

ANEMIA FALCIFORME: ENFOQUE EM ALVOS INFLAMATÓRIOS PELA HIDROXIURÉIA

SICKLE CELL DISEASE: APPROACH IN INFLAMMATORY TARGETS BY
HYDROXYUREA

Angelina Azevedo Viana (Viana AA) *

Itamar Souza Oliveira-Júnior (Oliveira-Júnior IS)**

RESUMO

Introdução: A anemia falciforme é uma desordem da beta-globina monogênica que se caracteriza pela produção anormal da estrutura da hemoglobina (Hb) de variante S. Esta alteração causa anemia hemolítica severa, episódios de dores por causa da crise vaso-oclusiva que leva a uma deficiência no aporte de oxigênio para os tecidos com consequente lesão de órgãos. Por várias décadas tornou-se evidente que um processo mais complexo contribui para a miríade da doença, uma vez que as complicações clínicas geradas pelo processo inflamatório são observadas clinicamente em pacientes. A inflamação é um componente fundamental na fisiopatologia da anemia falciforme uma vez que impacta sobre muitas vias do sistema, desta forma a inflamação ocorre por diversos fatores como o heme extracelular, o inflamassomo, fator nuclear kappa B (NF-kB), mastócitos, vias inflamatórias invariáveis de linfócitos, célula T natural killer, entre outras. A hidroxiuréia é a única droga aprovada pelo Food and Drugs Administration para a anemia falciforme, esta droga reduz muitos eventos clínicos, tais como, episódios de dor por vaso-oclusão, hospitalizações, síndrome pulmonar aguda e necessidades de transfusões. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento sobre a anemia falciforme tendo como foco alguns alvos inflamatórios pela hidroxiuréia. **Metodologia:** Para esta revisão utilizamos livros e artigos científicos sobre o tema, sendo este último acessado por meio da Scielo e Pubmed, e utilizando os seguintes descritores: anemia falciforme (*anemia falciform*), hemoglobina S (*hemoglobin variant S*), vias da inflamação (*inflammatory pathways*), hidroxiuréia (*hydroxyurea*), patogênese da anemia falciforme (*pathogenesis of falciform anemia*). **Conclusão:** Concluimos que a hidroxiuréia reage com a deoxi-Hb, oxi-Hb e Met-Hb gerando nitro-Hb. Assim o efeito antiinflamatório é o de reduzir o fator de necrose tumoral-alfa e aumentar a interleucina-10 que é um inibidor de macrófagos ativados, o que reduz episódios de dor por vaso-oclusão e síndrome torácica aguda.

Palavras-chaves: Anemia Falciforme, inflamação, lesão órgãos, hidroxiuréia.

* Aluna do Curso de Biomedicina das Faculdades Metropolitanas Unidas.

** Docente do Curso de Biomedicina das Faculdades Metropolitanas Unidas.

ABSTRACT

Introduction: Sickle cell disease is a disorder of the beta-globin monogenic characterized by abnormal production of hemoglobin structure (Hb) variant S. This change causes severe hemolytic anemia and pain episodes because of vaso-occlusive crisis leading to a deficiency in oxygen supply to the tissues with consequent organ damage. For several decades it has become clear that a more complex process contributes to the myriad of disease, since the clinical complications caused by inflammation were observed clinically in patients. Inflammation is a critical component in the pathophysiology of sickle cell anemia as it impacts on many system pathways, thereby inflammation occurs by several factors such as the extracellular heme, the inflammasome, nuclear factor kappa B (NF- κ B), mast cells, inflammatory pathways invariant lymphocytes, natural killer T cell, among others. Hydroxyurea is the only drug approved by the Food and Drug Administration for sickle cell anemia, this drug reduces many clinical events such as pain episodes by vaso-occlusion, hospitalization, acute pulmonary syndrome and transfusion requirements. Objective: The objective of this study was to survey about sickle cell anemia focusing on some inflammatory targets by hydroxyurea. Methodology: For this review we use scientific books and articles on the subject, the latter being accessed through Scielo and Pubmed, and using the following keywords: sickle cell anemia, hemoglobin variant S, inflammation pathways, hydroxyurea, and pathogenesis of sickle cell disease. Conclusion: We conclude that hydroxyurea reacts with deoxy-Hb, oxy-Hb and Met-Hb generating nitro-Hb. Thus the anti-inflammatory effect is to reduce tumor necrosis factor-alpha and increase interleukin-10 which is an inhibitor of activated macrophages, which reduces episodes of pain by vessel occlusion and acute chest syndrome.

Key Words: Sickle cell disease, inflammation, organ damage, hydroxyurea.

INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é uma desordem da beta-globina monogênica que se caracteriza pela produção anormal da estrutura da hemoglobina (Hb) de variante S. Esta alteração causa anemia hemolítica severa, episódios de dores por causa da crise vaso-oclusiva que leva a uma deficiência no aporte de oxigênio para os tecidos com consequente lesão de órgãos. (BELCHER, et al., 2005).

Por várias décadas tornou-se evidente que um processo mais complexo contribuiu para a miríade da doença, uma vez que as complicações clínicas geradas pelo processo inflamatório observado clinicamente em pacientes. (TAYLOR, et al, 1995.).

O indivíduo pode apresentar formas homocigotas (SS) ou heterocigotas (AS) para a presença de hemoglobina S. Os indivíduos heterocigotas (AS) ou portadores do traço falciforme são assintomáticos. O termo anemia falciforme fica reservado para a forma de doença que ocorre nos indivíduos homocigotas.

A utilização de fármacos que visem às vias inflamatórias específicas pode oferecer uma melhor estratégia terapêutica, uma vez que são ferramentas úteis para o entendimento dos mecanismos moleculares e celulares, nos eventos clínicos da anemia falciforme.

A inflamação é um componente fundamental na fisiopatologia da anemia falciforme uma vez que impacta sobre muitas vias do sistema, desta forma a inflamação sistêmica leva a um aumento severo nas concentrações de marcadores inflamatórios (TAYLOR, et al., 1995).

A hidroxiuréia é a única droga aprovada pela agência americana de drogas (Food and Drugs Administration) para a anemia falciforme, esta droga reduz muitos eventos clínicos, tais como, episódios de dor por vaso-oclusão, hospitalizações, síndrome torácica aguda e necessidades de transfusões (STEINBERG, et al,2010.)

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento sobre a anemia falciforme tendo como foco o uso da hidroxiuréia em alguns alvos inflamatórios.

METODOLOGIA

Para esta revisão utilizamos livros e artigos científicos sobre o tema, sendo este último acessado por meio da Scielo e Pubmed, e utilizando os seguintes descritores: anemia falciforme (*anemia falciform*), hemoglobina S (*hemoglobin variant S*), vias da inflamação (*inflammatory pathways*), patogênese da anemia falciforme (*pathogenesis of falciform anemia*) e hidroxiuréia (*hydroxyurea*).

DESENVOLVIMENTO

A molécula de hemoglobina é constituída por um tetrâmero formado por duas subunidades de cadeias globínicas, cada uma ligada a um grupo heme, sendo constituído pela protoporfirina IX (anel porfirínico) ligado a um átomo de ferro central (Fe^{++}), que é responsável pela ligação com oxigênio (FRENETTES, et al, 2007.).

Até o ano de 1998, tinham sido identificadas 750 variantes de hemoglobinas estruturais, sendo mais de 75% destas variações dadas por uma única substituição de

aminoácido na cadeia da globina α ou β , representando aproximadamente 20% das 2.600 mudanças teóricas possíveis de ocorrer nos genes das globinas. Algumas variantes estruturais das hemoglobinas são prejudiciais, uma vez que a substituição do aminoácido altera a função ou a estabilidade da molécula de hemoglobina, sendo estas variantes, HbS, HbC e HbD, as mais frequentemente observadas na população brasileira, o que resulta em quadros clínicos bem definidos (BONINI, et al, 1993.).

As hemoglobinopatias podem ser classificadas de acordo com o tipo de alteração presente na hemoglobina em formas clínicas distintas: forma homozigótica SS, que é a anemia falciforme (HbSS) e as formas heterozigóticas, representadas pelas associações de HbS com outras variantes de hemoglobinas, tais como: HbC, HbD e as interações com as talassemias (α , β^0 e β^+). (Brasília: Anvisa, 2001.).

A sobrevivência das células falciformes é curta (entre 16-20 dias) quando comparamos com os eritrócitos normais (120 dias). (NAOUM, et al, 2004.).

O primeiro relato sobre um caso diferenciado de anemia falciforme foi observado em 1910 pelo médico James Herrick que observou, microscopicamente, o aspecto anômalo e alongado (em forma de foice) das hemácias. Linus Pauling e colaboradores, em 1949, comparando HbS (falciforme) com HbA (normal) observaram através de eletroforese diferenças nos pontos isoelétricos das diferentes hemoglobinas sugerindo diferenças no número ou tipo de grupos ionizáveis entre as hemoglobinas (PAULING, et al, 1949.).

A anemia falciforme é caracterizada por uma notável variabilidade entre os indivíduos afetados, sendo que os fatores que modificam a concentração intra-eritrocitária da hemoglobina S podem influenciar a expressão clínica da doença assim como a quantidade e composição da hemoglobina F e sua associação com outras variantes estruturais (NAGEL, et al, 1985.)

A anemia falciforme foi a primeira doença monogenética a ser caracterizada de forma molecular. É uma doença genética autossômica recessiva caracterizada por uma mutação pontual (GuaninaTiminaGuanina para GuaninaArgininaGuanina) no 6º códon do gene da β -globina que leva à substituição do ácido glutâmico para um resíduo de valina no gene da cadeia β -globina. (INGRAM, 1957.), (INGRAM, 1959.), (INGRAM, 2004.).

Na presença de baixa tensão de oxigênio, a HbS sofre polimerização que leva à transformação clássica do eritrócito, que é bicôncava, em foice. (BUNN, et al, 1997.), desta forma o eritrócito vai sendo repetidamente submetido a forma de foice na microcirculação e sua capacidade de retornar a forma normal se torna perdida. Assim a ocorrência de vaso-oclusão principalmente nas vênulas é o fator determinante no surgimento de sinais e sintomas clínicos sendo os mais observados: crises álgicas, síndrome torácica aguda, úlceras de membros inferiores, priapismo, colelitíase, seqüestro esplênico, acidente vascular

encefálico, retinopatias, insuficiência renal crônica, entre outros. (GODEAU, et al, 1991.). (FALK, et al, 1992.).(STYLES, et al, 1996.).(MILLER, et al, 2001.).(KODURI, et al, 2001.).

A inflamação sistêmica em pacientes é um fator bem evidenciado pelo aumento das concentrações de vários marcadores inflamatórios, tais como: interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8, fator de necrose tumoral-alfa. O aumento dos leucócitos está associado com o desenvolvimento de complicações severas que incluem a síndrome torácica aguda, derrame e com a alta taxa de mortalidade. (FRANCIS, et al, 1992.).(PLATT, et al, 1994.). (TAYLOR, et al, 1995.). (DUITS, et al, 1998.).

Os indivíduos portadores de anemia falciforme necessitam de cuidados médicos preventivos e terapias que englobem as manifestações agudas e crônicas da doença. De acordo com o Ministério da Saúde, o tratamento inclui: educação do doente e da família; aconselhamento genético da família e detecção de outros portadores; acompanhamento do crescimento e desenvolvimento neuromotor e sexual; vacinação (incluindo vacina antipneumocócica e contra hepatite B); profilaxia de septicemia com uso regular de penicilina; suplementação de ácido fólico; tratamento farmacológico (hidroxiuréia); acompanhamento para detectar acentuação da anemia; transfusões sanguíneas; exames regulares para detecção de complicações oculares (exame de fundo de olho), cardíacas, renais e hepáticas; exames adicionais para esclarecer alterações detectadas: oculares, cardíacas, renais, hepáticas, metabólicas, acentuação da anemia; tratamento ou prevenção de complicações específicas (dor, febre, sequestro esplênico, acidente vascular encefálico, etc.). (BRASIL, 2001.).

Em pacientes com anemia falciforme que expressão no eritrócito de glicoproteína integral de membrana e receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC – *Duffy antigen receptor for chemokines*), sendo o DARC um modulador da biodisponibilidade de mediadores pró-inflamatórios, foram encontrada em uma contagem de glóbulos brancos em estágios estacionários mais elevados e níveis de quimiocinas DARC vinculados, a IL-8 e na regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES – *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) (NEBOR et al, 2010.).

Estudos de expressão gênica mostraram que eritrócitos falciformes, direta ou indiretamente, promoviam uma hiper-regulação endotelial de fator de necrose tumoral-alfa e IL-1 (SHIU, et al, 2000.), (BROWN, et al, 2001.) Jison e colaboradores, em 2004, demonstraram expressão gênica diferencial em 112 genes envolvidos na inflamação, metabolismo do heme, regulação do ciclo celular, resposta antioxidante e angiogênese em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com anemia falciforme. (JISON et al, 2004.).

Dentre os fármacos utilizados como potenciais no tratamento da anemia falciforme, a hidroxiuréia atua como inibidor da síntese de ribonucleotídeo redutase, uma vez que

converte ribonucleotídeos em deoxiribonucleotídeos limitando, assim, a síntese de ácido desoxiribonucléico (DNA), desta forma age como agente antineoplásico e citotóxico que interfere no ciclo celular nas fases S e G1 (YARBRO, além de ação hemoreológica o que melhora o fluxo sanguíneo, diminui a concentração de HbS e ser fonte de óxido nítrico (SPACE, et al, 2000), (STEINBERG, et al, 2006.)

A hidroxiuréia aumenta a hidratação dos eritrócitos e reduz a expressão de moléculas de adesão na superfície eritrocitária (BALLAS, et al, 1989.), (STYLES, et al, 1997.).

Além do exposto acima o tratamento com a hidroxiuréia está associado com uma redução na contagem absoluta, adesão e degranulação de eosinófilos, e também por não possuir impacto na expressão de eotaxin-2 e 3, RANTES ou na produção de espécies reativas do oxigênio pelos eosinófilos, sugerindo uma grande influência da droga nesta célula.(PALLIS, et al, 2014).

Por outro lado a droga também acaba por reduzir a expressão de E-selectina e P-selectina, molécula de adesão intracelular (ICAM – *intracellular adhesion molecules*), molécula de adesão das células endoteliais plaquetárias-1(PECAM-1 – *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) e molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1 - *vascular cell adhesion protein 1*) (MOHAN et al, 2005), (ELMARIAH et al, 2014) que estão implicadas na crise vaso-oclusiva (MANWANI, et al 2013) e são expressas predominantemente por células endoteliais e leucócitos (BRUN M. et al, 2003).(LAURANCE A. et al, 2011).

Em um estudo experimental a hiporegulação da expressão de E-selectina protegeu camundongos com anemia falciforme de infecção pneumocócica letal por atenuar as interações dos leucócitos com o endotélio vascular. (LEBENSBURGER JD, et al, 2012.)

Vale lembrar que em muitos países o transplante de células-tronco hematopoiéticas é a única terapia utilizada para o cura da anemia falciforme sendo que mais de 100 crianças com anemia falciforme são beneficiadas com o transplante de medula óssea nos Estados Unidos da América. (WALTERS MC, et al. 1999).

A Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea incluiu a anemia falciforme na lista das doenças que possuem indicação de transplante de medula óssea. Para tal indicação houve a elaboração de um documento que levou em consideração estudos internacionais, estes estudos apontam cura dos doentes tratados com transplante. Atualmente, esse tipo de procedimento não consta na lista de indicações do Ministério da Saúde brasileira, pois este acredita que os estudos até hoje realizados ainda não apresentam evidências suficientes para recomendar a disponibilização da técnica de forma irrestrita.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É mister frisar que o transplante de medula óssea resulta em uma sobrevivência de 90-95% e uma média de cura de 85% e com uma rejeição de aproximadamente 10%.(WALTERS MC ET AL, 1997). Para o tratamento é necessária compatibilidade com o HLA, contudo outros protocolos de pesquisas utilizando células de cordão umbilical e técnicas não-mieloablativas são utilizados para aumentar as chances de um potencial doador (WALTERS MC, 1999)

Nosso levantamento demonstrou que a hidroxiuréia pode proteger pacientes com anemia falciforme de infecções bacterianas, além disto, o plasma de pacientes com a doença contém elevada concentração de fator de necrose tumoral-alfa, IL-6, IL-1 beta, IL-17 e IL-8 e reduzida concentração de IL-10 indicando que mais estudos devem ser realizados para a produção de novos fármacos que alterem fatores pró- e anti-inflamatórios. Concluímos que a hidroxiuréia reage com a deoxi-Hb, oxi-Hb e Met-Hb gerando nitro-Hb. Assim o efeito antiinflamatório é o de reduzir o fator de necrose tumoral-alfa e aumentar a interleucina-10 que é um inibidor de macrófagos ativados, o que reduz episódios de dor por vaso-oclusão e síndrome torácica aguda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALLAS SK, DOVER GJ, CHARACHE S. Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes in vivo. **Am J Hematol.** 1989;32 (2):104-11.
2. BAUDIN V, PAGNIER JD, LABIE D et al. **Heterogeneity of sickle cell disease as shown by density profiles: effects of fetal hemoglobin and alpha thalassemia.** **Haematologia**1986;19(3):177-84.
3. BELCHER JD, MAHASETH H, WELCH TE, et al. Critical Role of Endothelial Cell Activation in Hypoxia-induced vaso-occlusion in transgenic sickle mice. **J Am Physiol Heart Circ Physiol.** 2005; 288:h2715–25.
4. BELCHER JD, MAHASETH H, WELCH TE, et al. Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vaso-occlusion in transgenic sickle mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2005;288(6):H2715–2725.
5. BONINI-DOMINGOS CR. Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista 1993:231f.
6. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes.** Brasília, 2001, Anvisa, p. 142.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população brasileira afrodescendente.** Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

8. BROWN MD, WICK TM, ECKMAN JR. Activation of vascular endothelial cell adhesion molecule expression by sickle blood cells. **Pediatr Pathol Mol Med.** 2001;20(1):47-72.
9. BRUN M, BOURDOULOUS S, COURAUD PO, ELION J, KRISHNAMOORTHY R, LAPOUMEROULIE C. Hydroxyurea downregulates endothelin-1 gene expression and upregulates ICAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. **Pharmacogenomics J.** 2003;3(4):215-26.
10. BUNN HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med.** 1997; 337 (11):762-9.
11. DUITTS AJ, SCHNOG JB, LARD LR, SALEHAW, ROJER RA. Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. **Eur J Haematol.** 1998; 61(5):302-305.
12. DUNCAN ND, SMITH AI, MCDONALD AH, et al. Biliary surgery in sickle cell disease: the Jamaican experience. **J R Coll Surg Edinb.** 2002;47 (1):414-7.
13. ELMARIAH H, GARRETT ME, DE CASTRO LM, et al. Factors associated with survival in a contemporary adult sickle cell disease cohort. **Am J Hematol.** 2014;89(5):530-5.
14. Embury S, Hebbel RP, Mohandas N, Steinberg MH. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. New York: Raven Press, 1995.
15. FALK RJ, SCHEINMAN J, PHILLIPS G, ET AL. Prevalence and pathologic features of sickle cell nephropathy and response to inhibition of angiotensin-converting enzyme. **N Engl J Med.** 1992;326(14): 910-5.
16. FRANCIS RB JR, HAYWOOD LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **J Natl Med Assoc.** 1992;84(7):611-5.
17. FRENETTE PS, ATWEH GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest.** 2007;117 (4): 85-858.
18. GALIZA NETO GC, PITOMBEIRA MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J Bras Patol Med Lab.** 2003;39(1):51-6.
19. GODEAU B, GALACTEROS F, SCHAEFFER A, et al. Aplastic crisis due to extensive bone marrow necrosis and human parvovirus infection in sickle cell disease. **Am J Med.** 1991;91(5):557-8.
20. INGRAM VM. Abnormal human haemoglobins. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. **Biochim Biophys Acta.** 1959;36, 402-411.
21. INGRAM VM. Gene mutations in human haemoglobin the chemical difference between normal and sickle haemoglobin. **Nature.** 1957; 180 (4581): 236-8.
22. INGRAM VM. Sickle - cell anemia hemoglobin: the molecular biology of the first "molecular disease" the crucial importance of serendipity. **Genetics.** 2004; 167 (1): 1-7.
23. JISON ML, MUNSON PJ, BARB JJ, et al. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. **Blood.** 2004;104(12):270-80.
24. KODURI PR, AGBEMADZO B, NATHAN S. Hemoglobin S-C disease revisited: clinical study of 106 adults. **Am J Hematol.** 2001;68(4):298-300.

25. LAURANCE S, LANSIAUX P, PELLAY FX, et al .Differential modulation of adhesion molecule expression by hydroxycarbamide in human endothelial cells from the micro- and macrocirculation: potential implications in sickle cell disease vaso-occlusive events. **Haematologica**. 2011;96(4):534-42.
26. LEBENSBURGER JD, HOWARD T, HU Y, et al. Hydroxyurea therapy of a murine model of sickle cell anemia inhibits the progression of pneumococcal disease by down-modulating E-selectin. **Blood**.2012;119(8):1915-21.
27. MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE DOENÇAS FALCIFORMES. Brasília: Anvisa, 2001, p.142.
28. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília: Anvisa, 2001, p. 142.
29. MANWANI D, FRENETTE PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**.2013; 122(24):3892-8.
30. MILLER ST, MACKLIN EA, PEGELOW CH, et al. Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **J Pediatr**.2001;139(3):385-390.
31. MOHAN JS, LIP GY, WRIGHT J, BAREFORD D, BLANN AD. Plasma levels of tissue factor and soluble E-selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation. **Blood Coagul Fibrinolysis**. 2005;16(3):209-14.
32. NAGEL RL, FABRY ME, PAGNIER J, et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. **N Engl J Med**. 1985, 312 (14):880-4.
33. NAOUM PC, NAOUM FA. **Doença das células falciformes**. 1ª ed. São Paulo: Savier; 2004.
34. NEBOR D, DURPES MC, MOUGENEL D, et al. Association between Duffy antigen receptor for chemokines expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients. **Clin Immunol**. 2010;136(1):116-22.
35. PALLIS FR, CONRAN N, FERTRIN KY, OLALLA SAAD ST, COSTA FF, FRANCO-PENTEADO CF. Hydroxycarbamide reduces eosinophil adhesion and degranulation in sickle cell anaemia patients. **Br J Haematol**.2014;164(2):286-95.
36. PAULING L, ITANO HA, SINGER SJ, WELLS IC. Sickle cell anemia: a molecular disease. **Science**. 1949; 110 (2865): 543-8.
37. PEGELOW CH, MACKLIN EA, MOSER FG, et al. Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. **Blood**. 2002;99(8):3014-8.
38. 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(11):1639-44.
39. POWARS DR, JOHNSON CS. Priapism. **Hematol Oncol Clin N Am**. 1996;**10 (6):1363-1372**.

40. SHIU YT, UDDEN MM, MCINTIRE LV. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. **Blood**.2000;95 (10):3232-41.
41. SPACE SL, LANE PA, PICKETT CK, WEIL JV. Nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. **Am J Hematol**.2000; 63(4): 200-4.
42. STEINBERG MH, MCCARTHY WF, CASTRO O, et al. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. **Am J Hematol**. 2010; 85 (6):403-8.
43. STEINBERG MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends Pharm Sci**.2006; 27(4): 204-10.
44. STYLES LA, LUBIN B, VICHINSKY E, et al. Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. **Blood**.1997;89(7):2554-9.
45. STYLES LA, VICHINSKY EP. Core decompression in a vascular necrosis of the hip in sickle-cell disease. **Am J Hematol**.1996; 52(2):103-7.
46. TAYLOR SC, SHACKS SJ, MITCHELL RA, BANKS A. Serum interleukin-6 levels in the steady state of sickle cell disease. **J Interferon Cytokine Res**. 1995;15(12):1061-4.
47. WALTERS MC, PATIENCE M, LEISENRING W, et al. Bone marrow transplantation for sickle cell disease. **N Engl J Med** 1996;335:369-76.
48. WALTERS MC, PATIENCE M, LEISENRING W, ET AL. Collaborative multicenter investigation of marrow transplantation for sickle cell disease: current results and future directions. **Biol Blood Marrow Transplant** 1997;3(6):310-5.
49. WALTERS MC. Bone marrow transplantation for sickle cell disease: where do we go from here? **J Pediatr Hematol Oncol**.1999;21(6):467-74.
50. YARBRO JW. Mechanism of action of hydroxyurea. **Semin Oncol**.1992; 19(3 Suppl 9): 1-10.