

Anemia falciforme:

Un cambio de paradigma en patofisiología de esta enfermedad

Iryna Rusanova*

Abstract

Tradicionalmente, la patofisiología de anemia falciforme se explica a través de la polimerización de la hemoglobina falciforme (HbS), que aumenta en condiciones de hipoxia, provocando la oclusión de los vasos sanguíneos pequeños. Pero este paradigma cambia a partir de los finales de los años noventa, cuando varios grupos de científicos a nivel mundial confirman que además del cambio estructural de la hemoglobina, esta enfermedad genética en su gran parte se explica por el proceso de disfunción endotelial que se desarrolla debido al aumento del estrés oxidativo, falta de biodisponibilidad de óxido nítrico, aumento de procesos inflamatorios y de adhesión celular a las paredes de vasos sanguíneos; además de las variantes genéticas dentro de los grupos de varios genes, como por ejemplo cluster globínico beta. La hemoglobina liberada de los eritrocitos afectados contribuye al consumo de un importante vasodilatador, óxido nítrico, aumenta la producción de radicales libres de oxígeno

* Universidad Especializada de las Américas (UDELAS), Departamento de Biomedicina, Panamá.

y de nitrógeno, y finalmente, se produce una serie de complicaciones clínicas que disminuyen las expectativas de vida de los pacientes con anemia falciforme. Las contribuciones al entendimiento de esta enfermedad permitirán buscar unas nuevas terapias dirigidas a combatir el estrés oxidativo, la hemólisis y la destrucción de óxido nítrico para beneficiar la calidad de vida de los pacientes.

Introducción

La primera observación de los eritrocitos falciformes se realizó en 1910 por James Herrick en un frotis de sangre periférica de un estudiante negro originario de la Grenada, que murió a los 32 años a causa de neumonía. En 1949 Pauling y sus colegas informaron sobre la existencia de la Hb anormal S (HbS) y se introdujeron el concepto de enfermedad molecular. Pauling en su artículo "Sickle-cell Anemia, a Molecular Disease" publicado in Science (1949), demostró que la hemoglobina de los pacientes con anemia falciforme tiene la carga eléctrica diferente a la de las moléculas de personas sanas. Afirmó que la enfermedad puede ser provocada por alteración en una molécula, y que es hereditaria, por ende, los genes determinan la estructura de la hemoglobina proteica. Esto tuvo tanta importancia, que dio inicio a la

época de la medicina molecular y en 1954 Pauling fue galardonado con el Premio Nobel de Química.

Poco después, en el año 1959, Vernon M. Ingram demostró que la hemoglobina S es el resultado de una mutación en el codón 6 del gen de la globina beta en la que la base timina es sustituida por la adenina (GTG ® GAG) lo que ocasiona que el ácido glutámico en la posición 6 de la globina sea sustituido por la valina. Como esta sustitución se lleva a cabo en una posición superficial de la molécula de hemoglobina y la carga eléctrica es diferente, la movilidad electroforética de la HbS es menor que la de la hemoglobina normal, pudiéndose ser fácilmente separada por electroforesis.

La anemia falciforme y la beta-talasia son las dos de las más frecuentes enfermedades genéticas del mundo. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima, que unos 5% de la población mundial portan genes de las hemoglobinopatías, y el 50% de estas hemoglobinopatías viene dado por la anemia falciforme o drepanocitosis. Cada año nacen alrededor de 370,000 niños con talasemia y anemia falciforme (1, 2), de los cuales más de 200 000 son africanos.

También en Europa y Asia se presenta en países de la cuenca mediterránea, como Turquía, Grecia, Italia,

España y Oriente Medio, así como en los países árabes e India Oriental. En América se da en los Estados Unidos (en personas de origen africano o afroamericano) y en el Caribe, América Central y del Sur (Brasil) (3).

El gen de anemia falciforme se ha hecho frecuente en África porque el rasgo heterocigota confiere cierta resistencia al paludismo provocado por parásito *Plasmodium falciparum* durante la infancia, favoreciendo así la supervivencia del huésped y la consiguiente transmisión del gen de la hemoglobina anormal. Aunque la presencia de un único gen anormal puede proteger del paludismo, la herencia de dos genes anormales produce anemia falciforme.

Esta enfermedad tiene importantes repercusiones en la salud pública. Cuando el impacto en la salud se mide en función de la mortalidad de los menores de cinco años, la anemia falciforme es la causa de la muerte de un 5% de este segmento de la población en el continente africano, de más de un 9% en África occidental y de hasta un 16% en algunos países de esta subregión. Por ejemplo, en Nigeria, que es sin duda el país más poblado de la subregión, el 24% de la población es portadora del gen mutante, y la prevalencia de la anemia falciforme es de aproximadamente 20 casos por 1000 nacidos. Esto significa que sólo en Ni-

geria nacen anualmente unos 150 000 niños con esta hemoglobinopatía (4).

La detección masiva de anemia falciforme en Estados Unidos inició en el año 1975, y eso permitió diagnosticarla desde los primeros meses de nacimiento. Un seguimiento en la evaluación de estos niños y la administración temprana de penicilina redujo notablemente la morbilidad y la mortalidad en los niños diagnosticados. La supervivencia mediana estimada en los Estados Unidos de América en 1994 era de 42 años para los hombres y 48 años para las mujeres, mientras que en Jamaica, en 2001, era de 53 años para los hombres y 58,5 años para las mujeres.

Anemia falciforme representa un importante problema para la salud pública. Solo en Estados Unidos entre los años 1989 y 1992 se reportó 75,000 hospitalizaciones por año. En 1996 estas hospitalizaciones sumaron \$475 millones de dólares anuales (5).

En Panamá y Costa Rica según los datos de la OPS existe un 8 por ciento de la población afectada por esta enfermedad (5). Sin embargo, no hay datos claros publicados sobre la prevalencia de esta enfermedad en la República de Panamá.

Solamente a partir de ahora, luego de la aprobación del ley nacional de tamizaje neonatal, en el año 2007, se

va a poder a realizar un diagnóstico masivo y determinar la prevalencia de anemia falciforme en distintas zonas de Panamá y en país en general.

Clínica

Las manifestaciones clínicas de la anemia drepanocítica clásica han sido bien definidas desde hace mucho tiempo y se han caracterizado por un conjunto de signos y síntomas propios de una anemia hemolítica crónica grave, con incremento de la susceptibilidad a las infecciones, retraso del crecimiento y desarrollo, crisis de dolor por oclusión vascular, cuadro torácico agudo, síndrome de secuestro esplénico, daño tisular, trastornos del sistema nervioso central, crisis aplásicas y hemolíticas y asplenia funcional (6). La anemia falciforme tiene un amplio espectro clínico y la gravedad de los síntomas puede variar mucho de un paciente a otro. La mayoría de los afectados tienen anemia crónica con una hemoglobinemia (concentraciones de Hb en la sangre) de alrededor de 8 g/dl.

Patofisiología de anemia falciforme

Anemia falciforme es la primera enfermedad congénita en la cuál fue identificado el error genético específico. Pero, a pesar del mismo error genético, los pacientes presentan una

serie de síntomas y síndromes muy variados. Aunque la gran parte de patofisiología de esta enfermedad es explicada por la polimerización de la hemoglobina falciforme dentro de los eritrocitos, existen otros factores implicados que cambian el paradigma de patofisiología de esta enfermedad. Los estudios en distintas poblaciones y durante las últimas décadas indican que la fisiopatología involucra factores genéticos (polimorfismos de distintos genes), y otros factores relacionados con la disfunción endotelial.

La disfunción endotelial se define como el estado patológico caracterizado por el desequilibrio entre la producción de factores vasodilatadores y vasoconstrictores, entre las propiedades procoagulantes y anticoagulantes y por alteración de la permeabilidad vascular. La vasooclusión, responsable de las crisis de dolor y daños multiorgánicos, se relaciona con la inflamación, un aumentado estrés oxidativo y la disfunción endotelial.

Todos los participantes moleculares están relacionados: por un lado, disminuyen las defensas antioxidantes, y por otro lado, aumenta la formación de las especies reactivas de oxígeno. Además, se producen cambios en la disponibilidad de sustratos y cofactores para la enzima óxido nítrico sintasa, que conlleva a la disminución

de biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) y el aumento en la formación de especies reactivas de nitrógeno.

Otros estudios también indican que aumenta la respuesta inflamatoria microvascular, del mismo modo que durante la aterosclerosis e hipertensión. Como el resultado de todos estos eventos, se produce un desequilibrio en el funcionamiento de las células endoteliales que conlleva al aumento de vasoconstricción y adhesión celular.

Polimorfismos de genes del cluster globínico beta

Los aspectos genéticos más estudiados son los cambios de un solo nucleótido o SNPs en el bloque o cluster de genes beta, denominados haplotipos del cluster beta. Este cluster se localiza en cromosoma 11 (11p15.5) y contiene alrededor de 45 kb, incluyendo cinco genes funcionales y un pseudogen. El orden de ubicación de los genes es: 5'- epsilon, gamma G, gamma A, beta 1 pseudogene, delta, beta -3'. Todos estos genes tienen una estructura similar (dos exones y tres intrones) que lleva a concluir que se derivan un solo gen ancestral. Los genes de las globinas son regulados durante el desarrollo y se expresan en los momentos específicos de la vida humana.

El cluster beta se divide en cluster 5' y 3'. Un haplotipo responde a un

patrón de secuencias polimórficas que son estudiadas por medio de enzimas de restricción. La combinación o patrón aleatorio de los sitios de restricción polimórficos en un cromosoma es lo que define el haplotipo de un gen.

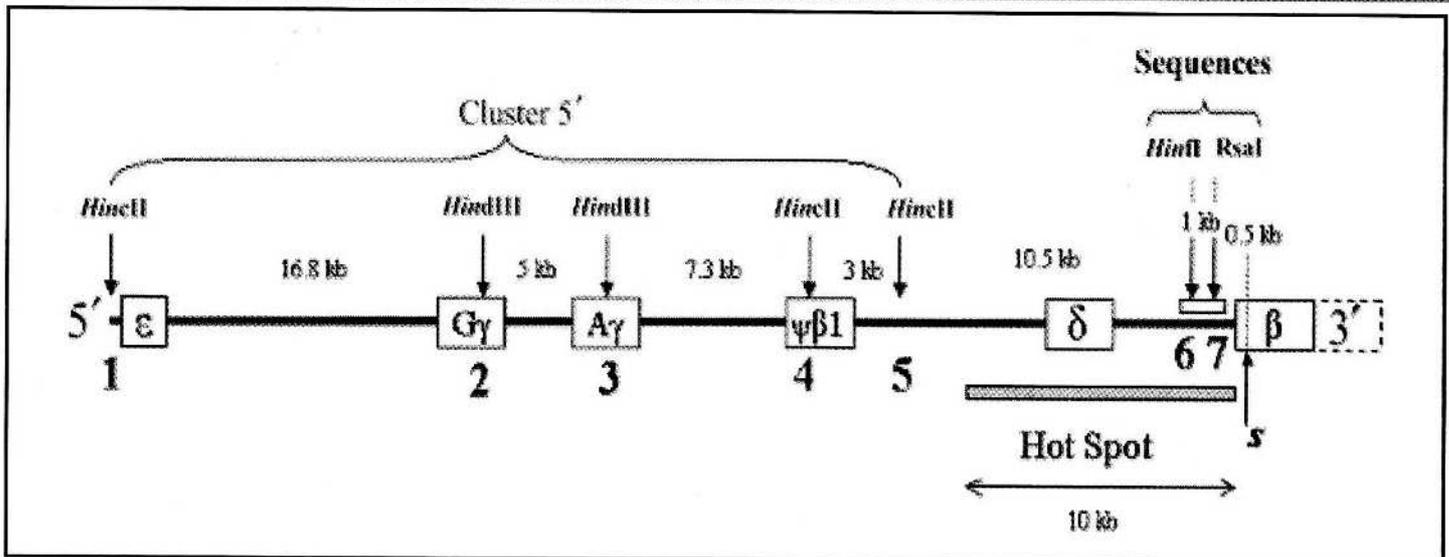
La introducción de técnicas de Biología Molecular, entre ellas, el uso de enzimas de restricción obtenidas de bacteriófagos específicos, dio un nuevo impulso para el estudio de la HbS al encontrar que existen distintos patrones de digestión o restricción dentro del cluster beta y que además, se relaciona con sus orígenes geográficos. Desde la primera descripción de estos fragmentos por Kan y Dozy (7) se ha demostrado que al menos hay 5 tipos de HbS: SS-Benin, SS-Bantú (CAR, República Central Africana), SS-Senegal, SS-Camerún, SS-Árabe-Indio, y todos estos tipos de drepanocitosis se caracterizan por la misma mutación, pero diferente extensión en los cambios moleculares ocurridos a lo largo del cluster b (8, 9, 10). Otros autores reportan seis haplotipos, separando el haplotipo Árabe-Indio en Arabé-saudi y Asiático-indio (11).

La importancia de conocer los haplotipos radica en que los de tipo Bantu y Benin acusan una gravedad mayor que los de tipo Senegal, árabe-saudí y asiático-indio, en los cuales los pacientes pueden presentar síntomas

FIGURA

1

Esquema de cluster globínico beta.



diversos desde el segundo mes de edad, razón por la que requieren mayor y mejor atención médica continua (12). Por ejemplo, se ha visto que los neonatos con haplotipo Bantu (CAR) en su estado homocigoto tienen un mayor riesgo para desarrollar accidentes cerebrovasculares (13).

Aun que también se reportan estudios donde no se encuentra la correlación entre la gravedad clínica de la enfermedad y los haplotipos (14).

Las variaciones en la expresión de la hemoglobina fetal

La hemoglobina fetal tiene dos cadenas alfa y dos cadenas gamma G γ y tiene mayor afinidad por el oxígeno, además inhibe la polimerización de HbS, permitiendo llevar las cantida-

des suficientes de oxígeno a los tejidos periféricos. La concentración de HbF al nacimiento es de 80% y disminuye al cumplir 6 meses.

Se ha reportado que existen varios factores que influyen en las variaciones de HbF en los pacientes falcémicos, entre éstos se destacan: edad, sexo, cantidad de las globinas alfa, haplotipos beta y locus ligado al cromosoma X, que regula la producción de eritrocitos F (FCP). Cada una de estas variables presenta asociación con los niveles F, pero la participación de FCP es de mayor prevalencia (40%) (15).

Los pacientes con anemia falciforme presentan distintos niveles de HbF, y se ha observado, que los niveles elevados de hemoglobina fetal (HbF) y los haplotipos Senegal y Arabia/India

se asocian con el cuadro clínico menos grave (16). Los altos niveles de HbF a su vez se relacionan con el polimorfismo en la región promotora del gen Gg (-158 (C®T)) que regula la expresión de HbF (17). También, Nagel et al demostraron que la presencia de por lo menos un cromosoma con haplotipo Senegal, a diferencia de otros haplotipos africanos, se asocia con altos niveles de HbF y mejoras en el curso de anemia falciforme.

Sin embargo, hay otros estudios que sugieren que los niveles de hemoglobina fetal son importantes, pero no los únicos parámetros que afectan la gravedad de la enfermedad.

Además, se encontraron altos niveles de HbF en pacientes con haplotipos CAR en el Líbano y no parecen mejorar la severidad de síntomas, lo que sugiere que otros factores genéticos y no los niveles de HbF son principales factores determinantes de la gravedad de la enfermedad (14).

Niveles del estrés oxidativo asociados a la hemólisis

Se conoce perfectamente que los glóbulos rojos de los pacientes anémicos tienen una membrana mucho más frágil y son mucho más vulnerables a producir hemólisis. La hemólisis representa un aumento en la destrucción prematura de los eritrocitos.

Si antes se pensaba que la hemólisis se debe a que las células contienen la HbS polimerizada y adherida a la membrana que la hace ser más rígida, ahora cada vez más surgen los estudios que demuestran que estos eritrocitos se encuentran en condiciones del estrés oxidativo aumentado y sistemas antioxidantes disminuidas, que conlleva a la producción de daños de varias moléculas, incluyendo a las de la membrana celular.

Uno de los factores implicados en la heterogeneidad de las complicaciones de esta enfermedad es el nivel de la hemólisis. Altos niveles de hemólisis se asocian con una de las mayores complicaciones que es la hipertensión pulmonar. Se puede estimar la hemólisis a través del índice de reticulocitos. La otra forma de medir la hemólisis es a través de lactato deshidrogenasa (LDH), arginasa I y ratio arginina/ornitina, en el plasma. Las evidencias recientes demuestran que los pacientes con las complicaciones agudas, tales como hipertensión pulmonar y sistémica (18), priapismo (19), ulceraciones cutáneas (20) y riesgo de muerte repentina en los niños, se caracterizan por altos niveles de hemólisis, una vasculopatía proliferativa y disfunción en el sistema vasomotor (18).

A cambio, los pacientes con las manifestaciones clínicas clásicas de

la enfermedad, que incluyen crisis de dolor y síndrome torácico agudo, están más asociados con la patogénesis que involucra vaso obstrucción, infartos e inflamación (21, 22).

La patogénesis de la hemólisis incluye la producción de los radicales libres de oxígeno (ROS), disminución en la efectividad del sistema antioxidante, peroxidación de los lípidos y proteínas de las membranas eritrocitarias y posterior salida del contenido hacia el espacio extracelular. El nivel de la hemólisis a su vez provoca pérdidas de NO, necesario para la producción de cGMP, activación de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), VEGF (vascular endotelial growth factor), que a su vez potencia la vasoconstricción y la producción de la hipertensión arterial (23, 24).

Por ende, la hipótesis de estudiar la expresión del estrés oxidativo como un biomarcador del estado y avance de anemia falciforme y su posible relación con los haplotipos, tiene una significancia clínica (23, 24, 25). Además, ROS pueden desactivar directamente a la proteína NOS endotelial (50), responsable de producir NO, un importante vasodilatador.

En los estudios con eritrocitos procedentes de donantes voluntarios y de enfermos se ha encontrado que, en los segundos, la generación de ROS es aproximadamente 2 veces mayor para

el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el hidroxilo (OH) y la peroxidación lipídica. Igualmente se encontró una disminución en la producción o liberación de óxido nítrico (NO) durante las crisis vasooclusiva (26, 27).

Consecuencias del estrés oxidativo en anemia falciforme

1. HEMOLISIS

La membrana es uno de los organelos que más se afecta en condiciones de sobreproducción de ROS, se produce la lipoperoxidación, la membrana se hace más rígida e inestable a cualquier toque mecánico. La participación directa de los componentes oxidantes en este proceso es demostrada administrando metosulfato de fenazina, a medida que se aumenta la dosis de administración, se eleva el daño membranar (aumenta la rigidez y disminuye la elasticidad de las células rojas).

2. ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS ROJAS

En los estudios de cultivos de células endoteliales de venas del cordón umbilical humano de los pacientes con SCD, se ha observado una aumentada concentración de ácido tiobarbiturico, activación de NF- κ B y elevada expresión de las moléculas de adhesión celular. La adhesión se disminuye luego

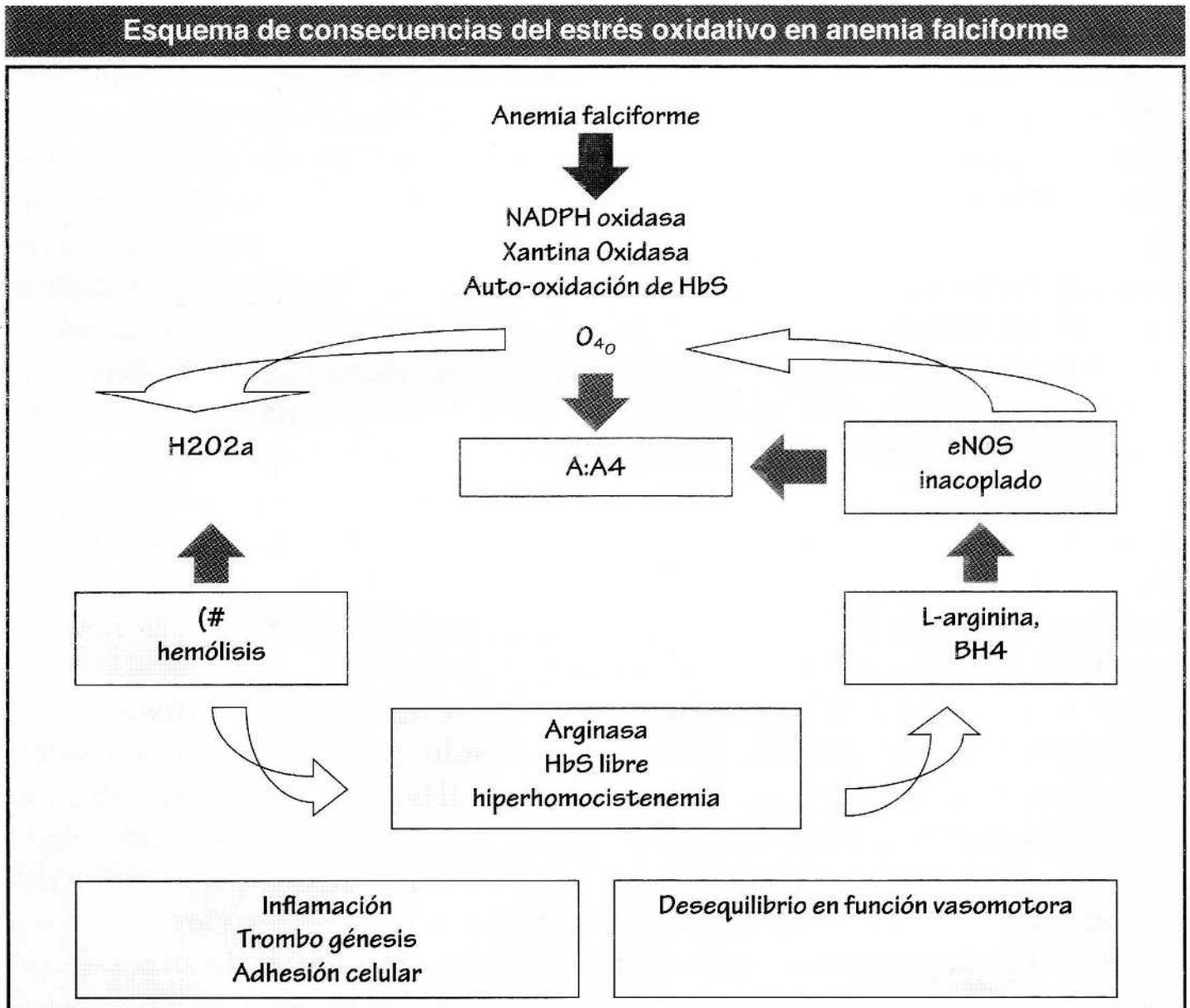
de tratar las células con SOD, catalasa y antioxidante probucol (28).

3. ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS PLAQUETARIAS Y LOS LEUCOCITOS

La adhesión plaquetaria en micro-circulación de los ratones SCD es de 4 a 5 veces mayor que en los ratones

normales, y que probablemente, se relaciona con el aumento en la expresión de P-selectina, en condiciones del estrés oxidativo, que a su vez motiva el reclutamiento de las plaquetas y los leucocitos (29).

Además, se ha demostrado que en los ratones con deficiencia genética de NADPH oxidasa (gp92phox) y sobre-



expresión de SOD citosólica (SOD1), la adhesión de los leucocitos disminuye (30).

Estrategias de tratamiento

HIDROXIUREA

Hidroxiurea es una droga citotóxica y citostática que FDA ha aprobado como tratamiento preventivo de anemia falciforme. Varios estudios indican que su uso reduce la frecuencia de las crisis vasooclusivos, complicaciones pulmonares, disminuye la necesidad de las transfusiones y reduce la mortalidad en los pacientes anémicos (31,32). Otra ventaja es su bajo coste que permite utilizarla de una manera bastante generalizada. Pero no todos los pacientes responden al tratamiento con hidroxiurea, además su uso prolongado puede incrementar el riesgo de defectos hereditarios y leucemia (33).

El mecanismo de acción de hidroxiurea no está muy claro, por un lado se ha demostrado que ésta induce la síntesis de la HbF, que tiene un efecto beneficioso en el proceso de oxigenación de los tejidos. Pero por otro lado, también se sugiere que hidroxiurea es un agente que reduce la actividad de mieloperoxidasa (34), libera NO (35), estabiliza la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (36).

Capacidad de hidroxiurea de au-

mentar la liberación de NO, confirman estudios donde se demuestra que es capaz de reaccionar con oxihemoglobina, deoxyhemoglobina y meta-hemoglobina para liberar NO in vitro e in vivo (37, 38, 39). Pero muchos pacientes no responden al tratamiento con este medicamento.

TRANSFUSIONES CRÓNICAS

Las transfusiones de sangre mejoran notablemente el estado de un paciente crítico, siendo una terapia alternativa que evita daños mayores a los órganos vitales. Sin embargo, siempre queda algún porcentaje de células falciformes en el organismo, y el proceso patológico continúe, por ejemplo, los niveles elevados de Hb plasmática y de recuento de reticulocitos disminuye, pero no se normaliza completamente (40, 41).

Además, el acceso a las transfusiones de sangre está limitado y mucho menos en los países africanos. Las transfusiones frecuentes conllevan a que se desarrolle riesgo de alloinmunización eritrocitaria, sobrecarga de hierro e infecciones.

TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Es un tipo de tratamiento curativo pero es difícil conseguir donante que sea HLA compatible y que no tenga

rasgo falciforme, el trasplante es más efectivo en los niños que en los adultos, es difícil predecir el curso que va a tomar el paciente luego de la operación, y las complicaciones aun son bastante frecuentes.

Si se evalúan esos tres tratamientos tradicionales, se puede decir que son menos que satisfactorios, que se requieren nuevas opciones que disminuyen ratio riesgo/beneficio.

En Francia, actualmente se exploran primeros ensayos para la terapia génica, que sí podría ser un tratamiento definitivo, pero aun no está claro si el gen correctivo puede tener una expresión efectiva y a largo plazo, si es un procedimiento seguro y cuál es el perfil de su coste.

TERAPIAS ALTERNATIVAS

El uso de algunas de estas estrategias terapéuticas, tales como donantes de NO y los nitritos, en pacientes con SCD pueden tener limitaciones importantes. Por ejemplo, las terapias que aumentan la biodisponibilidad de NO (suplemento de L-arginina, la inhibición de la arginasa, NO donantes) en un entorno de aumento de estrés oxidativo puede empeorar los resultados de combinando el estrés oxidativo con lesión nitrosativa a través de especies nitrosativas muy reactivas (ONOO-) (42, 43).

Del mismo modo, las estrategias

que restablezcan funcionamiento de eNOS a través de la disponibilidad del cofactor sólo alimentan oxidación si xantina oxidasa, NADPH oxidasa o autooxidación de HBS son principales contribuyentes al medio oxidativo.

Así que una estrategia combinada que tome en cuenta desacoplamiento eNOS, la inhibición de la arginasa, la compactación de la hemoglobina libre o su inactivación, eliminación de ROS y donadores de NO, puede ser requerida.

Conclusiones

En este artículo hemos dado una concepción general de un nuevo enfoque en el estudio de anemia falciforme, enfermedad que afecta una gran parte de la población latino americana. La comprensión de que esta enfermedad causada por un error genético puntual, tiene un carácter multifactorial, explica el hecho que los pacientes tienen una amplia variedad clínica, además permitirá encontrar nuevos tratamientos.

Se requieren nuevas terapias basadas en biología de radicales libres, dirigir las estrategias terapéuticas que involucran áreas no tradicionales en anemia falciforme, tales como estudio de función mitocondrial, inflamación, disfunción endotelial, fisiología de nitritos y toda el área de enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, el

énfasis tradicional del fenómeno de la formación de eritrocitos falciformes y oclusión de vasos sanguíneos en la SCD debe ser equilibrado con una apreciación de que esta hemoglobinopatía se manifiesta en gran medida como una vasculopatía (44).

Actualmente nuestro grupo está realizando estudio de haplotipos del cluster beta por primera vez en un

grupo de pacientes pediátricos panameños.

Agradecimientos

Parte de este estudio es financiado por el grant de SENACYT FID024-07. Agradezco a la dra. Gladys Cossio del Hospital del Niño de Panamá, iniciadora de los estudios clínicos en el área de biomedicina en Panamá.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cao, A., Galanillo, R., and Rosarelli, M.C. (1998) *Prenatal diagnosis and screening of the haemoglobinopathies*. In *Sickle Cell Disease and Thalassemia* (Rodgers, C.P., Ed.), Vol. 11, No. 1 pp. 215-238, London.
2. Datos publicados por la Fundación March of Dimes (EEUU) especializada en la lucha contra los defectos de nacimiento en 2006.
3. Lukens, J.N. (1993). *Hematology clinic*. Cap. 38. Hemoglobinopathies, S, C, D, E and o associated diseases.
4. Solomon F. Ofori-Acquah, Michel R. A. Lalloz and D. Mark Layton: *Localisation of cisRegulatory Elements at the β -Globin Locus: Analysis of Hybrid Haplotype Chromosomes*. Department of Haematological Medicine, The Guy's King's College and St Thomas' Schools of Medicine, Dentistry and Biomedical Sciences, London, United Kingdom. 2002.
5. *Declaración de la Organización Panamericana de la Salud*. Brasil, 2004.
6. Rodgers GP, Schetcher AN. *Molecular Pathology of the Hemoglobin Structure*. En: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Fume B, Cohen H. *Haematology: Basic Principles and Practice*. New York: Churchill-Livingstone; 1991:441-470.
7. Kan YW, Dozy AM. *Evolution of the Hemoglobin S and C Genes in World Populations*. *Science* 1980; 209:388-391.
8. Peñuela O.A.: *Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador*. *Colomb Med*; 2005, 36, 215-225.
9. Rodríguez Romero W, Saénz Renauld G: *Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica*, *Public Health*, 1998, 3:1.
10. Zago MA, Silva WA Jr, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, Tavella MH, Araujo AG, Krieger JE, Elion J, Krishnamoorthy R. *Atypical beta(s) Haplotypes are Generated by Diverse Genetic Mechanisms*. PMID: 2000, Feb; 63(2):79-84.
11. Walter E. Rodríguez Romero, Germán F. Sáenz Renauld y Mario A. Chaves Villalobos. *Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica*. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 3(1), 1998.
12. Peñalosa-Espinosa R.I., et al., *Frecuencia de la hemoglobina S en cinco poblaciones mexicanas y su importancia en la salud pública*. *Salud Pública de Mexico* 2008; 50:4.
13. Sarnaik SA, Ballas SK. *Molecular Characteristics of Pediatric Patients with Sickle Cell Anemia and Stroke*. *Am J Hematol* 2001 Jul; 67(3):179-82.
14. Inati A, Taher A, Bou Alawi W, S. Koussa, H. Kaspar, H. Shbaklo, P.A. Zalloua. *β -Globin Gene Cluster Haplotypes and HbF Levels are not the Only Modulators of Sickle Cell Disease in Lebanon*. *Eur J Haematol* 2003; 70: 79-83.
15. Chang YC, K.D. Smith, R.D. Moore, G.R. Serjeant, and G.J. Dover. *An Analysis of Fetal Hemoglobin Variation in Sickle Cell Disease: The Relative Contributions of the X-Linked Factor, Globin Haplotypes, Globin Gene Number, Gender, and Age*. *Blood*, Vol 85, No 4 (February 15). 1995: pp 1111-1117.
16. Ruiz Cruz E.D., et al., *Anemia de células falciformes y niveles de hemoglobina fetal*, *Med IMSS* 2003; 41 (4): 299-303.
17. Powars D, Chan L, Schroeder WA. *The variable expression of sickle cell disease is genetically determined*. *Sem Hematol* 1990; 27:360-370.
18. Morris, C. R.; Kato, G. J.; Poljakovic, M.; Wang, X.; Blackwelder, W. C.; Sachdev, V.; Hazen, S. L.; Vichinsky, E. P.; Morris Jr., S. M.; Gladwin, M. T. *Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease*. *JAMA* 294:81-90; 2005.

- Nolan, V. G.; Wyszynski, D. F.; Farrer, L. A.; Steinberg, M. H. *Hemolysis-associated Priapism in Sickle Cell Disease*. *Blood* 106:3264–3267; 2005.
- Nolan, V. G.; Adewoye, A.; Baldwin, C.; Wang, L.; Ma, Q.; Wyszynski, D. F.; Farrell, J.J.; Sebastiani, P.; Farrer, L. A.; Steinberg, M. H. *Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway*. *Br. J. Haematol.* 133:570–578; 2006.
- Platt, O.S.; Brambilla, D.J.; Rosse, W.F.; Milner, P.F.; Castro, O.; Steinberg, M.H.; Klug, P.P. *Mortality in Sickle Cell Disease. Life Expectancy and Risk Factors for Early Death*. *N. Engl. J. Med.* 330:1639–1644; 1994.
- Kaul, D. K.; Hebbel, R. P. *Hypoxia/Reoxygenation Causes Inflammatory Response in Transgenic Sickle Mice but not in Normal Mice*. *J. Clin. Invest.* 106:411–420; 2000.
- Gregory J. Katoa, et al., *Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes*, *Blood Rev.* 2007 January; 21(1): 37–47.
- Mutay Aslan, *Redox-Dependent Impairment of Vascular Function in Sickle Cell Disease*, *Free Radic Biol Med.* 2007 December 1; 43(11): 1469–1483.
- Katherine C Wood and D Neil Granger, *Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites*, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* Volume 34 Issue 9 Page 926-932, September 2007.
- Blann AD, Marwah S, Serjeant G, Bareford, Wright J. *Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity*. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14 (3): 255-259.
- Aslan M, Ryan TM, Townes TM, Coward L, Kirk MC, Barnes S y col. *Nitric oxidedependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization*. *J Biol Chem* 2003; 278: 125-130.
- Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. *Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes*, *Blood* 1998; 92: 3924–35.
- Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. *Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 286: H1608–14.
- Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. *Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice*. *FASEB J.* 2005; 19: 989–91.
- Charache, S.; Terrin, M.L.; Moore, R.D.; Dover, G.J.; Barton, F.B. Eckert, S.V.; McMahon, R.P.; Bonds, D.R. *Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia*. *N. Engl. J. Med.* 332:1317–1322; 1995.
- Lima, C.S.; Arruda, V.R.; Costa, F.F.; Saad, S.T. *Minimal doses of hydroxyurea for sickle cell disease*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30:933–940; 1997.
- National Toxicology Program—Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction U.S.D. o. H. a. H.S. *White Paper on Hydroxyurea Risk:Benefit* Oct 2007. In: *NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of hydroxyurea*, 2007.
- Saleh, A. W.; Hillen, H. F.; Duits, A. J. *Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy*. *Acta Haematol.* 102:31–37; 1999.
- Conran, N.; Oresco-Santos, C.; Acosta, H.C.; Fattori, A.; Saad, S.T.; Costa, F.F. *Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients*. *Br. J. Haematol.* 124:547–554; 2004.
- Cokic, V. P.; Beleslin-Cokic, B. B.; Noguchi, C. T.; Schechter, A. N. *Hydroxyurea increases eNOS protein levels through inhibition of proteasome activity*. *Nitric Oxide* 16:371–378; 2007.
- Pacelli, R.; Taira, J.; Cook, J.A.; Wink, D.A.; Krishna, M.C. *Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide*. *Lancet* 347:900; 1996.
- Kim-Shapiro, D. B.; King, S. B.; Shields, H.; Kolibash, C. P.; Gravatt, W. L.; Ballas, S. K. *The reaction of deoxy-sickle cell hemoglobin with hydroxyurea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1428:381–387; 1999.
- Nahavandi, M.; Wyche, M. Q.; Perlin, E.; Tavakoli, F.; Castro, O. *Nitric oxide metabolites in sickle cell anemia patients after oral administration of hydroxyurea, hemoglobinopathy*. *Hematology* 5:335–339; 2000.
- Tancabelic, J.; Sheth, S.; Paik, M.; Piomelli, S. *Serum transferrin receptor as a marker of erythropoiesis suppression in patients on chronic transfusion*. *Am. J. Hematol.* 60:121–125; 1999.
- Lezcano, N.E.; Odo, N.; Kutlar, A.; Brambilla, D.; Adams, R. J. *Regular transfusion lowers plasma free hemoglobin in children with sickle-cell disease at risk for stroke*. *Stroke* 37:1424–1426; 2006.
- Schacter, L.; Warth, J. A.; Gordon, E. M.; Prasad, A.; Klein, B. L. *Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia*. *FASEB J.* 2:237–243; 1988.
- Wood, K. C.; Hebbel, R. P.; Lefer, D. J.; Granger, D. N. *Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction*. *Free Radic. Biol. Med.* 40:1443–1453; 2006.
- Katherine C. Wood, Lewis L. Hsu, Mark T. Gladwin. *Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance*, *Free Radical Biology & Medicine* 44 (2008) 1506–1528.