na população de Salvador, no Estado da Bahia, a incidência de portadores do traço ciclêmico pode ser superior a 10%³⁹.

Fisiopatologia

Além das propriedades anormais da Hb S, a adesão das células falcizadas ao endotélio e as alterações causadas em seus mecanismos de transporte de íons também contribuem com a fisiopatologia das DF⁴⁰.

A membrana dos eritrócitos possui vários canais de transporte de íons para manter a hidratação celular. Os dois mais importantes são o sistema de co-transporte do K-Cl e o canal de Gardos. O primeiro, quando ativado, permite que o K⁺ e o Cl⁻ deixem a célula, seguidos pela água, o que resulta em desidratação. Esta atividade está anormalmente aumentada na AF, o que leva a uma maior concentração intracelular de Hb S e favorece sua polimerização. O canal de Gardos é um canal de efluxo de K⁺ ativado pelo aumento intracelular de Ca⁺⁺ decorrente da desoxigenação e da falcização das hemácias. Como ocorre no sistema de K-Cl, a saída de K⁺ é seguida pelo efluxo de água, desidratação celular e aumento da concentração interna de Hb S. A endotelina (um vasoativo que se encontra aumentado na AF), a prostaglandina E2 e outras citoquimiocinas alteram a cinética do canal de Gardos, promovendo a desidratação e a polimerização da Hb S^{41,42}.

Hemácias falcizadas são mais aderentes ao endotélio vascular e às proteínas da matriz extracelular do que hemácias normais. A aderência ao endotélio é mediada por vários receptores da superfície eritrocitária, incluindo as proteínas BCAM/Lu (CD239), CD47, CD147, ICAM-4 e fosfatidilserina,

que, em células normais, encontra-se restrita à superfície interna da membrana bilipídica. Além das hemácias maduras, os reticulócitos, em número aumentado nas DF, expressam uma quantidade maior dos antígenos CD36 e VLA-4, que podem também elevar significativamente a adesão ao endotélio^{5,40,43}.

A inflamação e a ativação da célula endotelial, ao que tudo indica, exercem um papel central na vaso-oclusão observada nas DF. A ativação dos monócitos, com a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α), leva os leucócitos, em número constantemente elevado, a aderirem ao endotélio inflamado e a interagirem com as hemácias falcizadas⁴⁴⁻⁴⁹. Os neutrófilos e eosinófilos, inclusive, parecem ser mais aderentes ao endotélio nas DF^{44,45,47,49}. Estudos com camundongos transgênicos têm demonstrado que o próprio dano causado pela isquemia seguida de reperfusão parece influenciar a gênese da inflamação na AF, pela produção de aumentada de oxidantes e de citocinas pró-inflamatórias e pela aumentada adesão dos leucócitos ao endotélio e seu extravasamento da vasculatura para os tecidos adjacentes⁵⁰. Mais recentemente, tem sido proposto, por experimentação *in vitro*, que a produção aumentada de eritroblastos como resultado de hemólise crônica leva a aumentados níveis do fator de crescimento placentário (PIGF), que, por sua vez, ativa os monócitos, que ativam o endotélio e contribuem para a vaso-oclusão⁵¹.

O endotélio é, por sua vez, também anormal nas DF. Células endoteliais circulantes de pacientes com DF têm expressão aumentada das moléculas de adesão intercelular ICAM-1, das moléculas de adesão vascular VCAM-1 e do fator tecidual, aumento esse induzido pelos níveis plasmáticos elevados de citocinas inflamatórias. Proteínas de adesão como a E-selectina, a P-selectina, a laminina, a fibronectina e a integrina $\alpha V\beta 3$ interagem com receptores de adesão expressos pelos eritrócitos falcizados e pelos leucócitos, promovendo a vaso-oclusão^{5,40,52}.

Vários estudos têm sugerido que a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) está reduzida nas DF, assim como em outras anemias hemolíticas⁵³. O NO é um gás sinalizador, com meia-vida de segundos, produzido no endotélio a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima NO sintetase (NOS). Sua principal função é regular a vasodilatação e o tônus vascular sistêmico e pulmonar. O NO é ainda um importante inibidor da expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais e da ativação dos leucócitos. Ele é consumido pela oxihemoglobina, em reações que geram metemoglobina e nitrato, e pela desoxihemoglobina, com a produção de Fe-nitrosilhemoglobina. Sua redução nas DF seria consequência do processo de hemólise intravascular, do maior consumo pelo excesso de espécies reativas de O₂ (ROS) geradas no plasma e no endotélio, e pela reação com a Hb livre no plasma liberada durante a hemólise. Menor biodisponibilidade de NO resulta em vasoconstrição, com aumento de ativação plaquetária e de expressão das moléculas de adesão nos leucócitos

e nas células endoteliais^{53,54}. A perda de resposta ao NO e, conseqüentemente, de regulação vascular, foi evidenciada em um modelo de camundongo transgênico denominado Berkeley (BERK), no qual os genes murinos das globinas α e β foram nocauteados e os genes humanos α e β^S são expressos como um transgene⁵⁵.

A gravidade das DF é modulada por vários fatores genéticos. A produção de Hb F e a talassemia α influenciam positivamente alguns dos aspectos clínicos⁵⁶. *In vitro*, híbridos $\alpha 2\gamma\beta^S$ não podem polimerizar; *in vivo*, pacientes com níveis mais elevados de Hb F tendem a ter uma evolução clínica melhor e uma maior taxa de sobrevivência^{56,57}. Na talassemia α , a reduzida disponibilidade de cadeias α diminui sua incorporação em moléculas de Hb S, resultando em um decréscimo de sua concentração. Os pacientes têm menor proporção de hemólise, maiores níveis de Hb e maior expectativa de vida comparados aos não talassêmicos. Suas hemácias são mais hidratadas e mais deformáveis⁵⁶.

Os haplótipos do cluster β também têm sido associados com a evolução clínica desta doença. O haplótipo CAR está associado a uma maior gravidade, enquanto os haplótipos Camarões e Indiano correspondem à doença mais branda^{5,58}.

Os genes relacionados aos antígenos do sistema HLA apresentam diversos polimorfismos que podem predispor seus portadores aos fenômenos vaso-oclusivos^{59,60}. O HLA-DRB1*03 parece estar associado a uma maior propensão aos AVC, ao passo que a presença do alelo HLA-DRB1*02 pode conferir um efeito protetor dessas complicações⁵⁹. O antígeno plaquetário HPA-5b parece também ser um forte indicador do risco para complicações vasculares nas DF: em estudo realizado com pacientes brasileiros, Castro et al. encontraram uma freqüência significativamente maior deste alelo em pacientes com AF que apresentaram complicações vaso-oclusivas⁶¹.

Mais recentemente, polimorfismos em genes envolvidos na inflamação, nas interações intercelulares e na biologia do NO têm sido também investigados como possíveis moduladores relacionados aos subfenótipos apresentados pelos pacientes com DF⁶². As interações entre os genes e seus *single nucleotide polymorphisms* (SNP) foram recentemente estudadas por Sebastiani et al. para desenvolver um modelo prognóstico para AVC em pacientes com AF⁶⁰. Os autores analisaram 108 SNP em 39 genes candidatos, em 1.398 pacientes com AF, e encontraram que 31 SNP, em 12 genes, interagem com a Hb F para modular o risco de AVC.

Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial das DF é bastante simples e se baseia principalmente na carga elétrica das variantes. Os métodos mais utilizados para separá-las e identificá-las são a eletroforese, a focalização isoelétrica e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de troca catiônica. No caso da Hb S, os testes de falcização e de solubilidade da desoxi-HbS em tampão fosfato de alta molaridade podem ser empregados na confirmação e/ou triagem de portadores. Cumpre ressaltar

que, independente do método de escolha, o estudo familiar é sempre fundamental para o estabelecimento do diagnóstico^{13,63,64}. Cabe ainda enfatizar a importância da triagem neonatal, uma vez que a detecção precoce das DF é fundamental para a redução da morbidade e mortalidade dessas doenças. Assim, esse procedimento deve ser levado a efeito sempre que a freqüência do gene da Hb S seja elevada. O Programa Nacional de Triagem Neonatal, instituído no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (SUS), prevê a investigação das DF (e outras hemoglobinopatias) ao lado de outras três doenças genéticas – a fenilcetonúria, o hipotireoidismo congênito e a fibrose cística – através do “teste do pezinho”, realizado em grande parte das maternidades do país. Após a identificação dos pacientes, é imprescindível que o adequado acompanhamento clínico seja regularmente efetuado^{11,22}.

Técnicas moleculares têm sido mais reservadas ao diagnóstico pré-natal da AF, a partir de amostras de DNA obtidas de células fetais do líquido amniótico, da vilosidade coriônica ou do plasma materno. Há várias estratégias propostas, todas simples e que se baseiam na amplificação do gene da globina β pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de análise de restrição¹³.

Alguns métodos que empregam plataformas do tipo *microarrays* para detecção de hemoglobinopatias também já estão disponíveis e poderão, gradativamente, substituir os métodos convencionais à medida que o uso extensivo reduza seus custos, ainda elevados^{65,66}.

Tratamento

Os aspectos clássicos do tratamento das DF, incluindo a terapêutica dos episódios agudos (crises de falcização) e das infecções, estão extensivamente descritos em revisões anteriores^{3,5,11,22}. Merece ser ressaltada, no entanto, a importância do uso profilático de penicilina e da vacinação contra pneumococos e *Haemophilus influenzae* tipo b, microrganismos encapsulados contra os quais as crianças com DF são muito mais susceptíveis que crianças saudáveis^{11,22}. A introdução dessa terapêutica reduziu expressivamente a morbimortalidade desses pacientes na infância. Trataremos, a seguir, predominantemente das drogas e das novas perspectivas terapêuticas nas DF.

A constatação de que pacientes AF com persistência hereditária de Hb F tendem a ser assintomáticos demonstra o potencial que o aumento dos níveis de Hb F tem no melhoramento do quadro clínico das DF. Várias drogas, como a 5-azacitidina, o butirato de sódio e a hidroxuréia (HU), têm, por mecanismos diferenciados, a capacidade de reativar os genes γ e elevar a produção de Hb F⁵. A toxicidade dessas drogas, no entanto, limita sua utilização. A HU é a única indutora de Hb F aprovada para uso em pacientes com DF, enquanto as demais drogas estão em fase de investigação. Estudos multicêntricos têm demonstrado que ela é altamente efetiva na redução das crises dolorosas, na síndrome torácica aguda e nas necessidades transfusionais, reduzindo a mortalidade em cerca de 40%^{67,68}. Seu exato mecanismo

de ação ainda não está completamente elucidado. Como a HU é uma droga mielossupressora, alguns autores têm atribuído seus efeitos benéficos, além do próprio aumento dos níveis de Hb F, à redução da contagem de leucócitos e à supressão da inflamação⁶⁸. Há também evidências que a HU afeta a hidratação das hemácias, a adesão ao endotélio e a produção de NO⁶⁸⁻⁷⁴. Possivelmente, ainda como resultado do efeito supressor, pacientes que tomam HU têm menor número de reticulócitos circulantes e menos células densas^{68,70}. A segurança e a eficácia da HU para a maioria dos pacientes adultos estão bem estabelecidas⁷⁰. Algumas questões permanecem quanto aos seus efeitos no longo prazo⁷⁵, e particularmente quanto ao seu potencial carcinogênico⁶⁷ em relação à população pediátrica. Crianças tratadas com HU apresentaram redução da anemia, aumento do volume corpuscular médio das hemácias e dos níveis de Hb F, concomitantemente à redução da contagem de leucócitos, mas o impacto da utilização crônica em prazos mais longos ainda não é conhecido⁵.

Estudos multicêntricos têm revelado que o transplante alogênico de células hematopoéticas obtidas de doadores relacionados e compatíveis resulta em uma taxa de sobrevivência superior a 90% e de sobrevivência livre de eventos de 85%. É a opção de cura para a doença para quem tiver um doador compatível na família¹⁰, particularmente em pacientes com idade inferior a 16 anos, que ainda não acumularam as disfunções orgânicas que levam o transplante ao insucesso em pacientes mais velhos⁷⁶. Infelizmente, a maioria dos pacientes não dispõe de doadores compatíveis relacionados. Transplantes com doadores compatíveis não-relacionados ou haploidênticos ainda correspondem a taxas de mortalidade muito altas, inaceitáveis. Transplantes não mieloablativos não têm sido bem sucedidos nestes casos. O transplante de células hematopoéticas de sangue de cordão umbilical de doadores relacionados tem sido proposto como uma alternativa promissora⁷⁷.

Outras terapias antifalczantes encontram-se em fase de teste. O poloxâmero 188 é um co-polímero surfactante não iônico que aumenta a solubilidade da Hb S, reduzindo a viscosidade sangüínea e a duração e freqüência dos episódios vaso-oclusivos⁷⁸. Terapias antiadesão têm sido exploradas, incluindo os antiinflamatórios gerais e aqueles especificamente direcionados contra as moléculas de adesão. Polissacarídeos aniônicos, IgG e estatinas incluem-se nessa categoria⁷⁹.

Evitar a desidratação celular pode também minimizar os sintomas das DF. Em camundongos transgênicos, a suplementação oral de magnésio, um inibidor da desidratação celular causada pelo sistema de co-transporte K-Cl, melhorou a hidratação das hemácias e aumentou os níveis de Hb. Resultados similares foram obtidos em modelos animais com clorotrimazol, que bloqueia o canal de Gardos. Outros compostos análogos encontram-se em estudo, com o objetivo de redução da densidade celular e da contagem de reticulócitos^{5,80}.

Algumas opções de fármacos disponíveis para o tratamento das DF podem ser agrupadas como possíveis doadores de NO. Além da HU, já comentada acima, a L-arginina (via oral) ou o nitrato de sódio (inalação) poderão ser efetivos, mas ainda são de difícil manuseio⁸¹. Alguns agentes que reduzem a produção de ROS⁸¹, como a xantina oxidase, ou aqueles que reduzam a adesão celular ao endotélio, poderão ser benéficos. O sildenafil amplifica a resposta de NO na musculatura vascular; ele vem sendo usado em ensaios clínicos para o tratamento de hipertensão pulmonar na AF⁸², mas a maior preocupação relacionada ao uso desse tipo de medicamento é a possibilidade de desenvolvimento de priapismo nos pacientes masculinos. Recentemente, Canalli et al. demonstraram que a adesão *in vitro* dos neutrófilos à fibronectina e à proteína ICAM-1, aumentada nas DF, torna-se significativamente reduzida na presença de agentes farmacológicos doadores de NO, como o nitroprussiato de sódio e a dietilaminaNONOato (DEANO)⁸³. Estes resultados indicam que drogas capazes de doar ou aumentar a biodisponibilidade de NO podem representar uma promissora terapêutica para a redução da vaso-oclusão em pacientes com DF.

Com relação à terapia gênica, vetores retrovirais que poderiam corrigir a mutação ou seus efeitos e que se integrem permanentemente no genoma hospedeiro têm sido investigados, em modelos animais, para transferência em células-tronco hematopoéticas⁸⁴. Entre os principais obstáculos estão a instabilidade dos vetores e a dificuldade de sua integração nesse tipo celular. Outras abordagens, como o silenciamento do gene β^S por RNA de interferência (RNAi)⁸⁵, ou a recombinação homóloga para substituição do gene β^S pelo gene $\beta^{A86,87}$, são promissoras, mas ainda requerem melhoramentos nos métodos de transferência gênica e demonstração de eficácia em modelos animais.

A talassemia β

Este tipo de talassemia resulta de mutações nos genes da globina β que levam à redução ou ausência de síntese das cadeias β da Hb, causando anemia microcítica e hipocrômica e diferentes quadros sindrômicos originados pela combinação dos alelos β^0 (ausência de expressão) e β^+ (redução de expressão)^{4,6,88}. O grau de expressão dos alelos β^+ é bastante variável, a depender da região do gene afetada pela mutação: alguns correspondem a uma pequena redução na taxa de síntese das cadeias β , enquanto outros correspondem à quase total ausência de síntese⁸⁸.

A talassemia β atinge suas maiores prevalências em populações oriundas da Região Mediterrânea e do Sudeste Asiático. Há atualmente cerca de 200 alelos mutantes descritos, sendo que cada população tem o seu espectro próprio, com um ou alguns alelos predominantes^{6,7,88}. No Brasil, a freqüência média de portadores na população caucasóide é de cerca de 1%, sendo os alelos β^039 (C→T), β^+ -IVS-I-6 (T→C), β^+ -IVS-I-110 (G→A) e β^0 -IVS-I-1 (G→A) responsáveis pela quase totalidade dos casos nas Regiões Sul e Sudeste¹³; em

populações da Região Nordeste, além destes, o alelo β^+ -IVS-I-5 (G→C) corresponde a 9,3% dos alelos β -talassêmicos. A mutação β^{039} atinge freqüências entre 50 e 60% no Sudeste brasileiro, enquanto no Nordeste não chega a 5%, sendo a β^+ -IVS-I-6 predominante na população estudada⁸⁹.

Do ponto de vista clínico, as talassemias são classificadas em *menor* (heterozigose das formas β^0 ou β^+ , também denominada traço talassêmico β , em que os indivíduos são geralmente assintomáticos, podendo apresentar anemia em situações como na infância, na gravidez e no estresse), em *maior* (homozigose $\beta^0\beta^0$ ou dupla heterozigose $\beta^0\beta^+$, também conhecida como anemia de Cooley, corresponde à anemia grave, com dependência de transfusões sangüíneas regulares), e em *intermediária* (homozigose $\beta^+\beta^+$ ou dupla heterozigose $\beta^0\beta^+$, constituída dos fenótipos clínicos intermediários entre o traço talassêmico e a talassemia maior)^{6,11,13,88}.

Na talassemia maior, os pacientes sofrem as conseqüências diretas da anemia (caquexia, fadiga, insuficiência cardíaca congestiva) e os efeitos da expansão da eritropoese extramedular resultante da anemia, como anormalidades ósseas, esplenomegalia, compressão da medula espinhal e retardo do crescimento. A hemólise intensa leva à litíase, à formação de úlceras de perna e à hipertensão pulmonar. Hipercoagulabilidade é também uma complicação nesta doença. A terapêutica com transfusões sangüíneas crônicas leva ao acúmulo de ferro em tecidos vitais, com complicações cardíacas, hepáticas e endócrinas, como a pigmentação escura e metálica da pele, diabetes, hipopituitarismo, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo, cirrose e arritmias cardíacas e miopatia, principais causas de morte. Uma parte dos pacientes pode ainda ser portadora de doenças infecciosas, como possível complicação das transfusões crônicas^{6,11,88}.

A talassemia β intermediária compreende um amplo espectro de fenótipos clínicos associados a uma anemia hemolítica de menor gravidade que a acima descrita, com níveis de Hb total entre 7 e 9 g/dL, para a qual a terapia transfusional crônica não é normalmente requerida. Com o avançar da idade, os pacientes podem desenvolver complicações em razão da expansão medular, incluindo anormalidades ósseas, retardo do crescimento, infertilidade, sobrecarga de ferro tecidual devida à aumentada absorção gastrointestinal de ferro resultante da anemia e hipercoagulabilidade. As complicações trombóticas são mais freqüentes aqui do que em pacientes com talassemia maior regularmente transfundidos. Alguns pacientes desenvolvem hipertensão pulmonar grave similar àquela que ocorre em outras anemias hemolíticas crônicas. A osteoporose é também uma complicação importante que pode ocorrer na talassemia intermediária^{6,11,88,90}.

A talassemia menor é uma alteração geralmente assintomática, associada a anormalidades da morfologia eritrocitária, mas com uma anemia hipocrômica e microcítica discreta.

Esta vem a ocorrer mais comumente na infância, na gravidez, ou em situações de estresse fisiológico. A importância maior do diagnóstico deve-se à necessidade de aconselhamento genético e à prevenção da administração iatrogênica de compostos ferrosos aos heterozigotos^{6,11}.

Fisiopatologia

Na talassemia β , a produção deficiente de globinas β durante a eritropoese leva à anemia. As cadeias α não incorporadas ao tetrâmero, em excesso, formam agregados insolúveis e instáveis que lesam a membrana e levam à destruição prematura das células. Esse processo ocorre tanto nos precursores eritróides imaturos (eritropoese ineficaz) quanto nas células maduras (hemólise), levando à anemia. A eritropoese ineficaz é mediada por apoptose: as células em morte programada sinalizam aos macrófagos, provavelmente através da exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana, e são por eles fagocitadas^{91,92}.

As hemácias que entram na circulação, por outro lado, contêm inclusões que causam lesões à medida que elas atravessam a microcirculação, ocasionando hemólise extravascular, principalmente no baço. Essas inclusões são majoritariamente constituídas de hemicromos formados pela oxidação das subunidades de cadeias α , que interagem na membrana com as proteínas 4.1, anquirina e espectrina^{6,11,91-93}.

Em relação à membrana, várias anormalidades de estrutura e função têm sido descritas. Além daquelas mencionadas acima, há o aumento de fosfolípidos e de colesterol, do fluxo de cátions e da permeabilidade ao cálcio. As membranas são mais rígidas e mais instáveis, provavelmente em razão da ligação das cadeias α oxidadas à proteína 4.1^{6,93}.

A viscosidade citoplasmática das hemácias na talassemia β é também aumentada, como conseqüência de desidratação celular, um processo similar ao que ocorre nas DF envolvendo os sistemas controladores dos efluxos de íons e água, anormalmente ativados. Embora com menor conteúdo intracelular de Hb, hemácias talassêmicas podem apresentar valores de densidade tanto menores quanto maiores que hemácias normais^{6,94}.

A interação da Hb desnaturada e dos hemicromos com a proteína banda 3, na membrana, suscita a ligação de anticorpos autólogos do tipo IgG, seguida da fixação de complemento e conseqüente remoção dos eritrócitos da circulação. A redução do ácido siálico, como ocorre em hemácias normais senescentes, leva a uma maior exposição de resíduos β -galactosil, reconhecidos por anticorpos IgG antigalactosil que promovem o seqüestro das células pelo sistema reticuloendotelial^{95,96}.

Hemácias talassêmicas têm uma taxa de destruição de 10 a 15 vezes maior que a observada em hemácias normais. Há uma tentativa de compensação pela medula óssea, com aceleração da produção de eritrócitos, porém insuficiente para

evitar a anemia grave. A liberação do heme das células lisadas, a absorção gastrointestinal de ferro aumentada em razão do aumento da eritropoese e da inadequada supressão de hepcidina, uma proteína reguladora da absorção intestinal de ferro, aliadas ao regime regular de transfusões sanguíneas, levam à sobrecarga de ferro encontrada nestes pacientes. O ferro, altamente oxidativo, causa a formação de radicais livres tóxicos, com peroxidação lipídica das membranas, seguida de lise. A saturação da transferrina resulta em níveis aumentados de ferro livre no plasma, afetando vários órgãos, particularmente o coração^{6,11,97-100}.

A insuficiência cardíaca secundária à hemocromatose responde pela maioria das mortes na talassemia β . Anemia, sobrecarga de ferro, doença pulmonar, miocardite e pericardite estão entre as causas das complicações cardíacas. Vários estudos com cardiomiócitos em cultura têm revelado que a toxicidade causada pelo ferro modifica profundamente a contratilidade e o comportamento eletrofisiológico destas células, e que essas alterações estão provavelmente associadas à elevada peroxidação dos lipídeos da membrana celular^{98,101}.

Uma maior incidência de eventos tromboembólicos também ocorre na talassemia β . Esse estado de hipercoagulabilidade pode ser causado pelo aumento da exposição da fosfatidilserina na membrana eritrocitária, pela ativação das plaquetas, por uma maior aderência das hemácias talassêmicas ao endotélio, por uma expressão aumentada de moléculas de adesão nas células endoteliais dos pacientes talassêmicos e por ativação dos monócitos. Ainda, os níveis das proteínas anticoagulantes C, S e da antitrombina parecem estar reduzidos nesses casos^{102,103}.

Anemia crônica e sobrecarga de ferro contribuem para as alterações endócrinas observadas. A pituitária, as gônadas, o pâncreas, e as glândulas tireóide, paratireóides e adrenais estão afetadas; diabetes, hipogonadismo, osteopenia e osteoporose são comuns. As fraturas freqüentes, em casos inadequadamente tratados, devem-se à expansão medular para compensação da eritropoese ineficaz, disfunção endócrina e complicações relativas à própria terapia contra a sobrecarga de ferro⁹⁷.

Há várias anormalidades funcionais pulmonares descritas em pacientes β -talassêmicos, que parecem ser, em parte, causadas pelos depósitos de ferro, geração de radicais hidroxila livres, alteração do tecido conectivo e da membrana capilar alveolar. Hipercoagulabilidade, tromboembolismo plaquetário e possível redução do NO também têm sido associados à hipertensão pulmonar observada nos pacientes talassêmicos, mais pronunciada naqueles que foram esplenectomizados^{84,97,98,101-105}.

O tipo de mutação no gene β está associado à gravidade clínica da doença⁷. Assim, a mutação β^+ -IVS-I-6, denominada do tipo portuguesa, está relacionada a uma evolução clínica mais benigna, ao passo que a β^0 39 corresponde a uma

evolução clínica mais grave^{6,11,89}. Algumas variantes estruturais da Hb, hiperinstáveis, resultam em fenótipos talassêmicos dominantes, ou seja, a presença de um único alelo mutante ocasiona manifestações clínicas correspondentes à talassemia intermediária¹⁰⁶. Como nas DF, os heterozigotos da talassemia β parecem sofrer seleção positiva pela malária em áreas endêmicas, o que mantém as elevadas freqüências dos alelos talassêmicos em algumas dessas regiões^{19,20,95}.

Entre os moduladores genéticos da gravidade da doença está a coexistência da talassemia α , que melhora a evolução clínica dos pacientes¹⁰⁷. O excesso de cadeias α , por outro lado, em indivíduos que têm genes α triplicados ou quadruplicados, agrava o quadro, levando heterozigotos da talassemia β a apresentarem manifestações clínicas compatíveis com a talassemia intermediária¹⁰⁸.

Mutações nos genes γ , que levem à maior produção de Hb F e a menores quantidades de cadeias α livres, também contribuem para uma evolução clínica melhor¹⁰⁹. A presença do polimorfismo (C→T) na posição -158 do gene $\epsilon\gamma$, reconhecido pela enzima de restrição XmnI, parece se correlacionar com produção mais elevada de cadeias $\epsilon\gamma$ e, assim, também contribuir para uma redução da gravidade da doença^{6,11}.

Outro modificador potencial da expressão clínica da talassemia β é a proteína *alpha-hemoglobin stabilising protein* (AHSP), uma chaperone que forma complexos estáveis com as cadeias α livres, impedindo sua precipitação. Estudos em camundongos e em humanos têm sugerido que a presença de mutações nos genes AHSP podem exacerbar o fenótipo talassêmico^{96,110,111}.

Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial dos heterozigotos é determinado pela elevação dos níveis da Hb A₂, seguida ou não de pequeno aumento da Hb F. Os homozigotos $\beta^0\beta^0$ apresentam apenas as Hb A₂ e F (cerca de 98%), enquanto os homozigotos $\beta^+\beta^+$ e duplos heterozigotos $\beta^0\beta^+$ possuem uma proporção variável de Hb F em relação à Hb A, geralmente entre 40 e 70%. Cabe mais uma vez enfatizar que o estudo familiar é de fundamental importância^{13,64}.

O diagnóstico molecular pode ser feito por uma variedade de técnicas, sendo as mais utilizadas o seqüenciamento direto dos genes β e a análise de restrição, quando possível. Plataformas de *microarrays*, contendo sondas para as mutações mais freqüentes, também têm sido utilizadas e tendem a substituir as técnicas convencionais à medida que seus custos sejam reduzidos^{13,65}.

Tratamento

O tratamento atualmente empregado envolve a terapia transfusional regular, para manutenção dos níveis mínimos de Hb entre 9,5-10 g/dL, a administração de quelantes de ferro, como a desferrioxamina ou outros quelantes orais, e o monitoramento da sobrecarga de ferro através de dosagens

séricas de ferritina, de ressonância magnética T2* para avaliação do excesso de ferro no coração e de suporte endócrino^{6,11,90,98,101}.

A desferroxiamina é o tratamento quelante de escolha. Como ela requer infusão parenteral diária e prolongada, novos agentes quelantes têm sido testados e propostos¹¹. A deferiprona é uma droga de administração oral que penetra na membrana celular e quela espécies intracelulares tóxicas de ferro. Alguns efeitos adversos têm sido relatados, como leucopenia, neutropenia e artrite, mas um grande número de estudos clínicos indica que ela pode ser mais efetiva na remoção do ferro cardíaco que a desferroxiamina^{112,113}. Mais recentemente, uma combinação dessas duas drogas vem sendo também testada¹¹⁴. Um novo quelante oral, o deferasirox, foi recentemente aprovado nos EUA e no Brasil. Sua eficácia parece ser equivalente à da desferroxiamina, embora os efeitos colaterais no longo prazo não sejam ainda conhecidos¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Descobertas recentes apontam para uma potencial intervenção terapêutica na talassemia β através da manipulação do metabolismo de ferro⁶. A administração de hepcidina sintética ou de agentes que aumentam sua expressão poderia ser benéfica no controle da absorção deste metal¹¹⁸. A hepcidina é um pequeno peptídeo produzido pelo fígado em elevadas quantidades durante os processos infecciosos. Ela inibe a absorção intestinal de ferro para, assim, impedir sua utilização pelos agentes causadores da infecção^{99,100}. Os níveis de hepcidina tornam-se aumentados quando os estoques de ferro estão elevados, mas em pacientes com talassemia maior ou intermediária, e no modelo de camundongo talassêmico, os níveis estão reduzidos, permitindo uma maior absorção de ferro. Procurando compreender a causa desta inapropriada redução, Tanno et al. (2007) demonstraram que a inibição da expressão de hepcidina se correlaciona, nas síndromes talassêmicas, com o aumento de expressão do fator de diferenciação do crescimento GDF15, um membro de uma superfamília de moléculas (TGFB) recentemente identificadas como regulatórias da expressão de hepcidina. O soro de pacientes talassêmicos suprime a expressão de hepcidina em hepatócitos humanos primários, enquanto a depleção de GDF15 reverte esta supressão. Os autores propõem que, nas síndromes talassêmicas, a elevada expressão de GDF15 (e possivelmente de outras proteínas com papel similar) se origina de um compartimento eritróide expandido e contribui para a sobrecarga de ferro através da inibição da expressão de hepcidina. Este fator seria, assim, outro potencial alvo terapêutico nestas doenças¹⁰⁰.

O aumento da produção de Hb F poderia ser também uma alternativa terapêutica, mas não há, na talassemia β , agentes indutores que tenham demonstrado eficiência em um grande número de pacientes, embora alguns casos possam ser responsivos à HU^{6,11}. Como o problema aqui é o excesso de cadeias α , terapias que possam suprimir a expressão dos genes α poderiam auxiliar na redução da gravidade clínica.

Para isso, os mecanismos envolvidos na regulação dos genes de globinas precisam ainda ser melhor elucidados^{84,85,119-121}.

Um número de antioxidantes, com vistas à proteção da membrana celular, tem sido testado, entre eles as vitaminas C e E e alguns flavonóides de plantas, mas os resultados não são conclusivos e os estudos precisam ser ampliados em humanos^{122,123}.

O transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas de doadores relacionados e HLA-compatíveis é uma alternativa bastante promissora e é a única com possibilidades de cura até o momento. Novamente, como nas DF, os melhores resultados estão em pacientes mais jovens, que ainda não acumularam os danos teciduais e orgânicos dos pacientes com mais idade. O limite para um sucesso mais amplo desta abordagem é encontrar doadores relacionados HLA-compatíveis^{10,124}.

A terapia gênica vem também sendo investigada em modelos animais para essa finalidade¹²⁰. Transferir o gene β normal a células-tronco hematopoéticas poderia levar à cura permanente. Vários vetores virais que se integram permanentemente no genoma hospedeiro têm sido testados, mas os problemas são os mesmos descritos anteriormente para as DF¹²⁵⁻¹²⁷.

Conclusões

As hemoglobinopatias estão entre as doenças monogênicas mais comumente encontradas nas populações. A complexidade de seus processos fisiopatológicos e a gravidade e diversidade de manifestações clínicas a elas associadas fazem das DF e da talassemia β um enorme desafio para a medicina e para a ciência. O maior conhecimento da base biológica dessas doenças, ainda associadas à elevada morbimortalidade, tem propiciado importantes avanços nas abordagens terapêuticas e na prevenção de novos casos e pode, em um futuro próximo, oferecer possibilidades mais concretas de cura.

Referências

1. Steiner LA, Gallagher PG. [Erythrocyte disorders in the perinatal period](#). *Semin Perinatol*. 2007;31:254-61.
2. Tolentino K, Friedman JF. [An update on anemia in less developed countries](#). *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:44-51.
3. Wintrobe MM, Foerster J, editors. *Wintrobe's clinical hematology*. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
4. Dhaliwal G, Cornett PA, Tierney LM Jr. [Hemolytic anemia](#). *Am Fam Physician*. 2004;69:2599-606.
5. Madigan C, Malik P. [Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease](#). *Expert Rev Mol Med*. 2006;8:1-23.
6. Urbinati F, Madigan C, Malik P. [Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias](#). *Expert Rev Mol Med*. 2006;8:1-26.
7. Old JM. [Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies](#). *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67:71-86.

8. Khattab AD, Rawlings B, Ali IS. [Care of patients with haemoglobin abnormalities: history and biology](#). *Br J Nurs*. 2006; 15:994-8.
9. Theodorsson E, Birgens H, Hagve TA. [Haemoglobinopathies and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a Scandinavian perspective](#). *Scand J Clin Lab Invest*. 2007; 67:3-10.
10. Morris CR, Singer ST, Walters MC. [Clinical hemoglobinopathies: iron, lungs and new blood](#). *Curr Opin Hematol*. 2006;13:407-18.
11. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editors. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu; 2004.
12. Costa FF, Sonati MF. Hemoglobina: estrutura, síntese e transporte de oxigênio. In: Covas DT, Langhi Júnior DM, Bordin JO, editors. *Hemoterapia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 27-33.
13. Wenning MR, Sonati MF. Hemoglobinopatias hereditárias. In: Lopes AC, editor. *Diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Manole; 2007. p. 310-4.
14. Vekilov PG. [Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia?](#) *Br J Haematol*. 2007;139:173-84.
15. Tefferi A. [Clinical, genetic, and therapeutic insights into systemic mast cell disease](#). *Curr Opin Hematol*. 2004;11:58-64.
16. Catlin AJ. [Thalassemia: the facts and the controversies](#). *Pediatr Nurs*. 2003;29:447-9.
17. Thein SL. [Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia](#). *Br J Haematol*. 2004;124:264-74.
18. Shah A. [Thalassemia syndromes](#). *Indian J Med Sci*. 2004; 58:445-9.
19. Williams TN. [Human red blood cell polymorphisms and malaria](#). *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:388-94.
20. Williams TN. [Red blood cell defects and malaria](#). *Mol Biochem Parasitol*. 2006;149:121-7.
21. Frenette PS, Atweh GF. [Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise](#). *J Clin Invest*. 2007;117:850-8.
22. Di Nuzzo DV, Fonseca SF. [\[Sickle cell disease and infection\]](#). *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:347-54.
23. Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JA, Gesteira MdeF, Carvalho MH, Saad ST, et al. [Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil](#). *Cad Saude Publica*. 2005;21:1287-90.
24. Lima CS, Rocha EM, Silva NM, Sonatti MF, Costa FF, Saad ST. [Risk factors for conjunctival and retinal vessel alterations in sickle cell disease](#). *Acta Ophthalmol Scand*. 2006;84:234-41.
25. Adams RJ. [Big strokes in small persons](#). *Arch Neurol*. 2007; 64:1567-74.
26. Brittain JE, Parise LV. [Cytokines and plasma factors in sickle cell disease](#). *Curr Opin Hematol*. 2007;14:438-43.
27. Seidman C, Kirkham F, Pavlakis S. [Pediatric stroke: current developments](#). *Curr Opin Pediatr*. 2007;19:657-62.
28. Traina F, Jorge SG, Yamanaka A, de Meirelles LR, Costa FF, Saad ST. [Chronic liver abnormalities in sickle cell disease: a clinicopathological study in 70 living patients](#). *Acta Haematol*. 2007;118:129-35.
29. Wong WY, Powars DR. [Overt and incomplete \(silent\) cerebral infarction in sickle cell anemia: diagnosis and management](#). *Neuroimaging Clin N Am*. 2007;17:269-80.
30. Creary M, Williamson D, Kulkarni R. [Sickle cell disease: current activities, public health implications, and future directions](#). *J Womens Health (Larchmt)*. 2007;16:575-82.
31. Castro O, Hoque M, Brown BD. [Pulmonary hypertension in sickle cell disease: cardiac catheterization results and survival](#). *Blood*. 2003;101:1257-61.
32. Ataga KI, Sood N, De Gent G, Kelly E, Henderson AG, Jones S, et al. [Pulmonary hypertension in sickle cell disease](#). *Am J Med*. 2004;117:665-9.
33. Machado RF, Gladwin MT. [Chronic sickle cell lung disease: new insights into the diagnosis, pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension](#). *Br J Haematol*. 2005;129:449-64.
34. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. [Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease](#). *JAMA*. 2005;294:81-90.
35. Kato GJ, Onyekwere OC, Gladwin MT. [Pulmonary hypertension in sickle cell disease: relevance to children](#). *Pediatr Hematol Oncol*. 2007;24:159-70.
36. Barnett CF, Hsue PY, Machado RF. [Pulmonary hypertension: an increasingly recognized complication of hereditary hemolytic anemias and HIV infection](#). *JAMA*. 2008;299:324-31.
37. Claster S, Vichinsky EP. [Managing sickle cell disease](#). *BMJ*. 2003; 327:1151-5.
38. Berry PA, Cross TJ, Thein SL, Portmann BC, Wendon JA, Karani JB, et al. [Hepatic dysfunction in sickle cell disease: a new system of classification based on global assessment](#). *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:1469-76.
39. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rêgo M, Reis MG, Gonçalves MS. [Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil](#). *Cad Saude Publica*. 2005; 21:292-8.
40. Chiang EY, Frenette PS. [Sickle cell vaso-occlusion](#). *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005;19:771-84.
41. Joiner CH, Rettig RK, Jiang M, Franco RS. [KCl cotransport mediates abnormal sulfhydryl-dependent volume regulation in sickle reticulocytes](#). *Blood*. 2004;104:2954-60.
42. Lew VL, Bookchin RM. [Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration](#). *Physiol Rev*. 2005;85:179-200.
43. Zen Q, Batchvarova M, Twyman CA, Eyller CE, Qiu H, De Castro LM, Telen MJ. [B-CAM/LU expression and the role of B-CAM/LU activation in binding of low- and high-density red cells to laminin in sickle cell disease](#). *Am J Hematol*. 2004;75:63-7.
44. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. [Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin](#). *Acta Haematol*. 2005;113:130-6.
45. Canalli AA, Costa FF, Saad ST, Conran N. [Granulocyte adhesive interactions and their role in sickle cell vaso-occlusion](#). *Hematology*. 2005;10:419-25.
46. Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta T. [Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease](#). *Ann Hematol*. 2007;86:255-61.
47. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad ST, Costa FF, Conran N. [Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease](#). *Eur J Haematol*. 2007;79:330-7.
48. Conran N, Almeida CB, Lanaro C, Ferreira RP, Traina F, Saad ST, et al. [Inhibition of caspase-dependent spontaneous apoptosis via a cAMP-protein kinase A dependent pathway in neutrophils from sickle cell disease patients](#). *Br J Haematol*. 2007;139:148-58.

49. Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. [Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease](#). *Exp Hematol*. 2004;32:728-34.
50. Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, Bowlin PR, Kielbik MC, Bischof JC, et al. [Transgenic sickle mice have vascular inflammation](#). *Blood*. 2003;101:3953-9.
51. Perelman N, Selvaraj SK, Batra S, Luck LR, Erdreich-Epstein A, Coates TD, et al. [Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity](#). *Blood*. 2003;102:1506-14.
52. Solovey A, Kollander R, Shet A, Milbauer LC, Choong S, Panoskaltis-Mortari A, et al. [Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin](#). *Blood*. 2004;104:840-6.
53. Aslan M, Freeman BA. [Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease](#). *Free Radic Biol Med*. 2007;43:1469-83.
54. Conran N, Gambero A, Ferreira HH, Antunes E, de Nucci G. [Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface](#). *Biochem Pharmacol*. 2003;66:43-50.
55. Kaul DK, Liu XD, Chang HY, Nagel RL, Fabry ME. [Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice](#). *J Clin Invest*. 2004;114:1136-45.
56. Steinberg MH. [Predicting clinical severity in sickle cell anaemia](#). *Br J Haematol*. 2005;129:465-81.
57. Fathallah H, Atweh GF. [Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease](#). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;58-62.
58. Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, et al. [The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view](#). *Hemoglobin*. 2004;28:267-71.
59. Hoppe C, Klitz W, Noble J, Vigil L, Vichinsky E, Styles L. [Distinct HLA associations by stroke subtype in children with sickle cell anemia](#). *Blood*. 2003;101:2865-9.
60. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. [Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia](#). *Nat Genet*. 2005;37:435-40.
61. Castro V, Alberto FL, Costa RN, Lepikson-Neto J, Gualandro SF, Figueiredo MS, et al. [Polymorphism of the human platelet antigen-5 system is a risk factor for occlusive vascular complications in patients with sickle cell anemia](#). *Vox Sang*. 2004;87:118-23.
62. Steinberg MH, Adewoye AH. [Modifier genes and sickle cell anemia](#). *Curr Opin Hematol*. 2006;13:131-6.
63. Kutlar F. [Diagnostic approach to hemoglobinopathies](#). *Hemoglobin*. 2007;31:243-50.
64. Colah RB, Surve R, Sawant P, D'Souza E, Italia K, Phanasgaonkar S, et al. [HPLC studies in hemoglobinopathies](#). *Indian J Pediatr*. 2007;74:657-62.
65. Cremonesi L, Ferrari M, Giordano PC, Hartevelde CL, Kleanthous M, Papisavva T, et al. [An overview of current microarray-based human globin gene mutation detection methods](#). *Hemoglobin*. 2007;31:289-311.
66. Kutlar A. [Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder](#). *Hemoglobin*. 2007;31:209-24.
67. Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, 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.
68. Davies SC, Gilmore A. [The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease](#). *Blood Rev*. 2003;17:99-109.
69. Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. [Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea](#). *Am J Hematol*. 2004;76:343-7.
70. De Franceschi L, Corrocher R. [Established and experimental treatments for sickle cell disease](#). *Haematologica*. 2004;89:348-56.
71. Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF, Conran N. [Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties](#). *Eur J Haematol*. 2007;78:144-51.
72. Haynes J Jr, Obiako B, Hester RB, Baliga BS, Stevens T. [Hydroxyurea attenuates activated neutrophil-mediated sickle erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure and adhesion to pulmonary vascular endothelium](#). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H379-85.
73. Johnson C, Telen MJ. [Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease](#). *Haematologica*. 2008;93:481-5.
74. Moreira LS, de Andrade TG, Albuquerque DM, Cunha AF, Fattori A, Saad ST, Costa FF. [Identification of differentially expressed genes induced by hydroxyurea in reticulocytes from sickle cell anaemia patients](#). *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:651-5.
75. Fattori A, de Souza RA, Saad ST, Costa FF. [Acute myocardial infarction in sickle cell disease: a possible complication of hydroxyurea treatment](#). *Hematol J*. 2005;5:589-90.
76. Steinberg MH, Brugnara C. [Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease](#). *Annu Rev Med*. 2003;54:89-112.
77. Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S, et al. [Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease](#). *Blood*. 2003;101:2137-43.
78. Cheung AT, Chan MS, Ramanujam S, Rangaswami A, Curl K, Franklin P, et al. [Effects of poloxamer 188 treatment on sickle cell vaso-occlusive crisis: computer-assisted intravital microscopy study](#). *J Investig Med*. 2004;52:402-6.
79. Makis AC, Hatzimichael EC, Stebbing J. [The genomics of new drugs in sickle cell disease](#). *Pharmacogenomics*. 2006;7:909-17.
80. 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.
81. Mack AK, Kato GJ. [Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift?](#) *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:1237-43.
82. Machado RF, Martyr S, Kato GJ, Barst RJ, Anthi A, Robinson MR, et al. [Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension](#). *Br J Haematol*. 2005;130:445-53.
83. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. [Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation](#). *Haematologica*. 2008;93:605-9.
84. Bank A. [On the road to gene therapy for beta-thalassemia and sickle cell anemia](#). *Pediatr Hematol Oncol*. 2008;25:1-4.
85. Shen TJ, Rogers H, Yu X, Lin F, Noguchi CT, Ho C. [Modification of globin gene expression by RNA targeting strategies](#). *Exp Hematol*. 2007;35:1209-18.

86. Chang JC, Ye L, Kan YW. [Correction of the sickle cell mutation in embryonic stem cells](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:1036-40.
87. Wu LC, Sun CW, Ryan TM, Pawlik KM, Ren J, Townes TM. [Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells](#). *Blood*. 2006;108:1183-8.
88. Birgens H, Ljung R. [The thalassaemia syndromes](#). *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67:11-25.
89. Araújo AS, Silva WA, Leão SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, et al. [A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil](#). *Hemoglobin*. 2003;27:211-7.
90. Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. [Thalassemia intermedia: revisited](#). *Blood Cells Mol Dis*. 2006;37:12-20.
91. Rund D, Rachmilewitz E. [Beta-thalassemia](#). *N Engl J Med*. 2005; 353:1135-46.
92. Kuypers FA, de Jong K. [The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes](#). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004;50:147-58.
93. Datta P, Basu S, Chakravarty SB, Chakravarty A, Banerjee D, Chandra S, et al. [Enhanced oxidative cross-linking of hemoglobin E with spectrin and loss of erythrocyte membrane asymmetry in hemoglobin E beta-thalassemia](#). *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 37:77-81.
94. De Franceschi L, Ronzoni L, Cappellini MD, Cimmino F, Siciliano A, Alper SL, et al. [K-CL co-transport plays an important role in normal and beta thalassaemic erythropoiesis](#). *Haematologica*. 2007;92:1319-26.
95. Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P. [Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait](#). *Blood*. 2004;104:3364-71.
96. Weiss MJ, Zhou S, Feng L, Gell DA, Mackay JP, Shi Y, et al. [Role of alpha-hemoglobin-stabilizing protein in normal erythropoiesis and beta-thalassemia](#). *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:103-17.
97. Toumba M, Sergis A, Kanaris C, Skordis N. [Endocrine complications in patients with Thalassaemia Major](#). *Pediatr Endocrinol Rev*. 2007;5:642-8.
98. Aessopos A, Berdoukas V, Tsironi M. [The heart in transfusion dependent homozygous thalassaemia today--prediction, prevention and management](#). *Eur J Haematol*. 2008;80:93-106.
99. Weizer-Stern O, Adamsky K, Amariglio N, Levin C, Koren A, Breuer W, et al. [Downregulation of hepcidin and haemojuvelin expression in the hepatocyte cell-line HepG2 induced by thalassaemic sera](#). *Br J Haematol*. 2006;135:129-38.
100. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. [High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin](#). *Nat Med*. 2007;13:1096-101.
101. Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. [Thalassemia](#). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004;14-34.
102. Ataga KI, Cappellini MD, Rachmilewitz EA. [Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability](#). *Br J Haematol*. 2007;139:3-13.
103. Panigrahi I, Agarwal S. [Thromboembolic complications in beta-thalassemia: beyond the horizon](#). *Thromb Res*. 2007; 120:783-9.
104. Amer J, Fibach E. [N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress](#). *Free Radic Biol Med*. 2005;38:136-45.
105. Pattanapanyasat K, Gonwong S, Chaichompoo P, Nulsri E, Lerwana S, Sukapirom K, et al. [Activated platelet-derived microparticles in thalassaemia](#). *Br J Haematol*. 2007; 136:462-71.
106. Weinstein BI, Erramouspe B, Albuquerque DM, Oliveira DM, Kimura EM, Costa FF, et al. [Hb Florida: a novel elongated C-terminal beta-globin variant causing dominant beta-thalassemia phenotype](#). *Am J Hematol*. 2006;81:358-60.
107. Singh SP, Gupta S. [Molecular pathogenesis and clinical variability of homozygous beta 0-thalassemia in populations of Jammu region of J&K state \(India\)](#). *Hematology*. 2006; 11:271-5.
108. Kimura EM, Grignoli CR, Pinheiro VR, Costa FF, Sonati MF. [Thalassemia intermedia as a result of heterozygosis for beta 0-thalassemia and alpha alpha alpha anti-3,7 genotype in a Brazilian patient](#). *Braz J Med Biol Res*. 2003;36:699-701.
109. Bailey L, Kuroyanagi Y, Franco-Penteado CF, Conran N, Costa FF, Ausenda S, et al. [Expression of the gamma-globin gene is sustained by the cAMP-dependent pathway in beta-thalassaemia](#). *Br J Haematol*. 2007;138:382-95.
110. dos Santos CO, Costa FF. [AHSP and beta-thalassemia: a possible genetic modifier](#). *Hematology*. 2005;10:157-61.
111. dos Santos CO, Zhou S, Secolin R, Wang X, Cunha AF, Higgs DR, et al. [Population analysis of the alpha hemoglobin stabilizing protein \(AHSP\) gene identifies sequence variants that alter expression and function](#). *Am J Hematol*. 2008;83:103-8.
112. Franchini M, Veneri D. [Iron-chelation therapy: an update](#). *Hematol J*. 2004;5:287-92.
113. Pootrakul P, Sirankapracha P, Sankote J, Kachintorn U, Maungsub W, Sriphen K, et al. [Clinical trial of deferiprone iron chelation therapy in beta-thalassaemia/haemoglobin E patients in Thailand](#). *Br J Haematol*. 2003;122:305-10.
114. Tsironi M, Deftereos S, Andriopoulos P, Farmakis D, Meletis J, Aessopos A. [Reversal of heart failure in thalassemia major by combined chelation therapy: a case report](#). *Eur J Haematol*. 2005;74:84-5.
115. Neufeld EJ. [Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions](#). *Blood*. 2006;107:3436-41.
116. Choudhry VP, Naithani R. [Current status of iron overload and chelation with deferasirox](#). *Indian J Pediatr*. 2007;74:759-64.
117. Yang LP, Keam SJ, Keating GM. [Deferasirox: a review of its use in the management of transfusional chronic iron overload](#). *Drugs*. 2007;67:2211-30.
118. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. [Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs](#). *Blood*. 2005;106:2196-9.
119. Higgs DR. [Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassemia](#). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004;1-13.
120. Weatherall DJ. [Thalassaemia: the long road from bedside to genome](#). *Nat Rev Genet*. 2004;5:625-31.
121. Quek L, Thein SL. [Molecular therapies in beta-thalassaemia](#). *Br J Haematol*. 2007;136:353-65.
122. Dissayabutra T, Tosukhowong P, Seksan P. [The benefits of vitamin C and vitamin E in children with beta-thalassemia with high oxidative stress](#). *J Med Assoc Thai*. 2005;88(Suppl 4):S317-21.

123. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Gentile C, Livrea MA. [Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells](#). Free Radic Res. 2006;40:753-61.
124. Ghavamzadeh A, Iravani M, Ashouri A, Mousavi SA, Mahdavi N, Shamshiri A, et al. [Peripheral blood versus bone marrow as a source of hematopoietic stem cells for allogeneic transplantation in children with class I and II beta thalassemia major](#). Biol Blood Marrow Transplant. 2008;14:301-8.
125. Sadelain M. [Recent advances in globin gene transfer for the treatment of beta-thalassemia and sickle cell anemia](#). Curr Opin Hematol. 2006;13:142-8.
126. Xie SY, Ren ZR, Zhang JZ, Guo XB, Wang QX, Wang S, et al. [Restoration of the balanced alpha/beta-globin gene expression in beta654-thalassemia mice using combined RNAi and antisense RNA approach](#). Hum Mol Genet. 2007;16:2616-25.
127. Moi P, Sadelain M. [Towards the genetic treatment of beta-thalassemia: new disease models, new vectors, new cells](#). Haematologica. 2008;93:325-30.

Correspondência:

Fernando Ferreira Costa
Hemocentro - Unicamp
Caixa Postal 6198
CEP 13083-970 - Campinas, SP
Tel.: (19) 3521.4726
Fax: (19) 3521.4798
E-mail: ferreira@unicamp.br