

E. Angelucci
A.A. Di Tucci
D. Baronciani
C. Depau
M. Pettinau
F. Zaccheddu
C. Cogoni

Struttura Complessa
Disciplina di Ematologia,
Ospedale Oncologico di
Riferimento Regionale
"Armando Businco"
Cagliari, Italy

Le basi scientifiche del trapianto di cellule staminali emopoietiche



Introduzione

L'uso delle cellule staminali emopoietiche midollari e del sangue periferico nel trattamento delle malattie ematologiche, ha una storia lunga e affascinante iniziata con una serie di importanti osservazioni, anche casuali, a partire dagli anni 20. Acquisizioni che oggi sembrano scontate e facili sono state il frutto di anni di lavoro, insuccessi e successi, di molti ricercatori.

Il successo clinico del trapianto di cellule staminali emopoietiche allogenico è dipeso soprattutto dal lavoro di Robert Good, Donnall Thomas e George Santos e dei loro collaboratori ed ha trovato il suo momento più florido tra la fine degli anni '60 e i primi degli anni '70 e la consacrazione con il premio Nobel conferito a Donnall Thomas nel 1990 insieme a Joseph Murray (il primo ad eseguire un trapianto di rene tra gemelli) *for their discoveries concerning organ and cell transplantation in the treatment of human disease*. In Italia i pionieri del trapianto sono stati Alberto Marmont a Genova, Glauco Torlontano a Pescara e Guido Lucarelli a Pesaro.

Le prime esperienze

Nel 1922 il ricercatore Danese Fabricious-Moeller, notò nei sui

studi su modelli animali, che nelle cavie la schermatura delle zampe durante l'esposizione all'irradiazione corporea totale (TBI) preveniva la piastrinopenia e la diatesi emorragica post irradiazione.

Questa importante osservazione è rimasta isolata per oltre 20 anni quando nel 1949 Jacobson e i colleghi la ripresero in considerazione. Le cavie esposte ad un dosaggio di radiazioni tali da causare una aplasia midollare, ma alle quali veniva schermata la milza (organo emopoietico nel topo), non andavano incontro a morte. Gli stessi ricercatori dimostrarono anche come la prevenzione degli effetti letali della TBI potesse essere effettuata tramite l'infusione intraperitoneale di cellule spleniche. Nello stesso anno, Lorenz ed i collaboratori, dimostrarono che l'infusione di midollo osseo singenico nei topi e nelle cavie li proteggeva da dosi letali di irradiazione.¹

Inizialmente si pensava che la protezione dalle radiazioni potesse essere data da un fattore umorale, solo successivi studi di istochimica dimostrarono che in realtà l'effetto era da attribuire alla colonizzazione del ricevente da parte di cellule staminali emopoietiche allogeniche. Queste prove sperimentali sono la prima evidenza dell'esistenza di una cellula emopoietica multipotente in grado di rigenerare tutte le serie

cellulari midollari ed ematiche e sono la vera base scientifica del trapianto di cellule staminali emopoietiche.

Successivamente Ford coniò il termine “chimera” per indicare un animale il cui sistema ematopoietico era il risultato di una TBI seguita da trapianto di cellule staminali allogeniche² identificando con questo termine un soggetto al cui interno vivessero contemporaneamente cellule di origine genetica diversa. In seguito il trapianto di cellule staminali emopoietiche con risultati chimerici fu effettuato su topi, conigli, maiali, cani, scimmie ed infine umani.

Inizialmente si pensava che il numero di cellule staminali allogeniche richieste per una ricostituzione emopoietica ottimale fosse 10-80 volte quelle richieste per il trapianto singenico.³ In seguito fu dimostrato che questo era vero per i regimi di condizionamento a base di TBI ma non per quelli con altre forme di regimi ablativi immunosoppressivi.⁴ Ciò ha portato alla conclusione che la TBI non fosse, da sola, sufficientemente immunosoppressiva da permettere l’attecchimento.

Graft versus host disease

Barnes & Loutit nel 1957 furono i primi a riportare una differente sopravvivenza in animali sottoposti a trapianto di cellule staminali singeniche o allogeniche.⁵

Cohen, Vos e Van Bekkum notarono nello stesso anno che diarrea severa, calo ponderale e lesioni della cute comparivano come malattia secondaria nei topi sottoposti a trapianto di cellule spleniche allogeniche.

Successivamente divenne chiaro che responsabili di tale fenomeno erano i linfociti, i quali avevano come bersaglio principale il sistema linfatico, il fegato, la cute e l’intestino.⁶

Nella metà degli anni 60 attraverso modelli animali e umani, Billingham arrivò a definire le caratteristiche della cosiddetta malattia del trapianto verso l’ospite:

1) le cellule del donatore devono essere immu-

nologicamente competenti;

2) l’ospite deve contenere importanti antigeni non presenti nel donatore che lo fanno apparire come estraneo;

3) l’ospite è incapace di organizzare una reazione immunologica contro il trapianto.

La fisiopatologia della GvHD divenne più chiara quando Mathè e i colleghi nei primi anni 60 ottennero il primo attecchimento di midollo osseo umano.⁷ Il gruppo di Seattle definì la prima classificazione clinica della GvHD riguardante i vari organi colpiti.^{8,9} Successivamente la GvHD venne finalmente definita come conseguenza del sinergismo tra il danno immunologico dovuto all’incompatibilità antigenica del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) e il danno tessutale causato dall’irradiazione o da infezioni virali.¹⁰

Modello animale dell’effetto del trapianto contro la malattia (graft versus leukemia = GVL)

Negli anni successivi furono fatti diversi studi su topi sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche. Molti di questi animali morivano di GvHD ma qualcuno sopravviveva liberi da emopatia maligna grazie all’effetto immunologico anti-tumore. Il numero degli animali che sopravviveva aumentava se veniva introdotta terapia immunosoppressiva. L’effetto anti-tumore si verificava nelle patologie ematologiche. Nessun effetto si dimostrò invece in modelli murini di fibrosarcoma e adenocarcinoma. Chiaramente in questi primi esperimenti si iniziava a evidenziare, ancora in modo embrionale, il ruolo dell’espressione degli antigeni del trapianto e/o la reattività dei linfociti T e NK.

Fisiopatologia dell’aplasia midollare severa in modelli animale

Molti dei più importanti principi delle malattie genetiche o acquisite midollari, sono stati formulati nella metà degli anni 60. In quegli anni gli studi su modelli murini condotti da

Russel e McCulloch dimostrarono che alla base di tali patologie esiste un difetto della cellula staminale emopoietica o del microambiente midollare.

Krantz e Kao¹¹ suggerirono nel 1967 che molti casi di anemia aplastica potessero avere una base autoimmunitaria. Dimostrarono infatti che l'utilizzo di agenti immunosoppressori permetteva l'aumento dell'eritropoiesi.

Istocompatibilità

Negli anni 30 Gorer studiò la sierologia del sistema antigenico del topo. Questi alloantigeni erano coinvolti nelle reazioni tessutali e identificavano un sistema genetico maggiore di istocompatibilità (chiamato H2). Questa scoperta è stata una pietra angolare in trapiantologia cambiando radicalmente l'approccio sperimentale e clinico con influenze ancora evidentissime.

Dal 1968 furono identificati i loci dell'HLA-A, HLA-B e nel 1971 del locus C infine nel 1980 il separato locus D. Questo sistema di antigeni geneticamente legati, definisce il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC).

Capellini e van Rood nel 1974¹² introdussero il termine di aplotipi per indicare il prodotto MHC in forma aploide. Questa scoperta fu fondamentale per intraprendere il percorso della scelta del donatore fino ad allora impossibile.

I primi studi clinici trapiantologici

Nel 1957 Thomas iniziò a descrivere i primi trapianti di cellule staminali emopoietiche midollari nell'uomo.¹³ I 50 anni di questa prima pubblicazione sono stati recentemente ricordati da una pubblicazione di Fred Appelbaum.¹⁴

Nel 1959 Mathè trattò 6 vittime di un incidente radioattivo nella repubblica di Jugoslavia. Questi pazienti produssero cellule ematiche per circa 1 mese. Lo stesso gruppo nel 1963, riportò il primo caso di attecchimento completo con sopravvivenza di circa 1 anno (paziente affetto da leucemia). Il paziente sviluppò GvHD acuta e cronica e morì libero da

malattia 20 mesi dopo il trapianto a causa di una encefalite da virus Zoster).⁷

Nel 1968 Mathè descrisse i suoi primi 21 trapianti. Quindici pazienti attecchirono e di questi 8 morirono di GvHD severa ma liberi da malattia. Il più lungo sopravvissuto fu appunto quello sopra citato che visse circa 20 mesi.

Il decennio che va dagli anni 50 agli anni 60 fu ricco di successi ma anche di frustrazioni perché i pazienti affetti da leucemia morivano prima di arrivare al trapianto o i pochi che ottenevano l'attecchimento midollare morivano di GvHD, infezioni virali o fungine.¹⁵ Tutti questi studi si erano sviluppati in era pre-HLA. Solo successivamente si capì il ruolo fondamentale che ricopriva la tipizzazione tessutale nel trapianto.

Malattie genetiche

In seguito all'identificazione del ruolo del MHC per la scelta del donatore familiare si ottennero i primi successi clinici. I primi candidati furono logicamente pazienti pediatriche affette da malattie ematologiche genetiche definite immunodeficienze, i quali avevano un minimo rischio di sviluppare GvHD o di rigettare il trapianto.

Nel 1968 due bambini furono sottoposti con successo a trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore familiare identico: il primo affetto da una immunodeficienza legata al cromosoma X,¹⁶ e il secondo affetto dalla sindrome di Wiskott-Aldrich.¹⁷ Da questi due trapianti si sono appresi concetti fondamentali:

- 1) un corretto attecchimento midollare corregge la malattia di base;
- 2) la GVHD non si presenta in modo severo se il donatore familiare è HLA identico e sia il donatore che il ricevente sono giovani.

Nei successivi anni diversi tipi di malattie genetiche hanno trovato nel trapianto una indicazione terapeutica (patologie midollari congenite, malattie metaboliche come la mucopolisaccaridosi).

Anemia aplasia

Per un insieme di ovvie ragioni l'aplasia midollare rappresenta, insieme alle immunodeficienze, la patologia più ovvia da sottoporre a trapianto di cellule staminali emopoietiche. Nel 1972 Thomas e i collaboratori riportarono il primo successo di trapianto allogenico da donatore familiare HLA identico in paziente affetto da anemia aplastica. Il gruppo di Seattle successivamente descrisse altri 37 casi simili.¹⁸

La maggior parte dei pazienti furono sottoposti a regime di condizionamento a base di ciclofosfamide. Il gruppo di Minnesota introdusse in seguito la irradiazione totale linfonodale (Total Lymphoid Irradiation = TLI) più ciclofosfamide in questo tipo di patologia.

Nel 1976 Camitta¹⁹ e i collaboratori riportarono il primo trial randomizzato prospettico internazionale che valutava la migliore efficacia del trapianto di cellule staminali midollari rispetto alla terapia convenzionale. A conclusione dello studio la sopravvivenza fu significativamente maggiore per i pazienti trapiantati. Questo è il primo studio prospettico randomizzato eseguito con metodologie di epidemiologia clinica moderne in campo trapiantologico e in questo senso rappresenta una pietra angolare come gli studi biologici.

Trapianto nelle leucemie

Inizialmente come regime di condizionamento pre-trapianto nelle leucemie acute venne usata la TBI a basse dosi. Successivamente il gruppo della Johns Hopkins University introdusse la ciclofosfamide come singolo agente. Entrambe le metodiche furono poi abbandonate per l'alto numero di recidive.

Il gruppo di Seattle iniziò ad utilizzare l'associazione ciclofosfamide 60 mg/kg per 2 giorni + TBI 1000 cGy in singola dose il terzo giorno.²⁰

Gli anni 70 e 80 furono caratterizzati dai diversi studi per utilizzare la TBI con radiazio-

ni frazionate e non in singola dose in modo da creare un danno tissutale minore.

Nel 1983 il gruppo di Baltimora sviluppò lo schema di condizionamento a base di busulfano e ciclofosfamide per i trapianti nelle leucemie acute²¹ che rimane il più famoso regime di condizionamento utilizzato in alternativa alla TBI nelle leucemie acute (il famoso Bu-Cy poi divenuto Bu-Cy2 con la riduzione della dose di ciclofosfamide da 200 mg/kg a 120 mg/kg). Questo regime venne utilizzato anche in Italia subito dopo.²²

Successivamente, in seguito al lavoro pubblicato da Thomas nel 1983²³ si comprese l'importanza del timing trapiantologico. Ovvero il trapianto di cellule staminali emopoietiche per la prima volta non era più una terapia da "ultima spiaggia" ma un trattamento elettivo con un preciso timing nel percorso terapeutico del paziente. Si dimostrava che il paziente leucemico andava trapiantato nelle prime fasi di malattia, in prima remissione e buone condizioni cliniche. Il trapianto da solo non bastava, non era la panacea delle leucemie, ma era un preciso punto del percorso terapeutico ematologico.

Linfomi non Hodgkin e mieloma multiplo

I successi ottenuti nei trapianti delle leucemie acute spinsero i ricercatori a sperimentare la metodica anche nei linfomi ad alto rischio. Il primo trapianto in questa patologia fu effettuato nel 1975 dal gruppo di Minnesota. Successivamente vedremo spostarsi l'attenzione per questo tipo di patologia verso le terapie intensive con supporto di cellule staminali emopoietiche (trapianto di cellule staminali emopoietiche autologhe).

Talassemia major

Particolare sviluppo in Italia al trapianto per malattie genetiche particolarmente per la Talassemia Major. Dopo il primo iniziale trapianto eseguito a Seattle su un bambino italiano di 2 anni,²⁴ non trasfuso perché figlio di

testimoni di Geova migliaia di trapianti sono stati eseguiti di cui la grande maggioranza in Italia. Pionieri in questo campo sono stati i gruppi di Pesaro²⁵⁻²⁷ e di Pescara.²⁸ L'esperienza italiana ha dimostrato che con il trapianto di cellule staminali emopoietiche è possibile ottenere una correzione permanente della anemia in soggetti talassemici con un follow up che ormai supera i 20 anni.

Sorgenti alternative di cellule staminali emopoietiche allogeniche

Solo il 30% circa dei pazienti candidati al trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche possiede un donatore familiare HLA identico o mismatch per un antigene. Gli studi retrospettivi mostrarono che maggiore era l'incompatibilità antigenica minori erano i risultati ottenuti in termini di attecchimento e sopravvivenza.

Hobbs e i collaboratori nel 1981 furono i primi ad eseguire un trapianto da donatore non familiare HLA identico²⁹ e a praticare un trapianto aploidentico (da padre a figlio).³⁰

Per lungo tempo sorgenti di cellule staminali emopoietiche alternative a quelle midollari sono state conosciute ma non utilizzate. Le cellule staminali emopoietiche del sangue periferiche sono state utilizzate solo da quando sono divenuti disponibili gli studi sulla mobilitazione e la raccolta delle cellule staminali periferiche. Solo negli anni 80 si è potuto dimostrare la validità dell'attecchimento midollare da parte delle staminali periferiche.³¹

Questo tipo di cellule ha dimostrato in seguito di avere dei tempi di attecchimento e ricostituzione midollare inferiori a quelli delle cellule staminali emopoietiche midollari diminuendo i periodi di esposizione alle infezioni ma aumentando il rischio di GvHD cronica.³²

Alla fine degli anni 80 fu proposta come sorgente di cellule staminali emopoietiche il sangue cordonale.³³ Questo sviluppo è stato preceduto da studi sperimentali anche clinici sull'uti-

lizzo di cellule di fegato fetale, anche umano, come fonte di cellule staminali emopoietiche.³⁴ Le potenzialità del cordone ombelicale come sorgente alternativa risultano essere la permanenza e disponibilità nelle banche per lunghi periodi e l'immatùrità dei linfociti introdotti durante il trapianto con le cellule staminali a cui consegue un ridotto rischio di sviluppare GvHD.

Il primo successo con questa metodica fu descritta a Parigi in un paziente affetto da Anemie di Fanconi.³⁵ Successivamente questa metodica si è estesa ad altre patologie.^{36,37}

Un ulteriore vantaggio delle cellule staminali del sangue cordonale dipende dal fatto che riceventi e donatori possono avere delle maggiori incompatibilità antigeniche per le potenzialità minori di sviluppare GvHD. La quantità di trapianti da cellule staminali cordonali oggi giorno è minore rispetto alle altre fonti, ma in aumento. È ovviamente una metodica diffusa maggiormente nella popolazione pediatrica.

Conclusioni

Sin dagli anni 20 la storia dei trapianti di cellule staminali emopoietiche ha seguito un incredibile percorso scientifico e clinico i cui risultati sono sotto gli occhi di tutti con decine di migliaia di trapianti eseguiti ogni anno.

Recentemente si sono verificati nuovi sviluppi che hanno le basi nella storia sopra descritta come la immunoterapia adottiva, la terapia cellulare, i regimi a ridotta intensità. Ulteriori studi riguardano la sorgente di cellule staminali, la compatibilità HLA donatore – ricevente e tecniche per diminuire la mortalità e morbilità trapiantologica. Infine la terapia genica, sia nelle patologie neoplastiche che genetiche, in tutte le sue sfaccettature rappresenta una ulteriore, potenziale, evoluzione delle tecniche di trapianto.

Infine deve essere ricordato che il trapianto

di cellule staminali emopoietiche è una tipologia terapeutica altamente tecnologica, finora riservata ai paesi industrializzati. Negli ultimi anni si è assistito all'inizio della diffusione di centri trapianto anche in altre regioni del mondo. L'estensione della possibilità trapiantologia anche al di fuori dei paesi industrializzati deve essere ovviamente una delle priorità dei ricercatori clinici nei prossimi anni.

Bibliografia

- Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951;12:197-201.
- Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 1956;177:452-4.
- van Bekkum DW, de Vries MJ, van der Waay D. Lesions characteristic of secondary disease in germfree heterologous radiation chimeras. *J Natl Cancer Inst* 1967;38:223-31.
- Santos GW, Haghshenas M. Cloning of syngeneic hematopoietic cells in the spleens of mice and rats pretreated with cytotoxic drugs. *Blood* 1968;32:629-37.
- Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. *Br J Haematol* 1957;3:241-52.
- Santos GW, Cole LJ. Effects of donor and host lymphoid and myeloid tissue injections in lethally x-irradiated mice treated with rat bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 1958;21:279-93.
- Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattan A, Schneider M. Haematopoietic Chimera in Man after Allogenic (Homologous) Bone-Marrow Transplantation. (Control of the Secondary Syndrome. Specific Tolerance Due to the Chimerism). *Br Med J* 1963;2:1633-5.
- Thomas E, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:832-43.
- Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:895-902.
- Fenyk JR, Jr., Smith CM, Warkentin PI, et al. Sclerodermatous graft-versus-host disease limited to an area of measles exanthem. *Lancet* 1978;1:472-3.
- Krantz SB, Kao V. Studies on red cell aplasia. I. Demonstration of a plasma inhibitor to heme synthesis and an antibody to erythroblast nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58:493-500.
- Ceppellini R, van Rood JJ. The HL-A system. I. Genetics and molecular biology. *Semin Hematol* 1974;11:233-51.
- Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1975;292:491-6.
- Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med* 2007;357:1472-5.
- Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 1970;9:571-87.
- Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;2:1366-9.
- Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968;2:1364-6.
- Storb R, Thomas ED, Buckner CD, et al. Allogeneic marrow grafting for treatment of aplastic anemia. *Blood* 1974;43:157-80.
- Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, et al. Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality. *Blood* 1976;48:63-70.
- Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977;49:511-33.
- Santos GW, Tutschka PJ, Broxmeyer R, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983;309:1347-53.
- Angelucci E, Polchi P, Lucarelli G, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies following therapy with high doses of busulphan and cyclophosphamide. *Haematologica* 1989;74:455-61.
- Thomas ED, Hutchinson F. Marrow transplant for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission: a follow-up. *N Engl J Med* 1983;308:1539-40.
- Thomas ED, Buckner CD, Sanders JE, et al. Marrow transplantation for thalassaemia. *Lancet* 1982;2:227-9.
- Lucarelli G, Polchi P, Galimberti M, et al. Marrow transplantation for thalassaemia following busulphan and cyclophosphamide. *Lancet* 1985;1:1355-7.
- Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, et al. Marrow transplantation in patients with advanced thalassaemia. *N Engl J Med* 1987;316:1050-5.
- Schrier SL, Angelucci E. New strategies in the treatment of the thalassaemias. *Annu Rev Med* 2005;56:157-71.
- Di Bartolomeo P, Santarone S, Di Bartolomeo E, et al. Long-term results of survival in patients with thalassaemia major treated with bone marrow transplantation. *Am J Hematol* 2008;83:528-30.
- Hughes-Jones K, Selwyn S, Riches PG. Who pioneered the use of alternative donors (and stem cells from peripheral blood) in bone marrow transplantation? *Arch Dis Child* 1991;66:1102-3.
- Hobbs JR. Bone marrow transplantation for inborn errors. *Lancet* 1981;2:735-9.
- Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE, et al. Allogeneic transplantation of blood-derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1989;4:643-6.
- Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1995;85:1655-8.
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828-32.
- Papayannopoulou T, Nakamoto B, Agostinelli F, Manna M, Lucarelli G, Stamatoyannopoulos G. Fetal to adult hemopoietic cell transplantation in humans: insights into hemoglobin switching. *Blood* 1986;67:99-104.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-8.
- Wagner JE, Broxmeyer HE, Byrd RL, et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood* 1992;79:1874-81.
- Locatelli F, Rocha V, Reed W, et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassaemia and sickle cell disease. *Blood* 2003;101:2137-43.