

## Recentes avanços no tratamento da anemia falciforme

### *Recent advances in the sickle cell anemia treatment*

Reginaldo Ferreira<sup>1</sup>, Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa<sup>1</sup>

#### RESUMO

A anemia falciforme é a doença monogênica de maior ocorrência mundial e é causada pela presença de hemoglobina S (HbS), uma variante estrutural decorrente da substituição de um aminoácido na cadeia  $\beta$  globina. Essa mutação altera as propriedades bioquímicas e fisiológicas da hemoglobina, que tem a tendência de formar agregados fibrilares, no estado desoxigenado, o que produz alterações morfológicas (falcização) e funcionais da hemácia. Assim, todas as manifestações clínicas observadas na doença decorrem da presença da HbS e têm início com a hemólise e a vaso-oclusão, desencadeando os demais eventos da doença, que podem afetar os órgãos e sistemas orgânicos. O tratamento baseia-se no controle dos sintomas. O único medicamento aprovado que altera o curso da doença é o antineoplásico hidroxiureia e, apesar de seu sucesso clínico, não é curativo e pode desencadear muitos efeitos adversos. O único tratamento curativo é o transplante de células tronco hematopoéticas. A terapia gênica vem sendo estudada há mais de 30 anos e alguns estudos clínicos estão sendo realizados. Novas abordagens moleculares como a edição do genoma, uso de RNA terapêutico e manipulação genética para indução da síntese de hemoglobina fetal emergem como possibilidades para a cura da doença.

**Palavras-chave:** Edição do genoma; Hidroxiureia; Terapia gênica, Terapia molecular; RNA terapêutico.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

#### Instituição:

Universidade Federal de Alfenas

#### \* Autor Correspondente:

Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa  
E-mail: cibelegouvea@hotmail.com

Recebido em: 15/12/2016.

Aprovado em: 19/06/2018.

## ABSTRACT

Sickle cell anemia is the most common monogenic disease worldwide and it is caused by the presence of sickle hemoglobin (HbS), structural variant hemoglobin with one amino acid substitution in the  $\beta$  globin chain. This mutation changes the biochemical and physiological properties of hemoglobin, which has the tendency, in the de-oxygenated state, to form fibrous aggregates, which produces morphological (sickling) and functional changes in red blood cells. Thus, all the observed disease clinical manifestations arise from the presence of HbS and begin with hemolysis of the red blood cell and vaso-occlusion, triggering other disease events, which can affect the body organs and systems as a whole. Nowadays, treatment is based mainly in symptoms control. The only drug approved that changes the course of the disease is the antineoplastic Hydroxyurea and, despite its clinical success, it is not curative and can trigger many adverse effects. The only curative treatment is the hematopoietic stem cells transplantation. Gene therapy has been studied for more than 30 years and some clinical studies are being in course. New molecular approaches as the genome editing, therapeutic RNA and genetic manipulation to stimulate fetal hemoglobin synthesis emerge as possible curative options for the disease.

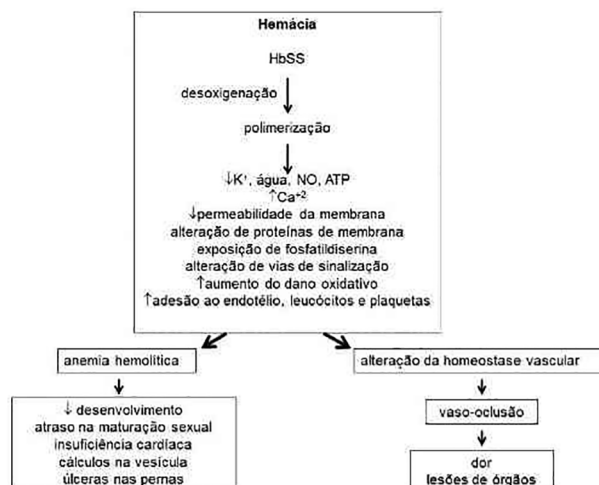
**Keywords:** Genome editing; Hydroxyurea, Gene therapy, Molecular therapy. Therapeutic RNA

## INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é a doença monogênica mais frequente no mundo, caracterizada pela ocorrência de hemácias falcizadas devido à presença da hemoglobina S (HbS), que decorre da mutação pontual, uma substituição A-T ( $GAG \rightarrow GTG$ ) no primeiro éxon do gene  $\beta$  globina, que determina a substituição de glutamato por valina na posição 6 da cadeia proteica, originando a cadeia variante  $b^S$ . Assim, a mutação de um alelo determina o portador ou traço falcêmico (HbAS;  $\alpha_2\beta^A b^S$ ), geralmente, assintomático e a mutação nos dois alelos determina a forma clássica da anemia falciforme (HbSS;  $\alpha_2 b^S$ ).<sup>1</sup> Podem ocorrer ainda, formas heterozigóticas, representadas pelas associações de HbS com outras variantes de hemoglobinas, tais como: HbC, HbD, HbE; as interações com a talassemia e a persistência hereditária da hemoglobina fetal.<sup>2,3</sup>

A cadeia  $b^S$  globina, forma um tetrâmero assimétrico, que se polimeriza em baixa pressão parcial de  $O_2$ , formando longas fibrilas, as quais tornam as hemácias rígidas e modificam sua forma, tornando-as falciformes. A falcização pode ser revertida pelo aumento da pressão parcial de  $O_2$ , contudo, sucessivas falcizações alteram a estrutura da membrana da hemácia, favorecendo a formação da célula, irreversivelmente, falcizada. A HbS pode formar tetrâmeros com a hemoglobina A, normal do adulto (HbA), mas apresenta pouca interação com a hemoglobina fetal (HbF). Todas as

alterações fisiopatológicas observadas na anemia falciforme devem-se a alteração das propriedades bioquímicas da HbS, alterando assim, a morfologia, as propriedades da membrana e vias de sinalização do eritrócito, que levam à anemia hemolítica e vaso-oclusão.<sup>4,5</sup>



**Figura 1.** Aspectos fisiopatológicos e manifestações clínicas na anemia falciforme. Fonte: do autor.

## MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Apesar de causada por distúrbio monogênico, a anemia falciforme apresenta manifestações e severidade clínicas muito variáveis, sendo desde assintomáticas a eventos, potencialmente fatais.<sup>6,7</sup>

Os sintomas, normalmente, surgem após alguns meses de vida e decorrem da hemólise e vaso-oclusão. As manifestações agudas mais comuns na doença são: crise vaso-oclusiva, dor, infarto pulmonar, priapismo, surdez, anemia aguda e os indivíduos com anemia falciforme são mais suscetíveis à infecção bacteriana e acidente vascular cerebral. As manifestações crônicas incluem anemia, dor e alterações do funcionamento de órgãos vitais, as quais são observadas, principalmente, em adultos, além das complicações iatrogênicas. Ao longo da vida, o acúmulo de alterações funcionais em vários órgãos agravam as manifestações da doença e reforçam sua fisiopatologia.<sup>6,7</sup>

Frente à grande variação das manifestações clínicas na anemia falciforme, inúmeros estudos genéticos têm sido realizados, contudo, a variabilidade genética não tem sido suficiente para explicar o espectro fenotípico da doença, como as diferenças na frequência da dor aguda, as complicações crônicas e o índice de mortalidade, uma vez que as mutações gênicas são limitadas. Dois modificadores genéticos da anemia falciforme estão bem caracterizados, sendo os níveis de HbF e a co-hereditariedade da  $\alpha$ -talassemia. Assim, provavelmente os fatores ambientais tenham importante papel na variabilidade fenotípica da doença, contudo, são ainda pouco estudados.<sup>6,7</sup>

Como se trata de anemia hemolítica ocorre aumento da bilirrubina indireta, hiperplasia eritróide na medula óssea e elevação dos reticulócitos. No entanto, além da hemólise, outros fatores podem contribuir para a gênese da anemia ou agravá-la, tais como: carência de folato, insuficiência renal, crises aplásticas e sequestro esplênico agudo. Em geral a anemia é crônica e devida ao aumento da concentração intracelular de 2,3-bisfosfoglicerato, que facilita a liberação de O<sub>2</sub> nos tecidos e o aumento da forma desoxi da HbS, facilitando sua polimerização. A vaso-oclusão causa episódios de dor intensa, referida como excruciante, tanto em crianças como em adultos. Os episódios dolorosos agudos são imprevisíveis e, geralmente, severos levando à hospitalização, além disso, ocorre a dor crônica.<sup>2,8</sup>

## RECENTES AVANÇOS NO TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

O diagnóstico da anemia falciforme baseia-se na análise da hemoglobina por cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese ou focalização isoelétrica. No Brasil a triagem neonatal para hemoglobinopatias foi introduzida em 2001 e tem sido a principal forma de detecção precoce da presença de HbSS.<sup>8,9</sup>

Após décadas de pesquisas sobre a anemia falciforme, muitas informações sobre a mutação e fisiopatologia da doença direcionaram o tratamento clínico, contudo, não há marcadores disponíveis para quantificação da ocorrência dos eventos relacionados à anemia falciforme, como a vaso-oclusão, síndrome torácica aguda e danos em órgãos vitais. A ocorrência e melhora da vaso-oclusão têm se baseado apenas nos relatos de dor. Assim, o tratamento da anemia falciforme é complexo e se baseia no tratamento das manifestações

clínicas.<sup>10</sup> A maioria das medidas terapêuticas na anemia falciforme é de suporte e muda muito pouco a fisiopatologia e o curso da doença. Nas manifestações agudas da doença, são tratados os sintomas. As crises dolorosas são tratadas por hidratação, aquecimento e analgésicos, desde anti-inflamatórios não esteroidais até opioides. A crise torácica aguda e seus sintomas são tratados com inalação de O<sub>2</sub>, espirometria incentivada e transfusão sanguínea. No sequestro esplênico, a anemia severa ameaça a vida, assim, é necessária a transfusão sanguínea. O acidente vascular cerebral e infecções bacterianas seguem o tratamento padrão para qualquer indivíduo, contudo, os riscos de hemorragia devem ser bem avaliados e os glicocorticoides devem ser usados com cuidado. No caso de acidente vascular a transfusão sanguínea pode ser necessária.<sup>11</sup>

Nas manifestações crônicas da doença são também tratados os sintomas, decorrentes da hemólise e vaso-oclusão, contudo, medidas profiláticas devem ser utilizadas para minimizar a morbidade associada a cada condição. As medidas profiláticas incluem hidratação; o uso de penicilina (assim que o recém-nascido receba o diagnóstico de HbSS); vacina conjugada meningocócica e vacina com polissacarídeo pneumocócico, além das demais vacinas recomendadas; transfusão sanguínea crônica e hidroxiureia para prevenção de acidente vascular cerebral. Entretanto, a transfusão sanguínea mensal pode trazer sequelas, sobretudo, no fígado e no coração, devido à sobrecarga de ferro.<sup>11</sup>

O único medicamento aprovado para o tratamento da anemia falciforme é a hidroxiureia (HU; hidroxycarbamida ou Hydrea®). A HU altera a enzima ribonucleotídeo redutase, resultando no atraso da fase S do ciclo celular e por mecanismo ainda não esclarecido aumenta a produção de HbF, mas, a resposta individual a HU é muito variável. Os indivíduos que respondem à HU apresentam melhora das manifestações clínicas da doença, com diminuição de 68 a 84% das crises em geral e a razão para o sucesso do tratamento, reside no aumento da HbF.<sup>4,12</sup> Tendo em vista que a HbF não forma polímero com a HbS, mesmo em alta concentração de HbS, o tratamento com HU reduz a falcização e, portanto, a hemólise, a vaso-oclusão e os demais sintomas decorrentes desses eventos.<sup>4</sup> Assim, diversos trabalhos buscando novos agentes que induzam a HbF ou moduladores alostéricos da HbS, que aumentem sua afinidade pelo O<sub>2</sub> estão em curso, tendo em vista que a HU, pode levar à infertilidade, suscetibilidade à infecção e apresenta efeitos mutagênico, carcinogênico e teratogênico.<sup>3,13</sup>

Alguns compostos fitoterápicos têm sido avaliados quanto ao efeito na anemia falciforme, mas no momento apenas duas preparações tem a aprovação para testes clínicos. Estudo clínico de fase II revelou que o medicamento Niprisan (renomeado para Nicosan), composto por *Piper guineense*, *Pterocapus osun*, *Eugenia caryophyllum* e *Sorghum bicolor*, avaliado por 6 meses foi capaz de reduzir as crises dolorosas, sem causar efeitos adversos graves. O Ciklavit, composto por extrato etanólico da planta *Cajanus cajan*, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais também parece diminuir as crises dolorosas, mas não apresenta resultados suficientes para alguma conclusão sobre sua eficácia na anemia falciforme.<sup>14,15</sup>

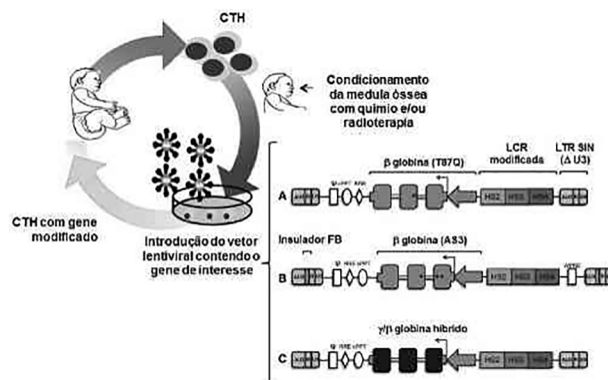
A única opção curativa para a anemia falciforme é o transplante de células tronco hematopoéticas. Contudo, apenas 25% dos casos apresentam doadores compatíveis. Além disso, quando se comparam terapias celulares e não

celulares, nos últimos 20 anos, os resultados são similares em termos de mortalidade pela anemia falciforme e, ainda, podem ocorrer sérias complicações decorrentes da terapia celular, como a rejeição ao transplante e o risco de desenvolvimento de câncer. Outro ponto importante a se considerar são eventos adversos pré-transplante, como a sobrecarga de ferro decorrente de transfusão sanguínea e as altas doses de químico e radioterapia antes do transplante. Assim, a utilização de células mesenquimais para prevenir a rejeição e do sangue de cordão umbilical são estratégias em estudo na anemia falciforme. Alguns aspectos ainda precisam ser mais bem explorados para o sucesso do transplante de células tronco hematopoéticas tais como: a fonte doadora, as doses de infusão celular e o protocolo para maximizar a eficácia da técnica.<sup>1,11,16</sup>

Outro alvo celular para o tratamento da anemia falciforme é a célula natural killer invariante T. Estas células estão aumentadas tanto em número como em ativação na anemia falciforme, contribuindo para a resposta inflamatória e quimiotaxia, induzindo a vaso-oclusão. Assim, testes estão em progresso para avaliar o efeito de bloqueadores e de anticorpos para diminuição dessas células.<sup>11</sup>

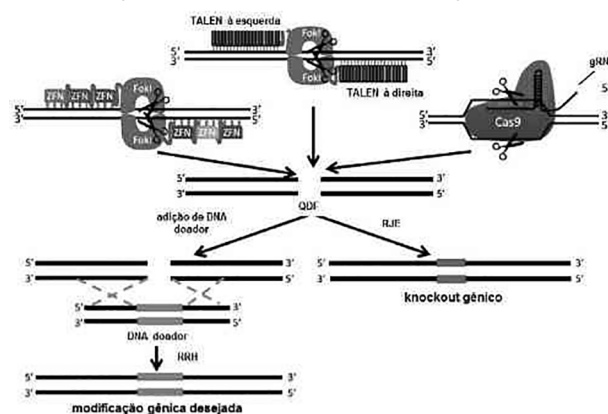
Nos últimos 30 anos foram realizados inúmeros estudos sobre terapia gênica para o tratamento da anemia falciforme. O longo caminho entre o desenvolvimento da terapia gênica e o uso clínico foi pavimentado pelos estudos e descobertas sobre a expressão e regulação dos genes do grupamento  $\beta$  globina e ainda são necessários o desenvolvimento de estratégia eficiente para a transferência e a expressão duradoura do gene introduzido. Ensaios clínicos utilizando lentivírus como vetor do gene  $\beta$  globina humano funcional ou  $\gamma$  globina para sua introdução nas células tronco hematopoéticas, sem a necessidade de terapia celular, estão em curso e têm se mostrado eficientes. O gene  $\beta$  globina utilizado apresenta mutação, que preserva as propriedades de ligação ao  $O_2$  e inibe a polimerização da HbS. Híbridos  $\beta/\gamma$  e apenas  $\gamma$  têm sido estudados, tendo em vista que a HbF previne a polimerização da HbS. Entretanto, a técnica requer quimioterapia ablativa da medula óssea e ainda o desenvolvimento de estratégia mais eficiente para a transferência e expressão duradoura do gene introduzido, além de não estar descartado, o que o risco de transformação maligna (Figura 2).<sup>1,11,17,18</sup>

Nova abordagem molecular que busca a cura da anemia falciforme é a edição gênica. Com esta técnica, a região gênica com mutação é substituída pela sequência original, utilizando-se um conjunto de procedimentos, nos quais a nucleasa atua em uma sequência específica do DNA, para alterá-la, seguido de síntese. As enzimas: nucleases dedo-de-zinco (ZFN), nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs), meganucleases e CRISPR (repetições palindrômicas regularmente interespaçadas agrupadas) associada à nucleasa Cas9 (CRISPR-Cas9) possuem moléculas programáveis ligantes de DNA, que permitem a introdução de quebras da dupla fita de DNA em sítios específicos do genoma. A Cas9 utiliza RNA para guiar o reconhecimento da sequência-alvo. Após a clivagem do DNA, os mecanismos de reparo de quebra de dupla fita, inerentes às células eucarióticas, atuam na correção do erro. São dois os mecanismos de reparo de quebra de dupla fita: a junção de extremidades e a recombinação homóloga, sendo a habilidade para direcionar o tipo de reparo de relevância na terapia da anemia falciforme. Em princípio esta técnica utiliza intervenção *ex vivo*, depende da introdução de nucleases e do DNA molde para



**Figura 2.** Terapia gênica na anemia falciforme. As células-tronco hematopoéticas CD34+ (CTH) são coletadas do doador autólogo, após o que a medula sofre condicionamento químico e/ou radioterápico para recepção das CTH com o gene b globina funcional. O gene é introduzido por meio de vetor lentiviral (SIN DU3) contendo o gene b ou g funcional. Y, sinal de empacotamento; cPPT, polipurina central; HS, sítio hipersensível à DNase I; LCR, região controladora do locus; LTR, repetições terminais longas (U3, R e U5); RRE, elemento responsivo rev; WPRE, elemento regulador pós-transcricional do vírus Woodchuck da hepatite. Adaptado de Cottleet al.1 e Hoban et al.<sup>18</sup>

reparo, evitando a inserção de DNA estrangeiro no genoma, que traz o risco de oncogênese, como os vetores virais. Cabe ressaltar ainda que a correção direta do genoma tem a vantagem de preservar os mecanismos regulatórios endógenos do gene  $\beta$  globina, para que haja a produção estequiométrica de cadeias globina durante a eritropoese (Figura 3).<sup>1,11,17-19</sup>



**Figura 3.** Edição gênica utilizando diferentes sistemas de nucleases (ZFN, TALEN, e CRISPR/Cas9). Cada sistema de nucleases identifica uma região específica do genoma por pareamento de nucleotídeos e cria a quebra da dupla fita do DNA. Na ausência do DNA molde ocorre reparo por junção de extremidades, que resulta em knockout gênico. Na presença de DNA molde ocorre o reparo por recombinação homóloga, resultando na incorporação do segmento de DNA desejado (edição), com a correção gênica. Cas9, nucleasa associada à CRISPR (repetições palindrômicas regularmente interespaçadas agrupadas); gRNA, RNA guia; QDF, quebra de dupla fita; RJE, reparo por junção de extremidades; RRH, reparo por recombinação homóloga; TALEN, nucleasa efetora semelhante a ativador de transcrição; ZFN, nucleasa dedo-de-zinco. Fonte: adaptado de Goodman e Malik.<sup>17</sup>

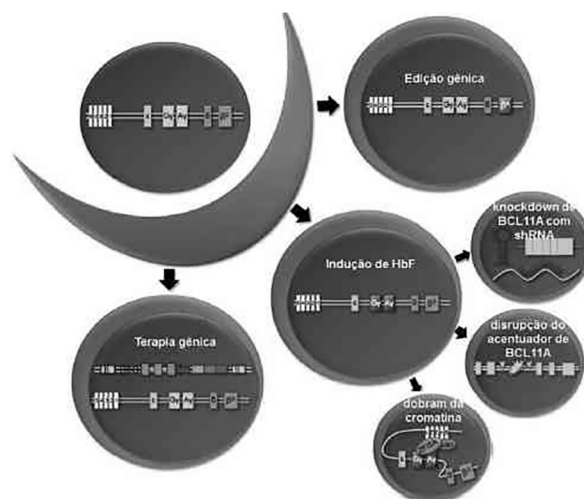
Uma vez estabelecida, a técnica de edição do genoma oferecerá potencial também para a edição de células do cordão umbilical do próprio indivíduo nascido com anemia falciforme, possibilitando a cura logo após o nascimento. Muito trabalho de pesquisa ainda será necessário para utilização desta técnica *in utero*. É importante ressaltar que a edição do gene  $\beta$  globina em células embrionárias humanas pode levar a mutações em alvos diferentes do desejado, podendo ser catastrófica, por isso necessita de cuidadosos testes pré-clínicos.<sup>11</sup>

Além da correção gênica, a reativação da síntese da HbF tem sido estudada. O gene BCL11A codifica uma proteína repressora da expressão do gene  $\gamma$  globina, portanto, fundamental para a síntese da HbF. Esta proteína tem como alvo a região intergênica, LCR e sequências entre os genes HBG1 (gama 1) e HBD (delta), na célula eritroide, mas também é importante para outras células como os linfócitos B e células dendríticas, que participam do sistema imunológico. Assim, o knockout completo do gene BCL11A em células tronco hematopoéticas pode comprometer o sistema imunológico. Entretanto, a identificação de uma região intrônica, específica de células eritroides, potencializadora de BCL11A e a descoberta de variantes comuns com mutação nessa região que leva à síntese de HbF, mesmo no adulto, indicaram que a disrupção dessa região acentuadora poderia diminuir a atividade de BCL11A e aumentar a síntese de HbF. Estudos demonstraram que a clivagem simples nessa região foi suficiente para induzir a síntese de HbF em modelos animais e cultura celular.<sup>1,17-19</sup>

Outra alternativa ao knockout de BCL11A seria a diminuição da expressão gênica utilizando RNA de interferência. Um novo vetor, RNA curto em grampo (shRNA), que utiliza a arquitetura de um miRNA, foi recentemente testado e demonstrou potente inibição da expressão do gene BCL11A em cultura de células precursoras de eritrócitos humanos. Nesse sistema, como ocorre na terapia gênica, o sucesso da estratégia depende da integração do vetor e da expressão sustentável deste.<sup>1,17,18</sup>

A possibilidade de construir fatores sintéticos que se ligam, especificamente, ao DNA indica a possibilidade da regulação de genes específicos. Assim, moléculas que alterem o dobramento da cromatina podem determinar a formação da alça da região LCR (região controladora do locus) adequada para a expressão de  $\gamma$  globina, aumentando a síntese de HbF, como demonstrado em cultura de eritroblastos humanos de adultos. Contudo, esta estratégia dependerá da integração e expressão duradoura do vetor (Figura 4).<sup>1,18</sup>

À medida que o conhecimento sobre a produção de HbF aumenta, novos alvos moleculares poderão ser explorados. Assim, parece que algumas barreiras à terapia gênica foram transpostas, mas ainda há muitas outras e a natureza complexa da expressão e regulação dos genes  $\beta$  globina dificulta o processo. A segurança e eficácia dos protocolos de terapias moleculares só poderão ser estabelecidas a partir da realização de cuidadosos testes clínicos e do acompanhamento dos indivíduos tratados. O rápido desenvolvimento de novas técnicas de engenharia genética oferecem perspectivas para novas abordagens moleculares para o tratamento e cura da anemia falciforme.<sup>1,18</sup>



**Figura 4.** Estratégias moleculares para o tratamento da anemia falciforme: edição gênica; indução da síntese de hemoglobina fetal (HbF), por silenciamento gênico (RNA de interferência e disrupção), dobramento da cromatina e terapia gênica. Fonte adaptado de Hoban et al.<sup>18</sup>

## CONCLUSÃO

A anemia falciforme é a patologia monogênica mais comum e apesar de bem caracterizadas sua origem genética e bioquímica, os múltiplos efeitos fisiopatológicos da doença ainda não são bem esclarecidos. O único medicamento aprovado para o tratamento da anemia falciforme é o anti-neoplásico hidroxiureia e, apesar de seu sucesso terapêutico, não é curativo, além de ser tóxico para o organismo. O único tratamento curativo disponível no momento é o transplante de células tronco hematopoéticas. Entretanto, o limitado número de doadores compatíveis impede sua ampla utilização e mesmo no caso de compatibilidade pode ocorrer rejeição ao transplante.

A intensa pesquisa sobre o mecanismo molecular dos eventos fisiopatológicos da anemia falciforme tem permitido a busca por terapias celulares e moleculares curativas. A terapia gênica, em estudo há mais de 30 anos, parece agora oferecer alguma possibilidade real de tratamento, com vários estudos clínicos em curso. Contudo, além de cara alguns entraves para sua ampla utilização precisam ser resolvidos, especialmente, a garantia da segurança da técnica. A edição gênica, a utilização de RNA terapêutico e outras manipulações genéticas para aumentar a síntese da HbF emergem como promissoras para o tratamento curativo da anemia falciforme.

## AGRADECIMENTO

Ao PET-MEC-SESu pela bolsa à Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa.

## REFERÊNCIAS

1. Cottle RN, Lee CM, Bao G. Treating hemoglobinopathies using gene-correction approaches: promises and challenges. *Hum Genet.* 2016;135(9):993-1010.

2. Neville KA, Panepinto JA. Pharmacotherapy of sickle cell disease in children. *Curr Pharm Des.* 2015;21(39):5660-7.
3. Telen MJ. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood.* 2016 Feb 18;127(7):810-9.
4. Ferrone FA. Sickle cell disease: Its molecular mechanism and the one drug that treats it. *Int J Biol Macromol.* 2016;93(Pt A):1168-1173.
5. Tam MF, Tam TC, Simplaceanu V, Ho NT, Zou M, Ho C. Sickle Cell Hemoglobin with Mutation at  $\alpha$ His-50 Has Improved Solubility. *J Biol Chem.* 2015 Aug 28;290(35):21762-72.
6. Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(7):689-96.
7. Tewari S, Brousse V, Piel FB, Menzel S, Rees DC. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. *Haematologica.* 2015;100(9):1108-16.
8. Chakravorty S, Williams TN. Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. *Arch Dis Child.* 2015;100(1):48-53.
9. Lobo CL, Ballas SK, Domingos AC, Moura PG, do Nascimento EM, Cardoso GP, et al. Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(1):34-9.
10. Telen MJ. Biomarkers and recent advances in the management and therapy of sickle cell disease. *F1000Res.* 2015;4. pii: F1000 Faculty Rev-1050.
11. Abraham A, Jacobsohn DA, Bollard CM. Cellular therapy for sickle cell disease. *Cytotherapy.* 2016;18(11):1360-9.
12. Pule GD, Mowla S, Novitzky N, Wonkam A. Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce  $\gamma$ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. *Clin Transl Med.* 2016;5(1):15.
13. Oder E, Safo MK, Abdulmalik O, Kato G. New developments in anti-sickling agents: can drugs directly prevent the polymerization of sickle haemoglobin in vivo? *Br J Haematol.* 2016;175(1):24-30.
14. Imaga NA. Phytomedicines and nutraceuticals: alternative therapeutics for sickle cell anemia. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:269659.
15. Oniyangi O, Cohall DH. Phytomedicines (medicines derived from plants) for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(4):CD004448.
16. Archer N, Galacteros F, Brugnara C. 2015 Clinical trials update in sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2015;90(10):934-50.
17. Goodman MA, Malik P. The potential of gene therapy approaches for the treatment of hemoglobinopathies: achievements and challenges. *Ther Adv Hematol.* 2016;7(5):302-315.
18. Hoban MD, Orkin SH, Bauer DE. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. *Blood.* 2016;127(7):839-48.
19. Randolph MK, Zhao W. Genome editing and stem cell therapy pave the path for new treatment of sickle-cell disease. *Stem Cell Investig.* 2015;2:22.