

Anemia a cellule falciformi e sindromi correlate: aggiornamenti e prospettive

Renata Paleari^{1,2}, Giovanni Ivaldi³, Sandro Eridani¹, Andrea Mosca^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Milano

²Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Milano

³Laboratorio di Genetica, Settore Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova

ABSTRACT

Sickle cell anemia and related syndromes: updates and perspectives. The presence of hemoglobin S (HbS) in blood is responsible for sickle cell disease when its concentration, for the presence of two copies of HbS gene or one copy of HbS plus another β -globin variant (such as hemoglobin C or β -thalassemia), is markedly increased. In this report, we reviewed some recent epidemiological data on the disease prevalence, we discussed pre-analytical as well analytical aspects, relevant to the correct measurement of HbS in blood, and we summarized some important aspects for the management of the sickling crises and for the current and future therapy of this disease.

INTRODUZIONE

L'emoglobina S [HbS, $\beta(A3)6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$] è la più diffusa variante emoglobinica nel mondo e la prima ad essere stata descritta. Dal punto di vista molecolare è caratterizzata da una mutazione puntiforme GAG \rightarrow GTG del codon 6 del gene β -globinico che comporta la sostituzione in posizione 6 sulla catena β di un residuo di acido glutammico con uno di valina. Questa variazione strutturale modifica la carica superficiale dell'emoglobina provocando, in situazioni di deossigenazione, un'interazione idrofobica tra diversi tetrameri emoglobinici che portano alla formazione di polimeri che si ordinano in strutture parallele di fasci di fibre (gelificazione). La polimerizzazione dell'emoglobina si associa ad importanti alterazioni della membrana degli eritrociti che diventano meno deformabili e più fragili. Queste alterazioni di membrana, inizialmente reversibili, culminano nella formazione dei classici eritrociti a forma di falce che danno il nome alla patologia associata alla presenza della HbS, l'anemia falciforme (1, 2).

I primi studi sulla malattia si focalizzarono sull'osservazione al microscopio ottico della morfologia eritrocitaria. La prima descrizione di cellule falciformi venne fatta nel 1910 da Herrick che osservò "peculiar, elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia" e intuì che essi dovevano essere responsabili delle manifestazioni della malattia (1). Negli anni successivi venne dimostrato che il fenomeno della falcizzazione si realizza solo in condizioni di deossigenazione e si comprese l'esistenza di due distinti stati clinici associati alla malattia. In Italia, Silvestroni e Bianco nel 1944 descrissero il primo caso al mondo di associazione con la β -talassemia, che chiamarono microdrepanocitoasi, in una ragazza del Lazio (3). Nel 1947, Neel dimostrò l'ereditarietà della malattia e ne definì le modalità di trasmissione (4). Infine nel 1949, Pauling et al. evidenziarono la presenza negli eritrociti a falce di una emoglobina anomala che possedeva una diversa mobilità elettroforetica rispetto all'emoglobina

adulta e per la prima volta venne usata la definizione di malattia molecolare (5). Questa scoperta valse a Pauling il premio Nobel che fu assegnato anche a Ingram, che meno di un decennio dopo definì la sostituzione amminoacidica responsabile della formazione della HbS (6).

Studi molecolari del gene β mediante l'analisi con enzimi di restrizione (RFLP), unitamente a studi epidemiologici, hanno fatto supporre che la mutazione si sia originata in modo indipendente in almeno 5 distinte aree geografiche, di cui quattro in Africa ed una in India. Sono infatti stati descritti 5 aplotipi del gene β^S , chiamati Bantu (o CAR, Repubblica Africana Centrale), Benin, Cameroon, Senegal e Arabo-Indiano (7). I singoli aplotipi RFLP sono associati a diversi gradi di severità del fenotipo clinico e si distinguono tra loro per alcuni parametri, quali la percentuale di HbF, il livello di espressione del gene β^S , l'associazione con la variante $A_{\gamma T}$ e la percentuale di cellule dense. Gli aplotipi Senegal e Arabo-Indiano sono associati a un quadro clinico più lieve in quanto caratterizzati dalla presenza di livelli di HbF e di cellule F più elevati rispetto agli altri aplotipi (8, 9). Dalle regioni da dove si è originata, la mutazione si è poi diffusa negli altri continenti seguendo le vie degli scambi commerciali, delle correnti migratorie delle popolazioni africane e soprattutto le vie del commercio degli schiavi. In breve, nel bacino del Mediterraneo ed in Arabia occidentale si è diffuso l'aplotipo Benin, in Arabia sud-orientale quello arabo-indiano ed in America gli aplotipi Bantu e Benin (7). Dati recenti della WHO indicano che il 5,2% della popolazione mondiale è portatore di emoglobinopatie clinicamente rilevanti e di questi il 40% è rappresentato dai portatori della mutazione β^S (10). Le regioni con più elevata presenza di HbS sono quelle dell'Africa equatoriale, dove si registrano frequenze comprese tra 10 e 30%. In Italia, la regione più colpita è la Sicilia, dove la HbS è presente con una frequenza del 2-5% nella parte orientale dell'isola, con un picco del 12% nella città di Butera, mentre è quasi assente nella parte occidentale (11, 12).

Studi molecolari hanno dimostrato che l'aplotipo associato al gene β^S presente in Sicilia è l'aplotipo Benin, confermando la provenienza africana del gene β^S siciliano. La stessa origine africana è stata dimostrata anche per il gene β^S presente in Calabria. Il fatto che la costa sudorientale della Sicilia e la Calabria siano state sede di insediamenti di popolazioni greche durante il periodo della Magna Grecia può far ritenere una provenienza di questo aplotipo anche dalla Grecia e spiegare l'elevata prevalenza del gene β^S in queste regioni (13, 14).

L'inusuale alta frequenza del gene β^S in regioni attualmente o in passato endemiche per la malaria è stata spiegata con la "malaria hypothesis" secondo la quale la presenza di HbS allo stato eterozigote svolge un ruolo protettivo nei confronti dell'infezione malarica (15). Contrariamente a quanto ritenuto in passato, è stato dimostrato che non c'è una minore capacità del parassita di crescere e riprodursi negli eritrociti portatori del gene β^S . Il vantaggio selettivo sembrerebbe risiedere nel fatto che gli eritrociti mutati e parassitati esprimono precocemente ed in maggior numero marcatori di rimozione (emicromi legati alla membrana, aggregati di banda 3, IgG autologhe, frammenti C3 del complemento) a cui corrisponde una maggiore fagocitosi da parte dei macrofagi e il loro allontanamento dal circolo prima che il parassita abbia completato il proprio ciclo vitale. Ciò comporta un'attenuazione del decorso della malattia consentendo al portatore di HbS di sopravvivere meglio rispetto al soggetto non portatore (16).

Le manifestazioni cliniche legate alla presenza della HbS sono associate a diversi genotipi: i) l'omozigosi per la HbS (S/S) che provoca la classica anemia falciforme; ii) la doppia eterozigosi con la β -talassemia (S/ β tal), la forma che più frequentemente si riscontra in Italia; iii) le doppie eterozigosi con alcune varianti emoglobiniche (ad es., S/C, S/D Los Angeles, S/O-Arab). Le manifestazioni cliniche della malattia sono diverse ed includono manifestazioni sia acute che croniche. L'alterazione più tipica è l'occlusione vascolare causata dall'incapacità degli eritrociti a falce di attraversare il microcircolo, con conseguente danno ischemico degli organi colpiti. La presenza di emazie falciformi è una costante nel sangue periferico dei soggetti S/S o con doppia eterozigosi, ma sono anche stati descritti casi di portatori eterozigoti di HbS nei quali alcune emazie restano sempre falcizzate [sono note col termine di "irreversible sickle cells" (ISC)], in numero caratteristico per ogni individuo e non correlato alle manifestazioni cliniche (17). La malattia è caratterizzata da crisi dolorose acute, anemia emolitica e maggior predisposizione alle infezioni (18). I soggetti eterozigoti (A/S) sono asintomatici e possono occasionalmente sviluppare una sintomatologia solo in circostanze di ipossia, come ad es. in alta quota.

METODOLOGIE ANALITICHE

Esami qualitativi

Ci sono due semplici esami che permettono il

riconoscimento della HbS in un campione di sangue e che dovrebbero essere disponibili in tutti i laboratori per confermarne la presenza quando compare un picco anomalo nell'analisi HPLC o nel tracciato elettroforetico: la prova di falcizzazione e la prova di solubilità. Entrambi sono basati sul principio che mentre la HbS ossigenata è totalmente solubile, quando questa passa allo stato deossigenato polimerizza formando piccoli cristalli (tattoidi) che deformano le emazie oppure causa una relativa torbidità in soluzione acquosa (19). *In vitro* la deossigenazione viene ottenuta col trattamento con metabisolfito di sodio (ditionito di sodio), che reagisce molto rapidamente esaurendo velocemente tutto l'ossigeno in soluzione, permettendo quindi il totale distacco dell'ossigeno dall'emoglobina ossigenata in tempi molto rapidi.

La prova di falcizzazione ("sickling test") prevede che un piccolo volume (50-100 μ L) di sangue fresco venga mescolato in una provetta con un volume doppio di una soluzione di sodio ditionito (20 mg in 1 mL di acqua) e che 10-20 μ L di tale miscela vengano depositi su un vetrino porta-oggetto evitando che tale miscela raggiunga i bordi del vetrino copri-oggetto, chiuso ai quattro lati con paraffina fonde. È opportuno eseguire ogni operazione con rapidità al fine di ridurre al massimo il tempo di esposizione della miscela all'aria. Dopo un'incubazione in stufa a 37 °C per circa un'ora, osservando il preparato al microscopio ottico si possono riconoscere le emazie falcizzate, indice di positività, mentre le emazie normali mantengono la loro caratteristica forma discoidale (tendono a diventare echinociti se il campione di sangue non è fresco) (Figura 1).

La prova di solubilità si esegue invece in provetta, diluendo un lisato eritrocitario in un tampone fosfato con saponina, al quale viene successivamente aggiunto sodio metabisolfito. Se è presente HbS si forma subito

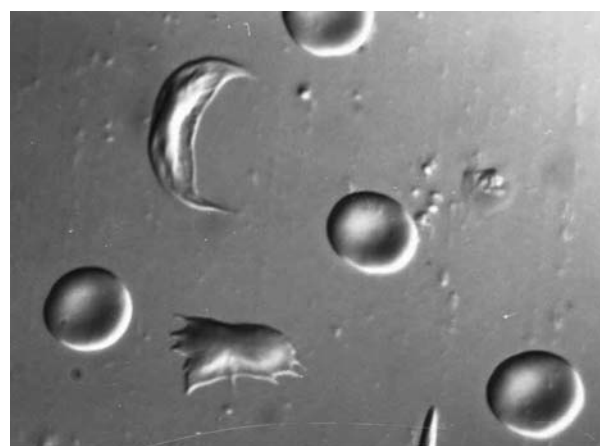


Figura 1

Prova di falcizzazione su un campione di portatore eterozigote di emoglobina S e di β -talassemia. La fotografia fissa una situazione iniziale della reazione con metabisolfito per cui si vedono un'emazia a falce spontanea, una prodotta dalla reazione con metabisolfito ed emazie ancora normali, nelle quali la deossigenazione non è ancora avvenuta completamente. Microscopio ottico in contrasto di fase con obiettivo ad immersione 100 x.

torbidità, che può essere visualizzata mettendo la provetta davanti a un foglio quadrettato o con scritte a piccoli caratteri. Nei campioni positivi la quadrettatura del foglio o i caratteri delle lettere non risulteranno ben visibili al contrario di quanto accadrà per i campioni negativi.

Entrambi gli esami vanno eseguiti avendo cura di analizzare oltre al campione del paziente, un campione di controllo noto (generalmente si utilizza un campione di soggetto non portatore di HbS per motivi di praticità raccolto in qualsiasi tipo di anticoagulante, ma sarebbe meglio disporre anche di un controllo positivo). In tutti i casi, la soluzione di sodio metabisolfito va preparata al momento dell'uso e sempre tenuta in un contenitore ben chiuso. Se il soggetto in esame è molto anemico con ematocrito molto basso (<15%), la quantità di lisato da cimentare nella prova di solubilità va aumentata, perchè altrimenti si possono avere falsi negativi. Per contro, falsi positivi si possono ottenere con la prova di solubilità in presenza di campioni lipemici o con componenti monoclonali oppure con campioni di soggetti splenectomizzati con un elevato numero di corpi di Heinz in circolo (20). Altre rare positività sono state ottenute in presenza di alcune rare varianti emoglobiniche (Hb Alexandra, HbC Georgetown, HbC Harlem, HbI, Hb Memphis) o dell'emoglobina di Bart (tetramero γ_4) (21, 22). Sono note infine almeno 30 rare varianti delle catene β globiniche con la sostituzione di due amminoacidi. Dodici di queste varianti presentano il fenomeno del "sickling" riconducibile alla comune presenza della sostituzione Glu>Val al codone 6 (Tabella 1).

Può capitare che a volte i due esami non diano lo stesso risultato, perchè la prova di falcizzazione viene eseguita su emazie integre, mentre quella di solubilità viene effettuata su un lisato eritrocitario. Ad es. ci è capitato di studiare un soggetto doppio portatore di HbS e di β -talassemia, in cui la prova di falcizzazione era

negativa mentre quella di solubilità era positiva.

Va infine ricordato che entrambe le prove non sono indicate come metodi di screening della HbS in epoca neonatale, perchè le alte concentrazioni di emoglobina fetale presenti alla nascita rendono più difficile la formazione dei polimeri di HbS deossigenata (23). L'esperienza personale di uno degli autori (GI) suggerisce tuttavia di prolungare l'incubazione a 37 °C per 24 ore, aumentando così la sensibilità diagnostica della prova di falcizzazione.

Tecniche più moderne e raffinate sono basate sugli approcci alternativi della spettrometria di massa (MS) e dell'analisi genetica. La MS, sia in modalità di ionizzazione electrospray (ESI) che di desorbimento su matrice assistito da laser (MALDI), seguita da frammentazione in tandem massa (MS/MS) è una tecnica molto efficace per l'identificazione di quasi tutte le oltre 1000 varianti emoglobiniche finora conosciute e può essere impiegata largamente in diversi programmi di screening neonatale (24). Per l'analisi molecolare, a parte ovviamente lo studio della sequenza del DNA amplificato, sono disponibili alcuni kit commerciali basati su ibridazione con oligonucleotidi allele specifici ("reverse dot blot"). Con questi sistemi è possibile il riconoscimento sicuro del portatore, del soggetto omozigote e di altre diverse combinazioni di diversi tipi di difetti emoglobinici.

Esami quantitativi

Diverse tecniche elettroforetiche e cromatografiche possono essere impiegate per separare le varianti emoglobiniche. Nessuna è specificamente disegnata per riconoscere la HbS, ma tutte possono essere utilizzate per stimarne la relativa concentrazione nel sangue, che è molto utile per l'inquadramento diagnostico. Le tecniche elettroforetiche si differenziano per i supporti

Tabella 1

Elenco delle varianti emoglobiniche che presentano il fenomeno del "sickling", caratterizzate dalla presenza di una sostituzione al codone 6 Glu>Val e da una seconda sostituzione nella stessa catena β (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar>)

Variante emoglobinica	Seconda sostituzione amminoacidica	Mobilità elettroforetica a pH alcalino	Eluizione in HPLC	Percentuale variante
HbS-Cameroon	90 (F6) Glu>Lys	Tra HbS e HbC	Dopo HbC	38%
HbS-Oman	121 (GH4) Glu>Lys	Simile a HbC	Tra HbA e HbA ₂	14-20%
HbC-Ndjamena	37 (C3) Trp>Gly	Simile a HbC	Dopo HbS	-
HbS-South End	132 (H10) Lys>Asn	Simile a HbA	Simile a HbA	-
HbS-Antilles	23 (B5) Val>Ile	Più lenta di HbS	Simile a HbS	40%
HbC-Ziguinchor	58 (E2) Pro>Arg	Simile a HbC	Simile a HbC	-
HbC-Harlem o Hb Georgetown	73 (E17) Asp>Asn	Simile a HbC	Tra HbA ₂ e HbS	-
HbS-Providence	82 (EF6) Lys>Asn	Come HbA	-	-
HbS-Travis	142 (H20) Ala>Val	Tra HbS e HbF	Simile a HbA	14%
Hb Jamaica Plain	68 (E12) Leu>Phe	Simile a HbS	Si separa da HbA	-
Hb S. Martin	85 (F1) Phe>Leu	-	-	-
HbS-Clichy	8 (A5) Lys>Thr	Tra HbA e HbF	-	-

utilizzati (gel d'amido, acetato di cellulosa, agar citrato) e per il pH, basico per i primi due (pH 8,6-8,5) e acido (pH 6,2) per il terzo. L'utilizzo combinato delle ultime due tecniche serve a differenziare bene HbS, che in elettroforesi a pH alcalino migra in zona catodica tra HbA e HbA₂, in posizione simile a quella di alcune altre emoglobine (Tabella 2), mentre in elettroforesi a pH acido si separa bene dalla HbD (19). Esistono diverse ditte che producono kit per l'elettroforesi delle emoglobine e alcuni di essi sono implementati su sistemi automatizzati. L'isoelettrofocalizzazione è un'altra tecnica elettroforetica utilizzata per separare le varianti emoglobiniche, ma per le sua scarsa automazione è poco diffusa (25), mentre una tecnica che sta diffondendosi maggiormente è l'elettroforesi capillare (26, 27).

Le tecniche cromatografiche sono essenzialmente quelle in HPLC, che generalmente utilizzano resine a scambio cationico (28, 29), più raramente resine a scambio anionico (30). In tutti i sistemi HPLC l'identificazione della HbS si ottiene in base al tempo di ritenzione, con procedure cromatografiche di varia lunghezza, ma altamente standardizzate. Come già precedentemente notato (31), la qualità delle separazioni dipende dalla strumentazione impiegata, dalla perizia dell'operatore, dalle condizioni ambientali e può variare con i lotti di colonne e/o reagenti. Quello che è importante ricordare è che anche se lo strumento referta in maniera automatica la concentrazione di HbS, qualora nel campione si trovi una frazione emoglobinica che migra similmente ad essa (Tabella 1), anche se ci possono essere leggere differenze a seconda del tipo di strumento usato e delle condizioni sperimentali ottimizzate per la separazione, è opportuno che il laboratorio per confermarne la presenza effettua una delle due prove qualitative precedentemente menzionate. Se ciò non fosse possibile, come può accadere esaminando il sangue di un neonato, allora la conferma dovrebbe essere ottenuta con l'analisi

molecolare del DNA.

Facendo un paragone tra le varie tecniche, emerge che le tecniche elettroforetiche in acetato di cellulosa/agar citrato hanno minor sensibilità (90-95%) rispetto all'isoelettrofocalizzazione e alla HPLC, a parità di specificità (99,9%). Inoltre, le tecniche HPLC, rispetto alle tradizionali tecniche elettroforetiche, presentano alcuni indubbi vantaggi: ad es., consentono di effettuare l'identificazione presuntiva della HbS sulla base della posizione assunta nel tracciato di separazione in maniera più sicura, a causa dell'elevato grado di riproducibilità dei tempi di ritenzione, e permettono la quantificazione della variante in maniera altrettanto riproducibile. Le tecniche in elettroforesi capillare recentemente sviluppate e implementate su strumentazione dedicata sembrano possedere prestazioni analitiche simili a quelle della HPLC. Dal punto di vista dei costi, l'analisi HPLC è la più vantaggiosa rispetto all'elettroforesi e all'isoelettrofocalizzazione (32).

Infine, una questione recentemente dibattuta riguarda la possibile sovrastima della HbA₂ in presenza di HbS, fenomeno che secondo alcuni sarebbe dovuto alla coeluizione della frazione glicata della HbS insieme alla HbA₂ (33, 34) o della frazione carbamidata della HbS (35), secondo altri al fatto che le catene β^S hanno un'affinità minore per le catene α rispetto alle catene δ (36). A questo proposito, sembra che alcuni metodi HPLC offrano una migliore risoluzione rispetto ad altre tecniche e che l'elettroforesi capillare in particolare sia meno influenzata da questa interferenza (27, 37).

Intervalli di riferimento

La proporzione di HbS nel portatore di anemia falciforme varia in funzione dell'età, stabilizzandosi sui livelli dell'adulto dopo i 2 anni. La Tabella 3 mostra i dati raccolti mediante analisi HPLC in soggetti eterozigoti per HbS e nei quali erano assenti difetti α-talassemici.

Tabella 2

Principali varianti emoglobiniche che mostrano una mobilità elettroforetica simile a quella dell'emoglobina S in elettroforesi a pH alcalino (modificata da rif. 20)

Variante emoglobinica	Codone e sostituzione amminoacidica	Percentuale nel portatore	Popolazione di riferimento
Hasharon	α47 Asp→His	15-20	Ebrei Ashkenazi (Delta padano)
G Philadelphia	α68 Asn→Lys	20-25	Neri, mediterranei
Stanleyville II	α78 Asn→Lys	20-25	Africani
G San José	β7 Glu→Gly	30-40	Italiani, messicani, nord-americani
D Ouled Rabah	β19 Asn→Lys	42-48	Nord Africani
G Galveston	β43 Glu→Ala	30-40	Afro-Americani
Osu-Christiansborg	β52 Asp→Asn	36-48	Africani
Zurigo	β63 His→Arg	20-35	Europei
P-Galveston	β117 His→Arg	45-50	Afro-Americani
D Los Angeles o D Punjab	β121 Glu→Gln	30-40	Afro-Americani, caucasici, indiani, mediterranei
Lepore	δβ fusione	<20	Mediterranei

Tabella 3

Variabilità (intervalli min-max) delle percentuali emoglobiniche nei portatori di HbS in funzione dell'età.

Le percentuali della HbA₂ sono state normalizzate, moltiplicandole per un coefficiente correttivo pari a 0,7 dopo aver escluso la presenza concomitante di altri difetti dei geni globinici mediante analisi molecolare

Età	n	HbA %	HbA ₂ %	HbF %	HbS %
Alla nascita	11	8-22	0-1,0	58-84	6-15
2-6 mesi	14	24-60	0,5-2,1	4-61	12-32
9-12 mesi	12	55-62	2,1-2,6	1-9	28-36
13-24 mesi	23	56-63	2,2-2,8	0,5-5,0	29-36
>24 mesi	78	56-65	2,4-3,2	0,1-1,2	30-44

Evidenziare, identificare e quantificare una variante emoglobinica

La caratterizzazione di una variante emoglobinica viene tipicamente realizzata mediante un approccio a differenti livelli di indagine che comprende la rilevazione della presenza della variante e la sua eventuale quantificazione, ottenuta mediante l'utilizzo di tecniche separative quali elettroforesi o HPLC (primo livello di indagine), e l'identificazione definitiva della stessa che richiede l'analisi del DNA o della proteina attualmente realizzata, impiegando le tecniche MS (secondo livello di indagine) (38). Resta il fatto che non sempre è possibile evidenziare facilmente la presenza di una variante emoglobinica in quanto esiste un numero non trascurabile di varianti, chiamare silenti o mute, che non vengono rilevate in elettroforesi e/o HPLC. Questa situazione si può verificare in seguito ad una sostituzione amminoacidica, che non varia la carica complessiva dell'emoglobina, o in seguito ad elevata instabilità della variante, che precipita nei precursori eritroidi.

VARIABILI PREANALITICHE

Fattori legati all'individuo

Ogni esame che si pone come obiettivo la valutazione dell'assetto emoglobinico in soggetti che possono essere normali, portatori eterozigoti di un difetto o portatori di più difetti dell'emoglobina (omozigoti o composti) deve poter contare su alcune informazioni anamnestiche essenziali. L'età del paziente, eventuali trasfusioni nei tre mesi precedenti l'esame, la presenza accertata di anemia, nonché l'eventuale familiarità per emoglobinopatie, sono tutti elementi e fattori che, se portati a conoscenza del laboratorio, contribuiscono ad interpretare il risultato dell'esame del quadro emoglobinico nel modo più corretto e, soprattutto in presenza di una variante come HbS, a gestire nel modo adeguato gli esami di conferma non molecolari. Le suddette notizie sono essenziali anche per interpretare i valori sovrastimati della HbA₂, che rappresentano una caratteristica costante nei soggetti portatori di HbS. Come precedentemente notato, con i sistemi

cromatografici maggiormente in uso, una quota di HbS modificata post-traduzionalmente eluisce a un tempo parzialmente sovrapponibile a quello della HbA₂; il fatto che la separazione di tali componenti sia solo parzialmente coincidente contribuisce a sovrastimare ancor più questo unico picco cromatografico strumentalmente identificato come HbA₂. L'esclusione della presenza di una β -talassemia dipenderà anche dalle citate informazioni, che in talune circostanze potranno assumere un significato rilevante, oltre certamente a considerare la percentuale di HbS e valutare attentamente i parametri emocromocitometrici e lo stato marziale. Riteniamo importante che il laboratorio, accertando valori di HbA₂ sovrastimati in presenza di varianti emoglobiniche come HbS, segnali con chiarezza che il dato riportato nel referto deve sì considerarsi anormale, ma che con ogni probabilità non è riferibile alla presenza di una β -talassemia, invitando il clinico a confermare tale ipotesi con ulteriori elementi anamnestici eventualmente in suo possesso.

Raccolta e conservazione dei campioni

L'EDTA è l'anticoagulante più utilizzato nella raccolta del campione di sangue intero per la misura della HbS, ma anche eparina o ossalato possono andare bene (39). Si può usare sia sangue venoso che capillare, ma anche di cordone ombelicale. I campioni di sangue neonatale, prelevati dalla puntura dal tallone dei neonati, sono raccolti sui dischetti di carta da filtro ("Gutrie cards") per le analisi metaboliche neonatali, seccati all'aria per almeno 3-4 ore e quindi conservati fino al momento dell'uso in bustine sigillate contenenti gel di silice per controllare l'umidità. I campioni sono eluiti "overnight" a +4 °C in tampone fosfato contenente un detergente (generalmente Tween 80, 500 mg/L) e quindi analizzati mediante HPLC (non possono infatti essere analizzati con la prova di falcizzazione o di solubilità). Il sangue essiccato sui dischetti è stabile fino a 20 giorni a temperatura ambiente anche nelle zone tropicali e per almeno un periodo analogo a 4 °C (40).

Non ci sono dati sulla stabilità del sangue congelato per l'esecuzione degli esami biochimici. Ovviamente, la prova di falcizzazione non può essere eseguita su sangue intero congelato, mentre la prova di solubilità può essere eseguita anche su campione congelato, purché si abbia l'accortezza di separare il plasma e di lavare gli eritrociti con soluzione fisiologica prima del congelamento.

UTILIZZO CLINICO

L'HbS è la variante emoglobinica più diffusa e, in particolare in Africa, in America e in Europa, è presente in popolazioni che portano in percentuale elevata numerose altre variazioni dei geni globinici. Pertanto, non è raro riscontrare casi di difetti delle catene globiniche associati ad HbS. Composti con varianti o difetti talassemici possono produrre fenotipi clinici rilevanti con anemie importanti e crisi dolorose ["sickle cell disease" (SCD)] che richiedono trattamenti differenziati. In diversi casi la

presenza di composti globinici con HbS può essere totalmente asintomatica e presentare un fenotipo clinico sovrapponibile al portatore eterozigote ["sickle cell trait" (SCT)]. La condizione SCD è principalmente riferita allo stato omozigote S/S e alla HbS-β-talassemia, a quelle situazioni altrimenti definite talassodrepanocitosi o microdrepanocitosi. L'espressione clinica di questi casi è molto variabile e dipende dal tipo di β-talassemia associata ("sickle cell-β^o" o "sickle cell-β⁺"), ma anche dall'aplotipo del gene S presente (40). Altre situazioni riconducibili o assimilabili alla SCD sono prodotte dai composti della HbS con HbD Punjab (D Los Angeles) e con HbO Arab, mentre con HbC si hanno fenotipi definiti "mild" (41).

La diagnosi presuntiva di questi quadri emoglobinici si fonda sulla valutazione cromatografica, ma la diagnosi definitiva richiede esami molecolari utili alla caratterizzazione dei difetti. Mentre HbD e HbO Arab rappresentano difetti globinici più raramente riscontrati in associazione ad HbS nella popolazione italiana, il laboratorio sarà più frequentemente chiamato ad esprimersi per una diagnosi differenziale tra lo stato di omozigosi S/S e la HbS-β-talassemia, soprattutto per orientare il clinico verso trattamenti terapeutici più specifici. Per questi ultimi difetti, la diagnosi molecolare richiederà esami molecolari di base mediante l'utilizzo di sonde oligonucleotidiche specifiche fissate su membrane di nylon poste a ibridare con DNA amplificato ("reverse dot blot"); in tal modo in una singola ibridazione possono essere analizzate simultaneamente diverse mutazioni (HbS e β-talassemie). Dovendo confermare e caratterizzare varianti più rare, oggi è più rapido e meno oneroso avvalersi direttamente dell'analisi della sequenza nucleotidica dei geni che ipoteticamente si ritengono coinvolti. Per i composti rari che interessano i geni β globinici la letteratura non fornisce informazioni sufficienti per definire e inquadrare con certezza il

fenotipo ematologico e quello clinico associato. Sono invece sufficientemente conosciuti i composti con varianti α-globiniche e HbS e HbS con α-talassemie per poter dire che in questi casi molto difficilmente si ha anemia o vi è la necessità di trattamenti trasfusionali, fatta eccezione per casi sporadici di emoglobinosi H con HbS (42).

Infine, va menzionato che la misurazione quantitativa della concentrazione di HbS è utile per orientare la diagnosi relativamente alla possibile copresenza di sindromi α- o β-talassemiche, alla luce di quanto mostrato nella Figura 2.

Screening neonatali

Gli screening neonatali per le emoglobinopatie sono giustificati o raccomandati in particolari realtà dove la frequenza di determinati difetti risulta significativamente elevata. E' il caso della HbS nei neonati africani e nella popolazione afro-americana degli Stati Uniti, per i quali lo screening neonatale consente di identificare i neonati portatori e soprattutto gli omozigoti S/S o le forme di HbS-β-talassemia che potrebbero trarre beneficio da un trattamento precoce. I cambiamenti intervenuti recentemente nella nostra popolazione rendono potenzialmente più probabile la nascita di soggetti portatori di difetti dell'emoglobina e in particolare di HbS, prevalentemente per l'assenza di una adeguata informazione preconcezionale.

Le possibilità diagnostiche per HbS alla nascita, su sangue periferico e su sangue del cordone ombelicale in misura analoga, sono del tutto equivalenti a quelle che si hanno per l'individuo adulto, fatto salvo il fatto che alla nascita gli esami di conferma non molecolari (prove di falcizzazione e di solubilità) risentono negativamente, anche se in misura variabile, della presenza di emoglobina F (HbF) elevata.

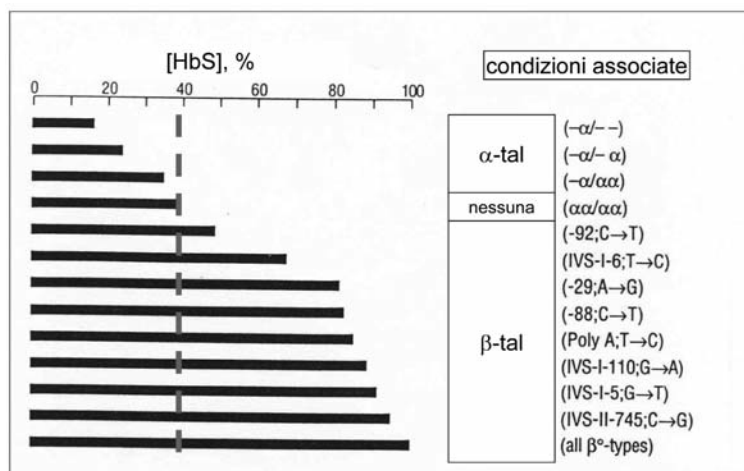


Figura 2
 Concentrazione relativa dell'emoglobina S (HbS) in soggetti eterozigoti per HbS in presenza di altri difetti α- o β-talassemici (modificata da rif. 40). La linea verticale tratteggiata evidenzia la concentrazione tipica della HbS in un portatore di anemia falciforme in assenza di difetti talassemici.

TERAPIA DELL'ANEMIA A CELLULE FALCIFORMI

Le possibilità terapeutiche nell'anemia a cellule falciformi variano a seconda del momento di intervento e della gravità della situazione clinica. Per una completa trattazione rimandiamo ad alcune recenti rassegne sull'argomento (43-45), ricordando che per la definizione fenotipica è stata recentemente prodotta una classificazione, che ha individuato 12 categorie sistemiche per l'inquadramento clinico dei principali sintomi e manifestazioni (46).

Misure preventive

Per quanto riguarda la prevenzione delle complicanze, una regola fondamentale è quella di monitorare regolarmente l'andamento della forma morbosa, attraverso controlli clinici ed ematologici presso centri medici qualificati. Ciò è particolarmente necessario nei soggetti giovani, specie nella prima infanzia, poiché proprio in questi si verificano con maggior frequenza episodi acuti di tipo infettivo o vaso-occlusivo. Fra le misure classicamente adottate figurano una terapia profilattica antibiotica ed un trattamento continuo con acido folico, che, stimolando la produzione di eritrociti, mantiene entro limiti accettabili il livello di emoglobina (47).

Trattamenti farmacologici

Vari tentativi hanno cercato di rendere più difficile l'alterazione strutturale della HbS deossigenata che è alla base delle manifestazioni morbose. Si è tentato di ridurre la concentrazione di HbS nel globulo rosso, che è in rapporto diretto con la facilità di polimerizzazione. A questo scopo, sono stati usati vari farmaci, tra cui il cotrimazolo, un antifungino capace di bloccare un canale calcio-dipendente responsabile dell'efflusso di acqua e potassio, quindi efficace nella impedire la disidratazione cellulare (48). Alcuni incoraggianti risultati con questo composto hanno stimolato la ricerca di altri agenti ad analoga azione.

Un approccio fondamentale nella terapia dell'anemia a cellule falciformi è rappresentato dalla promozione o riattivazione della sintesi della HbF. E' infatti noto come la presenza di HbF accanto alla HbS determini una significativa inibizione della formazione di polimeri di HbS e quindi ostacoli il fenomeno della falcizzazione. Ciò è suffragato dall'osservazione clinica di popolazioni asiatiche, in cui accanto ad uno stato di HbS omozigote vi è una discreta presenza di HbF. In questi soggetti le tipiche manifestazioni cliniche sono notevolmente ridotte e il decorso della malattia appare decisamente mite. Si comprende perciò l'accanimento con cui si sono perseguite negli ultimi due decenni la ricerca e la sperimentazione, anche clinica, di terapie intese a ripristinare la sintesi di HbF, che viene fisiologicamente "spenta" nel periodo perinatale (49).

I primi composti sperimentati in questa direzione furono l'azacitidina e il suo derivato, deoxycitidina o

decitabina, dotato di minore attività citostatica del precursore e quindi preferito. Il suo impiego terapeutico produce un discreto aumento dei livelli di HbF, probabilmente attraverso un'attivazione dei promotori del gene della γ -globina (49). Una classe di composti di notevole interesse è rappresentata dai cosiddetti inibitori della istone-deacetilasi (HDAC), capaci di indurre un'aumentata trascrizione del gene γ -globinico, dei quali il più noto è il butirato di sodio (50). Il composto che tuttavia ha di gran lunga dimostrato una maggiore attività come induttore di HbF è la idrossicarbamide (idrossiurea), per il quale è disponibile una robusta sperimentazione clinica. Trattandosi di un citostatico, si rischia anche in questo caso un'inibizione dell'emopoiesi, che sembra però reversibile. L'effetto terapeutico si produce mediante stimolo dell'espressione del gene γ -globinico (51).

Trattamento della fase acuta (crisi falcemica)

Questo evento presenta molto spesso un quadro drammatico, con dolori, fenomeni vaso-occlusivi gravi, dolori lancinanti e spesso una "sindrome polmonare acuta". Un intervento rapido è indispensabile e deve consistere nella sedazione del dolore e prevedere l'uso di antibiotici, vaso-dilatatori ed emotrasfusioni. Il dolore non risponde abitualmente ai comuni analgesici (come gli antinfiammatori non steroidei) e richiede l'uso di oppiacei, con le loro possibili conseguenze. Fra questi, si preferisce ricorrere alla morfina, il rimedio più efficace, o ai suoi derivati, come la meperidina, peraltro a durata d'azione più breve. E' comunque da ribadire come tutti gli oppiacei possano generare fenomeni di dipendenza (52). Gli antibiotici vengono somministrati a dosi generose quando vi sia alta incidenza di infezioni, come nella cosiddetta "sindrome polmonare acuta". Fra i vasodilatatori un posto importante è stato di recente assegnato all'inalazione di ossido nitrico, capace di attenuare sensibilmente la gravità dei sintomi da vaso-occlusione (53).

Un'indicazione evidente hanno le emotrasfusioni, quando si noti un forte abbassamento dei valori di saturazione di ossigeno. Sono sufficienti nella maggioranza dei casi poche unità di sangue e attualmente si preferisce ricorrere, se possibile, ad una eritrocitoferesi (54). Con questa metodica ci si propone di ridurre la concentrazione delle cellule falciformi senza aumentare l'ematokrito e senza aumentare la viscosità del sangue. Inoltre, uno scambio anche parziale, mantenendo il volume delle cellule rimosse uguale a quello delle cellule con emoglobina A infuse, permette di minimizzare l'accumulo di ferro. Sono attualmente disponibili apparati di eritrocitoferesi automatizzati e sicuri. Quanto ai valori da raggiungere, sono consigliate una riduzione della percentuale di HbS a meno del 30% sul totale dell'emoglobina eritrocitaria, mantenendo il valore di emoglobina totale fra 100 e 125 g/L. Vi è poi unanime consenso nel trattare con ex-sanguinotrasfusione completa i bambini che presentano sintomi di vaso-occlusione cerebrale, anche in questo caso per

ottenere valori analoghi a quelli prima indicati. In soggetti pediatrici con ripetuti episodi di crisi è stato proposto anche un regime di trasfusione cronica, dimostratosi utile nel ridurre la frequenza di questi episodi. Nei casi trattati a lungo con emotrasfusioni vi è però sempre il rischio di causare accumulo di ferro nei tessuti (emosiderosi); a questo si può ovviare con terapie ferro-chelanti, come la desferrioxamina ed i suoi derivati.

Trapianto emopoietico

L'unica vera terapia di carattere radicale dell'anemia a cellule falciformi è per ora rappresentata dal trapianto di cellule staminali emopoietiche, ottenute sia da midollo osseo che da sangue periferico o dal cordone ombelicale. Purtroppo tale intervento è possibile soltanto in una ridotta percentuale di casi, sia per la scarsità di donatori adatti, sia per l'incidenza elevata di effetti dannosi della terapia mielo-ablativa preliminare. Nella donna in particolare si lamenta una ridotta fertilità, anche se recentemente si è ovviato a tale inconveniente mediante preventiva rimozione di tessuto ovarico e successivo reimpianto (55). Allo scopo di ridurre l'incidenza degli effetti collaterali da terapia citostatica sono stati introdotti negli ultimi anni regimi condizionanti meno intensivi ottenendo risultati incoraggianti, anche senza arrivare ad una incompleta rimozione delle cellule malate. Ciò viene attribuito al vantaggio di crescita che eritroblasti sani avrebbero rispetto a quelli falcemici in casi di "chimerismo misto". In effetti si sono constatati buoni risultati anche in presenza di una discreta quota residua di eritroblasti falcemici (56).

Terapia genica

Negli ultimi tempi, dopo alcuni iniziali successi nel campo di determinate malattie da immunodeficienza congenita, si è intensificata la ricerca di metodiche atte a trasferire geni terapeutici in soggetti affetti da malattie con un solo gene difettoso. Nel caso dell'anemia a cellule falciformi il problema consiste nel trovare dei vettori eritroblasto-specifici, dotati di alta efficienza di trasferimento e sostenibili nel tempo (57). Dopo alcuni deludenti risultati con vettori retrovirali, l'attenzione si è spostata sui cosiddetti vettori lenti-virali, una sottoclasse dei retrovirali, che hanno capacità di transdurre non soltanto cellule in attività proliferativa (come i retrovirus), ma anche cellule quiescenti, nelle quali è possibile inserire cassette geniche "composite" (geni terapeutici più sequenze di regolazione). Per quanto riguarda il tipo cellulare nel quale inserire il gene desiderato, vi sono in campo umano severe limitazioni per l'uso di cellule embrionali, che potrebbero rappresentare un elemento ottimale. Si è però recentemente focalizzata l'attenzione sulle cosiddette "cellule staminali pluripotenti indotte", ottenute riprogrammando mediante miscele geniche o cellule somatiche (ad es. della cute), che possono così "sdifferenziarsi", recuperando la potenziale capacità di produrre nuove cellule differenziate e quindi anche precursori eritroidi (58, 59). Rimane la difficoltà di inserire

il gene voluto nel sito cromosomico esatto, ma anche questo "targeting" sembra ora fattibile dall'uso della tecnologia "zinc-finger", mediante la quale si può ottenere l'inserimento mirato del gene terapeutico (60). Si intravede pertanto la possibilità che mediante ingegneria genetica si possa arrivare a correggere radicalmente l'anomalia dell'anemia a cellule falciformi e di altre malattie a simile eziologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Lehmann H, Huntsman RG. Man's haemoglobins. Oxford: North-Holland Publishing Company, 1974.
2. Eaton WA, Hofrichter S. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood* 1987;70:1245-66.
3. Silvestroni E, Bianco I. Una nuova entità nosologica: "la malattia micro-drepanocitica". *Haematologica* 1946;29:455-8.
4. Neel JV. The inheritance of sickle cell anemia. *Science* 1949;110:64-6.
5. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, et al. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949;110:543-8.
6. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anemia haemoglobin. *Nature* 1956;178:792-4.
7. Nagel RL, Ranney HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene. *Semin Hematol* 1990;27:342-59.
8. Powars DR, Chan L, Schroeder WA. Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical implications. *Am J Ped Hematol/Oncol* 1990;12:367-74.
9. Powars D, Hiti A. Sickle cell anemia: beta S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child* 1993;147:1197-202.
10. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin WHO* 2008;86:480-7.
11. Schilirò G, Di Gregorio F, Romeo MA, et al. Incidence of hemoglobin S carrier in Sicily. *Hemoglobin* 1986;10:95-9.
12. Ragusa A, Lombardo M, Sortino G, et al. β^S gene in Sicily is in linkage disequilibrium with the Benin haplotype: implication for gene flow. *Am J Hematol* 1988;27:139-41.
13. Sammarco P, Giambona A, Lo Gioco P, et al. Evidence of the african origin of sickle cell hemoglobin in western Sicily. *Hemoglobin* 1988;12:193-6.
14. Ragusa A, Frontini V, Lombardo M, et al. Presence of an african β -globin gene cluster haplotype in normal chromosomes in Sicily. *Am J Hematol* 1992;40:313-5.
15. Haldane JBS. The rate of mutation of human genes. *Hereditas* 1949;35:267-73.
16. Ayi K, Turrini F, Piga A, et al. 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.
17. Mosca A, Samaja M, Niggeler M, et al. L'emoglobina S quale causa di iperviscosità primaria del sangue. *La Ricerca Clin Lab* 1983;13:115-20.
18. Roseff SD. Sickle cell disease: a review. *Immunohaematology* 2009;25:67-74.
19. Chanarin I. Laboratory haematology. An account of laboratory techniques. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.
20. Bain BJ. Hemoglobinopathy diagnosis, 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2008.
21. Higgins T, Beutler E, Dumas BT. Hemoglobin, iron and bilirubin. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz

- textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006:1176.
22. Old J, Traeger-Synodinos J, Galanello R, et al. Prevention and treatment of thalassaemia and other haemoglobin disorders. Vol 2. Nicosia: Thalassaemia International Federation Publications, 2005.
 23. Sick Cell Disease Guideline Panel. Sick cell disease: screening, diagnosis, management, and counseling in newborns and infants. Clinical Practice Guideline no. 6. Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research, US Public Health Service, 1993 (AHCPR publication no. 93-0562).
 24. Zanella-Cleon I, Joly P, Becchi M, et al. Phenotype determination of hemoglobinopathies by mass spectrometry. *Clin Biochem* 2009;42:1807-17.
 25. Reddy MN, Franciosi RA. Rapid quantitation of hemoglobin S by isoelectric focusing. *Ann Clin Lab Sci* 1994;24:401-6.
 26. Cotton F, Lin C, Fontaine B, et al. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobin A₂ and F. *Clin Chem* 1999;45:237-43.
 27. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, et al. Comparison of Sebia capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol* 2008;130:824-31.
 28. Fucharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij R, et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemsias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clin Chem* 1998;44:740-8.
 29. Riou J, Godart C, Mathis M, et al. Evaluation of the Bio-Rad Variant II HbA₂/HbA_{1c} dual program for measurement of hemoglobin concentrations and detection of variants. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:237-43.
 30. Keevil BG, Maylor PW, Rowlands D. A rapid anion exchange high-performance liquid chromatography method for the measurement of HbA₂ in whole blood. *Ann Clin Biochem* 1996;33:253-6.
 31. Mosca A, Paleari R. La determinazione dell'emoglobina A₂ nel sangue: attualità e prospettive. *Biochim Clin* 2008;32:251-9.
 32. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sick cell hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;9:839-45.
 33. Shu DD, Kraus JS, Bures K. Influence of haemoglobin S adducts on haemoglobin A₂ quantification by HPLC. *Clin Chem* 1996;42:1113-4.
 34. Shokrani M, Terrell F, Turner EA, et al. Chromatographic measurement of haemoglobin A₂ in blood samples that contain sickle haemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:191-4.
 35. Zurbruggen K, Schmutz M, Schmid M, et al. Analysis of minor hemoglobins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;51:989-96.
 36. Anagnostopoulos K, Tentes I, Kalleas C, et al. Effects of HbS in the determination of HbA₂ with the Menarini HA-8160 analyzer and comparison with other instruments. *Int J Lab Hematol* 2009;31:665-72.
 37. Kalleas C, Tentes I, Margaritis D, et al. Effect of HbS in the determination of HbA₂ with the Tosoh HPLC-723G7 analyzer and the Helena Beta.Thal Quick column kit. *Clin Biochem* 2007;40:242-7.
 38. Caruso D, Crestani M, Mitro N, et al. High pressure liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry are advantageously integrated into a two-levels approach to detection and identification of haemoglobin variants. *Clin Lab Haem* 2005;27:111-9.
 39. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995.
 40. Divoky V, Baysal E, Schiliro G, et al. A mild type of Hb S-beta(+)-thalassemia [-92(C-->T)] in a Sicilian family. *Am J Hematol* 1993;42:225-6.
 41. Serjeant GR. Sick cell disease. New York: Oxford University Press, 1985.
 42. Head CE, Conroy M, Jarvis M, et al. Some observations on the measurement of haemoglobin A₂ and S percentages by high performance liquid chromatography in the presence and absence of α thalassaemia. *J Clin Pathol* 2004;57:276-80.
 43. Ataga KI. Novel therapies in sickle cell disease. *Hematology* 2009;54-61.
 44. Inati A, Chabtini L, Mounayar M, et al. Current understanding in the management of sickle cell disease. *Hemoglobin* 2009;33:S107-15.
 45. Hankins J, Aygun B. Pharmacotherapy in sickle cell disease-State of the art and future prospects. *Br J Haematol* 2009;145:296-308.
 46. Ballas SK, Lief S, Benjamin LJ, et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol* 2009;85:6-13.
 47. Bunn FH. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New Engl J Med* 1997;337:762-9.
 48. Brugnara C, Gee B, Armsby CC, et al. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest* 1996;97:1227-34.
 49. Fathallah H, Atweh GF. Induction of fetal haemoglobin in the treatment of sickle cell disease. *Haematology* 2006;58-62.
 50. Migliaccio AR, Rotili D, Nebbioso A, et al. Histone deacetylase inhibitors and hemoglobin F induction in beta-thalassaemia. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2341-7.
 51. Tang DC, Zhu J, Liu W, et al. The hydroxyurea-induced small GTP-binding protein SAR modulates gamma-globin gene expression in human erythroid cells. *Blood* 2005;106:3256-63.
 52. Geller AK, O'Connor MK. The sickle cell crisis: a dilemma in pain relief. *Mayo Clin Proc* 2008;83:320-3.
 53. Weiner DL, Hibberd PL, Betit P, et al. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA* 2003;289:1136-42.
 54. George B, Thurston N, Henderson M, et al. Effects of erythrocytapheresis transfusion on the viscoelasticity of sickle cells. *Clin Hemor Microcirc* 2004;30:83-97.
 55. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004;363:837-40.
 56. Wu CJ, Hochberg EP, Rogers SA, et al. Molecular assessment of erythroid lineage chimerism following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2003;31:924-33.
 57. Sadelain M, Boulad F, Lisowski L, et al. Stem cell engineering for the treatment of severe hemoglobinopathies. *Curr Mol Med* 2008;8:690-7.
 58. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
 59. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009;324:797-81.
 60. Zou J, Maeder ML, Mali P, et al. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;5:97-110.