

# ABORDAGEM CLÍNICA DAS FLEBOTOMIAS TERAPÊUTICAS SITUAÇÃO ACTUAL E PERSPECTIVAS FUTURAS PAPEL DO JAK2 E DA CALRETICULINA

Teresa Gordalina Sousa Guerreiro

## INTRODUÇÃO

A Imuno-hemoterapia é das especialidades médicas que mais evoluiu nos últimos anos e também das que precocemente se destacou, na implementação de uma prática referenciada a *standards*, dado os riscos inerentes ao sangue e ao acto transfusional e a consequente exigência em aumentar a segurança e a qualidade dos componentes sanguíneos.

A “febre” da qualidade que varreu a Europa no início dos anos 90 e que a colocou a exprimir-se numa mesma linguagem em todos os Estados Membros, acabou por atingir a Ibéria no final dessa mesma década. Assim, os resultados surgem, como a certificação e a acreditação de um número significativo de serviços de Imuno-hemoterapia. A prática transfusional referenciada a *standards*, num quadro de melhoria contínua da qualidade, é assim uma realidade Europeia.

Classicamente na maioria dos Serviços de Imuno-hemoterapia existem três grandes protagonistas: o dador, o receptor da transfusão e o doente da consulta. Para este último, o doente das consultas de flebotomias terapêuticas (FT), com patologias de base como a policitemia vera (PV), a poliglobulia secundária, a hemocromatose e a porfíria, ainda não lhe foi atribuído o merecido papel. Esta área médica ainda não foi atingida pela onda de produção de recomendações actualizadas e pela vigilância da respectiva aplicação prática, face aos mais recentes avanços científicos, senão vejamos,

- são patologias crónicas graves, que directa ou indirectamente atingem a maioria dos órgãos e sistemas e têm um prognóstico muito reservado.
- Exceptuando os raros Serviços de Imuno-hemoterapia com especialização na área da patologia da coagulação (como as hemofilias e os v. Willebrandt), das hemoglobiopatias (talassémias e drepanocitoses) e das aféreses terapêuticas, os doentes em programa de FT constituem-se como um número importante da consulta de Imuno-hemoterapia.
- A recente descoberta da mutação JAK2 na maioria dos doentes com PV veio condicionar toda uma abordagem que até aqui se efectuava, quer a nível diagnóstico, quer dos esquemas de FT e sua monitorização, quer ainda o

*timing* de instituição da terapêutica mielossupressora. Paralelamente a este enorme avanço para a PV, a constatação do papel protector da calreticulina nos doentes com hemocromatose hereditária (HH), que condiciona a sua expressão clínica, veio também alterar a abordagem das FT para esta patologia genética tão frequente.

- Dada a periodicidade das consultas de FT, constata-se que na prática estes doentes acabam por ser “geridos” pelo médico Imuno-hemoterapeuta, dado que a consulta de Pneumologia/Gastroenterologia/Medicina Interna passa frequentemente a ser anual. Não estando a substituir os colegas, nem a ultrapassar as nossas competências, é importante ter uma atitude abrangente e que dê resposta às questões que se nos colocam diariamente na prática médica, nomeadamente o pedido de exames complementares de diagnóstico e a sua interpretação integrada, o *timing* de instituição terapêutica coadjuvante e a referenciação oportuna a outras especialidades.

A presente revisão será dedicada à PV e à HH, dado os recentes avanços científicos registados nestas duas doenças, pelo que não serão abordadas outras patologias alvo de FT, como a policitemia secundária, a hemocromatose secundária, a porfíria ou a trombose da veia central da retina.

## ABORDAGEM CLÍNICA DAS FT NA POLICITÊMIA VERA PERSPECTIVAS FUTURAS, O PAPEL DO JAK2

### 1. DEFINIÇÃO

A Policitemia Vera é uma doença mieloproliferativa, crónica e rara, causada por uma mutação adquirida pontual, a qual é responsável pela expansão clonal da célula hematopoiética pluripotencial. A proliferação celular desregulada origina uma hiperplasia das três principais linhagens medulares, com predominância de progenitores eritróides. Esta é a marca da PV, no sentido de ser a *stem cell* a causa da doença cujo resultado se expressa no aumento das 3 séries. Por este mesmo motivo, devemos evitar designações que já ca-

íram em desuso como: poliglobulia e eritrocitose primária, policitemia rubra vera, eritrocitose megaloesplênica, Doença de Vaquez ou ainda Doença de Osler.

A PV pertence ao grande grupo das doenças mieloproliferativas (DM) tal como a Trombocitose Essencial, a Mielofibrose Primária, a Leucemia Mielóide Crónica (LMC), a Leucemia Neutrofílica Crónica, a Leucemia Eosinofílica Crónica, a Mastocitose Sistémica e, o Síndrome Hipereosinofílico Crónico e, por fim, as Doenças Mieloproliferativas não Classificáveis. As três primeiras são BCR/ABL-negativas e frequentemente JAK2-positivas, por isso mesmo surgem frequentemente na literatura referências associando estas três entidades, já que partilham o mesmo perfil clonal maligno, isto é, partilham a mesma mutação.

## 2. REFERÊNCIAS HISTÓRICAS

Podemos abordar a história da PV como se de uma viagem ao passado se tratasse, ou seja, transpondo, temos a era pré-JAK2 e a era pós-JAK2.

O primeiro período foi uma época de trevas, porque não possuíamos uma terapêutica dirigida a um alvo específico, como o Imatinib para a LMC. Sabia-se desde há mais de 100 anos que havia algo adormecido nestes doentes com PV que não era herdado, mas que de súbito disparava e a doença tornava-se incontrolável com as FT. Para além destas, pouco tínhamos para oferecer a estes doentes exceptuando o ácido acetil salicílico, AAS, o alopurinol e, numa fase pré-terminal, a hidroxiureia.

A era post-JAK2 surge, assim, como a luz clarificadora que aponta o caminho, é um tempo de esperança, se pensarmos numa arma terapêutica dirigida especificamente ao produto desta mutação.

Mas, tal como quando se aborda uma época histórica, seria injusto não abordar nomes como um *Vaquez* ou um *Osler*, nomes grandes da História da Medicina que dotados de uma enorme capacidade de trabalho e de uma singular inteligência e perspicácia, fizeram avançar a ciência com poucos recursos de meios complementares de diagnóstico, que à época dispunham.

1892 – *Vaquez*: efectua a primeira descrição da doença: *une forme spéciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistant*.<sup>1</sup>

1903 – *Sir William Osler*: define com clareza esta entidade nosológica apresentando quatro casos clínicos muito bem documentados, como a tríade que se cita: *the condition is*

*characterized by chronic cyanosis, polycythemia and moderate enlargement of the spleen*.<sup>2</sup>

1904 – *Turk*: demonstra laboratorialmente a hiperplasia das 3 séries medulares: eritrocitose, leucocitose e trombocitose.<sup>3</sup>

1951 – *William Damesbeck*: anteviu em décadas a base molecular da PV, ultrapassando e contrariando a maioria dos colegas hemato-oncologistas de então, ao agrupar a PV à trombocitose, à metaplasia mielóide com mielofibrose e a LMC, no grande grupo das doenças mieloproliferativas crónicas<sup>4</sup> e que ainda hoje se mantém. A recente descoberta da mutação JAK2 veio dar-lhe razão.

1967- 1994 – *Louis Wasserman e Nathaniel Berlin* criam o *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG). Este grupo de estudo da PV, apoiado pelo *National Cancer Institute*, publicou os *guidelines* que durante mais de 30 anos foram a referência mundial nesta área. Baseados em ensaios clínicos randomizados, prospectivos e multicêntricos, alguns envolvendo milhares de doentes com PV, tarefa difícil de conseguir numa patologia tão rara como esta. Estas recomendações foram amplamente difundidas e a sua actualização de quatro em quatro anos, era sempre ansiosamente aguardada e raramente contestada, dado o ambiente de consenso que foram granjeando ao longo dos anos. Sucederam-se ao todo 8 *guidelines* de que se destacaram: 01<sup>5</sup>, 05<sup>6</sup> e o 08<sup>7</sup>. No primeiro *guideline* comparou-se a eficácia da opção FT e FT adicionadas à terapêutica mielossupressora, tendo-se concluído que a primeira opção se associava sobretudo a um maior risco de trombose e a segunda a uma maior evolução para leucemia. Em relação ao segundo, ficou provada a eficácia da terapêutica de manutenção com ácido acetil salicílico 300 mg na prevenção das complicações vasculares, como o enfarte agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral e a embolia pulmonar. Finalmente, com o 3º ficou provada a eficácia da hidroxiureia (HU) na redução dos episódios de trombose, quando com a terapêutica de primeira linha, as FT, não se controlava a doença. Em 1994 tem lugar a última reunião do PVSG, tendo sido transferido para o *Mount Sinai School of Medicine*, em Nova Iorque. Posteriormente, foi criado um *Gruppo Italiano Studio Policitemia Vera* (GISP) que desenvolveu um estudo em que se concluiu que a dose de 100mg de ácido acetil-salicílico é eficaz na prevenção de complicações vasculares, sem os inconvenientes da dose mais alta.

1983 – *Bartram et al*<sup>8</sup> localiza no cromossoma Phyladelphia o gene de fusão BCR:ABL cujo resultado é uma tirosina quinase. Abriu assim o caminho ao desenvolvimento de um fármaco, por *Druker et al* em 2001, e que inibe este enzima, o Imatinib.<sup>9</sup>

2004 – Momento Histórico: *William Wainchenker et al*, no *Institute Gustave Roussy*, em Ville-Juif, Paris, dão a conhecer ao mundo uma mutação no cromossoma 9, o JAK2 V617F, na maioria dos doentes com PV.<sup>10</sup>

2005 - Quatro grupos de investigação independentes confirmam estes resultados. No congresso da *American Society of Hematology* de 2005, *Wainchenker* apresentou uma das sessões plenárias e registou-se um número significativo de comunicações orais e *posters* respeitantes a este tema.

2007 – A Organização Mundial de Saúde revê os critérios de diagnóstico da PV de 2001, propostos por um painel de peritos internacionais, membros do *Steering Committee for revisions of the WHO Classifications of Hematopoietic and Lymphoid Neoplasms* e que foram posteriormente adoptados.<sup>11</sup>

2008 – Multiplicam-se as reuniões científicas cujo tema de debate é o JAK2. As esperanças materializam-se com este discreto passo para o homem, mas tremendo para o avanço da Medicina: em Janeiro de 2008 foi criada em laboratório uma molécula inibidora da enzima *Janus-Kinase* e que irá impedir a proliferação hematopoiética. Em Abril do mesmo ano iniciaram-se os estudos de fase III e cujos resultados todos aguardamos. Pelos anos de dedicação ao estudo da PV outros nomes, como *Tefferi*, *Barosi*, *Spivak*, *Landolfi*, *Marchioli*, *Finazi* e *Levine* ficarão para sempre ligados à PV.

### 3. INCIDÊNCIA

Está descrita uma incidência no sexo masculino de 2,8 e para o sexo feminino de 1,3 por 100.000 habitantes. Apesar de a maioria dos doentes não apresentar uma história familiar, verifica-se uma predisposição genética desta doença.<sup>12</sup> Para o desencadear da PV, a mutação genética adquirida terá de ocorrer num organismo com uma predisposição genética subjacente. Observa-se uma maior frequência nos judeus de origem Europeia com um pico na incidência aquando da sexta década de vida, mas pode ocorrer em qualquer momento, existindo casos diagnosticados na infância. É rara nas etnias afro-americanas

### 4. FISIOPATOLOGIA

Num indivíduo com predisposição genética, a actuação de factores exógenos ambientais (como determinadas substâncias químicas tóxicas ambientais) vão ser responsáveis por uma mutação somática adquirida, o JAK2 V617F. Esta mutação é a base molecular da PV e a responsável pela produção de uma proteína anómala, uma enzima, da grande

família das cinases, que em última análise vai originar um clone de células com vantagens no crescimento selectivo, produzindo simultaneamente uma proliferação descontrolada da linhagem eritróide e em menor grau das séries plaquetar e leucocitária.

Os megacariócitos medulares libertam factor de crescimento fibroblástico, originando a proliferação fibroblástica do tecido hematopoiético e a consequente fibrose medular, com hipoproliferação celular das três linhagens.

A activação leucocitária associa-se à activação simultânea das plaquetas e das células endoteliais. Assim os leucócitos poderão ter um papel mais activo do que se pensava na geração de um estado de pré-trombose em doentes com PV.

As manifestações clínicas da PV e de outras DM não estão apenas relacionadas com o aumento do número de células, mas sobretudo com a sua activação. O JAK2 V617F pode activar directamente granulócitos e monócitos tal como as plaquetas através dos megacariócitos. Estes dados ajudam a compreender a fisiopatologia das DM e têm um valor prognóstico.

As proteínas cinases são enzimas que catalizam a fosforilação de proteínas, sendo estas reacções uma das chaves do sinal da transdução celular. No genoma humano existem mais de 520 cinases. Os inibidores das cinases perfilam-se como os fármacos do futuro.

#### JAK2 V617F

O JAK2 é uma proteína tirosina-cinase citoplasmática que tem um papel relevante na proliferação e sobrevivência celular.

Ao nível do cromossoma 9, no exão 14 do gene JAK2, o aminoácido valina foi substituído pela fenilalanina porque uma base, a guanina, foi trocada pela base timina, na posição 617. Este erro dá assim origem a um novo nucleótido responsável pela produção de uma proteína anómala, uma cinase que provoca uma perda da auto-inibição da enzima Janus Kinase. A consequência é a activação desta enzima, anteriormente inibida, com a transmissão eficaz de sinais a partir dos receptores tipo I da célula progenitora pluripotencial: da eritropoietina (EPO) do receptor da trombopoietina e do receptor do factor estimulador das colónias de granulócitos, G-CSF. A transmissão de sinais a partir dos receptores das citocinas vai activar as vias de sinalização intracelular como o Stat 3 e 5.

Os progenitores hematopoiéticos tornam-se hipersensíveis aos estímulos dos factores de crescimento fisiológicos

respectivos já referidos. Surge assim a hiperproliferação descontrolada, mas morfológicamente normal, das três linhagens, a eritróide, a leucocitária e a plaquetar. Esta é a marca da PV no sentido de que a mutação que lhe deu origem actua nos três tipos de receptores da *stem cell*. Enquanto que as células de linhagem mielóide expressam receptores de citocinas do tipo I, as células da linhagem linfóide não os expressam. Este facto explica porque a ocorrência da mutação JAK2 V617F na *stem cell* resulta numa expansão selectiva das células unicamente da linhagem mielóide.<sup>13</sup>

Em condições normais, a EPO controla e regula a maturação e multiplicação dos precursores eritróides da MO, como em resposta a certos estímulos, tal como a hipoxémia. Na PV as unidades formadoras de colónias progenitoras eritróides, BFU-E, passam a hiperrespondedoras ao estímulo da EPO e até independentes desta. Mesmo na ausência de EPO verifica-se hiperplasia eritróide, significando que essa proliferação se tornou autónoma. Assim tornam-se predominantes e suprimem a proliferação dos progenitores eritróides normais.

Esta mutação adquirida de que resulta um oncogene vai gerar um clone heterozigótico para o JAK2, que se expande para substituir todas as células hematopoiéticas sem a mutação. Numa fase posterior, o clone heterozigótico pode alterar o seu *status* para homozigótico, originando um novo clone que se expande e substitui o clone heterozigótico anterior. A dominância clonal das células homozigóticas para o JAK2 V617F está claramente associada à activação dos granulócitos e à mobilização de células CD34+, com a posterior evolução para fibrose. Provavelmente a aquisição do *status* de homozigotia equivale à passagem da fase proliferativa da policitemia para a fibrótica e que se caracteriza pela mobilização de células CD34+ no sangue periférico.

Os aspectos essenciais da excessiva mieloproliferação associada ao JAK2 são um ganho de função e uma perda do controlo. O primeiro, no sentido de um aumento da produção de células maduras através dos factores de crescimento mielóides e o segundo, porque os mecanismos que controlam e regulam as contagens de células em circulação deixam de funcionar.

*O que a mutação JAK2 traz de novo:*

1. Alterar radicalmente os critérios diagnósticos, tendo-se obtido uma simplificação significativa.
2. A abordagem terapêutica já sofreu alterações, como o *timing* de instituição da terapêutica com HU, e, num futuro próximo, a administração de terapêutica específica, como as cinases inibidoras do JAK2 V617F.

3. A monitorização da terapêutica, dado que vai ser possível avaliar a resposta molecular a esta.
4. Permitir a estratificação dos doentes de acordo com o seu prognóstico.
5. Obrigar a uma reclassificação da DM, estabelecendo a base molecular das DM BCR/ABL-negativas que deixaram de ser entendidas como estados reactivos para serem assumidas como doenças intrínsecas à *stem cell*.
6. Alterar a abordagem do doente com acidente vascular cerebral, embolia pulmonar e trombose abdominal.

## 5. SINAIS E SINTOMAS NA PV

Frequentemente, é diagnosticada durante um *check-up* laboratorial, já que na maioria dos casos a PV persiste assintomática durante muitos anos.

Toda a sintomatologia gira em torno da hiperviscosidade, pois não nos podemos esquecer que o hematócrito nestes doentes pode atingir valores de 80%, com nove milhões de eritrócitos, a hemoglobina valores de 25g/dL e o volume plasmático dez a quinze litros. A hiperviscosidade origina dilatação de toda a árvore vascular e lentificação da circulação. O rubor da face (tipicamente cor de cereja como se tivesse apanhado um escaldão, uma bofetada, em oposição ao tom azulado da cianose) estende-se a áreas contíguas como pescoço, orelhas, nariz e extremidades distais. A fácies pletórica com injeção conjuntival, o engurgitamento das veias retinianas e a hipertensão arterial sistólica, são outros dos primeiros sinais a surgir. Outros sintomas decorrentes da hipervolemia são as tonturas e vertigens, a disartria, o humor depressivo, a apatia, a ansiedade, os acufenos, as cefaleias, a fadiga e as artralgias.

A trombocitose provoca a eritromelalgia, a evolução para mielofibrose e a discrasia hemorrágica, dado que as plaquetas apesar de se apresentarem numericamente aumentadas, revelam alterações funcionais (diminuição de tromboxano A2 e de factor de agregação plaquetário) e também morfológicas, afectando assim a hemostase primária. A leucocitose está implicada na evolução para mielofibrose e origina sobretudo parestesias.

Decorrentes do hipermetabolismo e do aumento do *turn-over* celular surge a sudorese, sobretudo das extremidades distais, a hiper-histaminemia com o conseqüente prurido aquagénico (tipicamente agrava com o banho quente) e a dispepsia ulcerosa (úlceras pépticas duodenais com *status Helicobacter pylori* independente), a hiperuricemia (com as suas conseqüências, a gota secundária e a litíase renal) e a hiperpotassémia (fraqueza muscular e toxicidade cardíaca).

ca) frequentemente agravada por fármacos anti-hipertensores poupadores de K.

A hepato-esplenomegália surge num contexto de enfarte esplênico e de hematopoiese extra-medular. À palpação, o baço apresenta-se doloroso, de bordo duro, regular e rombo, podendo eventualmente auscultar-se um sopro esplênico. É de valorizar se nos é dado observar um diâmetro transversal superior a 12cm ou se o aumento ao ano é superior a 2cm. É o único sinal que faz diagnóstico diferencial com a policitemia secundária.

As complicações vasculares são a principal causa de morte nestes doentes: a embolia pulmonar, a tromboflebite, a trombose venosa (da mesentérica, da hepática, da esplânica e da porta) e a trombose arterial (do território coronário e cerebral). A sudação nocturna profusa e o emagrecimento surgem à medida que a doença progride.

Os sinais e sintomas mais comuns são, por ordem decrescente: a plétora, a esplenomegália, a hepatomegália, a dispnéia, a cefaleia, a fraqueza, o prurido, as tonturas e a dispnéia.

## 6. EVOLUÇÃO

Trata-se de uma doença crónica de evolução arrastada, com um início insidioso em que se observam quatro estádios ou fases:

- 6.1. Fase pletórica/proliferativa: é a fase inicial em que existe um excesso de células em circulação e um aumento do volume plasmático.
- 6.2. Fase de latência: pode durar vários anos.
- 6.3. Fase de exaustão ou *Spent Phase*: a trombocitose vai induzir a proliferação fibroblástica e esta conduz à fibrose medular com a consequente hipocelularidade e diminuição da produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A hepato-esplenomegália torna-se mais acentuada e surgem os sintomas compatíveis com o progredir da doença: emagrecimento e sudação profusa. Ironicamente, nesta fase estes doentes podem tornar-se dependentes da transfusão de concentrado eritrocitário, concentrado plaquetário, de plasma e de crioprecipitado, dado a fibrose medular, a exaustão dos depósitos de ferro e a inexorável progressão para a hepato-esplenomegália. Laboratorialmente, detecta-se marcada anisocitose e poiquilocitose. A percentagem de saturação de O<sub>2</sub> está frequentemente diminuída, dificultando o diagnóstico diferencial com a policitemia secundária.
- 6.4. Leucemia Mieloblástica Aguda/Síndrome Mielodisplásico: esta evolução ocorre em aproximadamente 5% dos

doentes. A idade avançada é o principal factor de risco independente, só depois surge o esquema terapêutico adoptado, isto é, se foi iniciada ou não terapêutica mielosupressora como fósforo (P<sup>32</sup>), *bussulfan* e *pipobroman*. Com a HU e as FT esse risco é muito inferior. Foram também documentados raros casos de evolução para leucemia linfocítica aguda e leucemia neutrofilica crónica.

## 7. DIAGNÓSTICO

Os *guidelines* diagnósticos para a PV sempre integraram critérios clínicos e laboratoriais, mas a recente descoberta da génese molecular das DM, BCR:ABL-negativas, a mutação JAK2 V617F, veio permitir a sua classificação genética e um diagnóstico molecular. O *screening* do JAK2 permite detectar a mutação V617F existente na maioria dos doentes com PV, em mais de 95% dos casos, sobretudo se o teste de detecção for baseado na tecnologia de *polymerase chain reaction* (PCR).<sup>14</sup> Assim elimina-se a necessidade de testes adicionais, dispendiosos e morosos para além da indiscutível fiabilidade que um teste molecular confere a qualquer diagnóstico.

Quando suspeitarmos clínica (esplenomegália, prurido aquagénico, trombose e eritromelalgia) ou laboratorialmente (hematócrito > a 55% em indivíduos do sexo ♂ e > 50% no sexo ♀ e etnia negra) de um caso de PV, o primeiro teste a efectuar deverá ser a determinação da EPO. Caso se encontre aumentada, é de excluir a PV e orientamo-nos para um diagnóstico de policitemia secundária. Se o valor encontrado for inferior ou normal é muito provável que se trate de uma PV. O teste seguinte a efectuar será o *screening* do JAK2 para detectar a mutação V617F. Se a pesquisa da mutação for positiva, damos o diagnóstico por efectuado e a investigação por terminada. Caso este resultado seja negativo e não exista aparentemente uma causa secundária para a policitemia, deverá ser efectuada a massa eritrocitária e o medulograma para excluir os raros casos de PV JAK2 negativos.

De toda a forma, é interessante observar a sua evolução ao longo do tempo, pois só assim podemos valorizar a simplificação diagnóstica actual.

Tal como nas referências históricas também podemos abordar o diagnóstico como a era pré-JAK2 e a era post-JAK2.

### *Era Pré JAK2 2001*

#### Critérios A:

1. Massa eritrocitária <sup>51</sup>CR superior em 25% ao valor médio determinado para o peso e a altura do doente ou a Hb > 18,5 g/dL-sexo ♂; Hb > 16,5g/dL-sexo ♀ e etnia negra.

2. Ausência de eritrocitose secundária:
  - 2.1. Eritrocitose familiar
  - 2.2. Elevação da EPO por :
    - 2.2.1. Hipoxia arterial (pO<sub>2</sub> < 92%)
    - 2.2.2. Hb de alta afinidade para O<sub>2</sub>
    - 2.2.3. Produção EPO fisiologicamente não apropriada
3. Ausência do cromossoma Phyladelphia e do gene de fusão BCR-ABL nas células da MO.
4. Formação de colónias endógenas eritróides

#### Critérios B:

1. Trombocitose > 400.000/ $\mu$ L
2. Leucocitose > 12x10<sup>9</sup>/L
3. Medulograma: panmielose com proliferação eritróide e megacariocítica intensa
4. Valor de EPO inferior ao normal

Para efectuar o diagnóstico de PV era necessário que se observassem pelo menos os dois primeiros critérios A e mais qualquer um dos restantes critérios A, ou os dois primeiros critérios A, mais dois dos critérios B.

#### *Era pós JAK2 – OMS 2007*

#### Critérios Major:

1. Hb > 18,5g/dL no sexo ♂ e Hb > 16,5g/dL sexo ♀ e etnia negra ou massa eritrocitária > 25% ao valor médio determinado para o peso e a altura do doente
2. Presença da mutação JAK2 V617F ou outra mutação funcionalmente semelhante à do JAK2, no exon 12 .

#### Critérios Minor:

1. EPO < normal
2. Medulograma: panmielose com hiperplasticidade das três séries
3. Formação *in vitro* de colónias endógenas eritróides.

Com os actuais critérios, aceita-se um diagnóstico de PV com dois critérios *major* e um *minor* ou o primeiro *major* mais dois critérios *minor*.

Na prática, preenchendo os dois novos critérios *major* serão diagnosticadas mais de 97% dos casos de PV. Contudo, para minimizar as consequências dos resultados falsos positivos dos testes moleculares e para otimizar a especificidade diagnóstica, é necessária a presença adicional de pelo menos um dos três critérios *minor*, para o diagnóstico de PV.

A combinação diagnóstica alternativa (o primeiro critério *major* mais dois critérios *minor*) deverá repescar os raros casos de PV verdadeira que são negativos para a mutação JAK2, ou que a possuem mas num limiar tão baixo que ainda não é detectada com os testes actualmente disponíveis. O requisito de dois dos critérios *minor* em vez de um, reforça a exactidão que está associada a cada teste e aumenta o nível de confiança para efectuarmos um diagnóstico específico, no contexto de um teste molecular com um resultado negativo.

A outra vantagem dos novos *guidelines*, nomeadamente o segundo critério *major*, é que vai permitir a identificação dos casos de PV precoce ou atípica e que anteriormente passavam ao lado, já que estes apresentam a mutação JAK2 no exon 14 ou no 12.

Provavelmente o único reparo, mas só o tempo o dirá, será o facto de entrar em linha de conta com o valor da hemoglobina e não do hematócrito. Este último permite eliminar logo à partida os casos de policitemia aparente. Mas dado que há décadas que este não é um assunto pacífico, a controvérsia vai com certeza persistir sobre qual dos três parâmetros eritrocitários (hemoglobina, hematócrito e a massa eritrocitária) é o mais fidedigno na determinação do volume eritrocitário.

A interpretação do valor da hemoglobina/hematócrito deve ser cuidadosa já que não é infrequente na PV o défice de ferro, no contexto da hiperproliferação eritrocitária, quer associado a perdas hemáticas (a hemorragia digestiva baixa é a mais frequente) quer ainda iatrogénico, sendo decorrente de um deficiente acompanhamento do programa de FT. Nestes casos, é mandatório interpretar os referidos valores após a reposição prudente com ferro. De toda a forma, perante um valor normal ou baixo da hemoglobina e hematócrito com deficit de ferro, não devemos deixar de efectuar o diagnóstico de PV só porque não são preenchidos os presentes critérios.

Alguns casos de trombose idiopática abdominal com a mutação JAK2 positiva poderão evoluir para PV franca.<sup>15</sup> Mas este é um dado recente que obriga a ponderação e à obtenção de mais informação, até que esta e outras patologias trombóticas venham a fazer parte dos critérios diagnósticos.

## 8. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A PV e a policitemia secundária apresentam frequentemente quadros clínicos quase sobreponíveis, pois têm a mesma constelação de sinais e sintomas. A discriminação entre as duas entidades é importantíssima, já que têm abordagens

diagnósticas e terapêuticas completamente diferentes. É frequente surgirem-nos na consulta doentes “apelidados” de PV quando na verdade estávamos perante uma causa menos comum de policitemia secundária e vice-versa. Nesse sentido, o surgimento da mutação JAK2 constituiu-se como uma preciosa ferramenta diagnóstica.

Um valor de EPO superior ao de referência exclui o diagnóstico de PV e orienta o diagnóstico no sentido de uma policitemia por aumento fisiologicamente apropriado de EPO (doença pulmonar crônica obstrutiva, síndrome de apneia do sono, carboxi-hemoglobinemia do fumador, cardiopatia congênita cianótica) ou a uma produção autónoma de EPO (patologia renal e hepática, mioma uterino gigante). Da bateria de exames a pedir, deverão constar uma gasimetria (saturação arterial O<sub>2</sub>, carboxi-hemoglobina), ecografia abdominal, estudo polissonográfico do sono e estudos da função pulmonar. Uma história clínica criteriosa é fundamental e faz toda a diferença.

O diagnóstico diferencial com a trombocitemia essencial e a mielofibrose impõe-se e pode ser difícil de efectuar. O valor do medulograma mantém-se dado que nas três DM BCR/ABL negativas, a mutação JAK2 V617F pode estar presente.

## 9. ATITUDES TERAPÊUTICAS

### 9.1 Flebotomias terapêuticas

As FT constituem-se como a abordagem terapêutica de primeira linha, dado que são a opção mais racional, rápida, eficaz e segura para os pacientes c/ o diagnóstico de PV, no estágio 1 e 2, tanto tempo quanto for possível, até à progressão para o estágio 3. Esta opção terapêutica associa-se a uma maior sobrevivência e a um menor risco de evolução para leucemia aguda, do que aqueles pacientes em terapêutica 1<sup>a</sup> com agentes mielossuppressores. O maior risco de trombose que se regista nos três primeiros anos nos doentes tratados exclusivamente c/ FT é discreto e ocorre sobretudo no doente idoso e com factores de risco de evolução para trombose (HTA, DM, hábito tabágico e hipercolesterolemia), diminuindo significativamente com a adição de AAS 100mg. O risco de mielofibrose mantém-se mais elevado nos pacientes tratados exclusivamente c/ FT, provavelmente devido à trombocitose, mas inexplicavelmente neste grupo de pacientes a sobrevivência é maior.

O principal efeito secundário das FT é a anemia mas é evitável, desde que o paciente adira ao programa no sentido de controlar o VGM e o ferro sérico e, se necessário for, adia-se a flebotomia. A constatação objectiva de sinais clínicos compatíveis com défice crónico de ferro como a pica, a

estomatite e a glossite são inaceitáveis e reveladores de um deficiente programa de FT. A microcitose, com a consequente diminuição da deformabilidade e elasticidade eritrocitária, não diminui a sobrevivência eritrocitária por sequestro esplênico. Ao contrário do que se suponha, os eritrócitos microcíticos não ficam retidos na polpa vermelha esplênica com a posterior fagocitose macrofágica, mas têm a sua cinética facilitada comparativamente aos eritrócitos normais, dado que atravessam com mais facilidade os reduzidos poros esplênicos.<sup>16</sup> A suplementação com ferro nos raros casos em que tem indicação, é efectuada recorrendo a controlo semanal do hematócrito, dado o risco da sua elevação súbita. Em relação à teoria anterior de que as FT induziam trombocitose, os resultados dos estudos mais recentes contrariam-na veementemente, dado que é reactiva ao procedimento das FT e portanto transitória. Porque se demonstrou que os pacientes com PV apresentam um aumento na biossíntese de tromboxano A2 e se reduziu a mortalidade cardiovascular nos pacientes com PV, em programa de FT e em terapêutica coadjuvante com AAS 100mg, este fármaco tem indicação desde o período de latência até às fases terminais da PV. Se existem antecedentes de dispepsia, iniciar terapêutica com protector gástrico, como um inibidor da bomba de prótons. Sempre que surja hiperuricémia, iniciar terapêutica com Alopurinol 100mg/dia.

Iniciar desabitação tabágica.

#### 9. 1. 1. Abordagem clínico-laboratorial

##### 9. 1. 1. 1 Critérios de inclusão

- Hb: > 14g/dL
- Contagem plaquetária (CP): > 125.000/ $\mu$ L
- K: > 3,8mEq/L
- Proteínas totais: > 6g/dL
- ECG/ECO: s/ alterações significativas
- acessos venosos conservados

##### 9. 1. 1. 2 Parâmetros laboratoriais pré-flebotomia

- Hemograma
- Ácido úrico e LDH
- Proteínas totais e albumina
- Ionograma
- Ferro sérico
- Factores de risco cardiovascular: homocisteína, anticorpo antifosfolípido, proteína C e S, antitrombina III e Factor V *de Leiden*; Perfil lipídico.
- Eco abdominal

##### 9. 1. 1. 3 Esquemas terapêuticos

Individualizados e dependentes do *status* clínico-laboratorial do doente. Distinguem-se três etapas:

- **Início:** efectuam-se duas a três flebotomias c/ reposição isovolémica de soro fisiológico, com aproximadamente 7 dias de intervalo até se atingir um hematócrito  $\leq 40\%$  na ♀ e etnia negra,  $> 40\% < 45\%$  no ♂.
- **Equilíbrio:** flebotomia mensal ou de dois em dois meses
- **Manutenção:** 2 a 3 flebotomias por ano.

Nos doentes com a mutação JAK2 V617F em homozigotia, há que ser muito cuidadoso em atingir as metas estabelecidas no que diz respeito aos valores do hematócrito, dado o maior risco de trombose que envolve estes doentes.

**Particularidades**

- Em pacientes com baixo peso, que não toleram a flebotomia, com mais de 65 anos, ou ainda com complicações vasculares, efectuam-se flebotomias de 250mL com reposição isovolémica de soro fisiológico.
- Se hipertensão arterial e/ou sintomas compatíveis c/ insuficiência cardíaca (edema dos membros inferiores, dispneia), não efectuar reposição.
- Se hipopotassémia (retirar anti-HTA expoliadores de K), hipoalbuminémia ( $< 3,2\text{g/dL}$ ), hipoproteinémia ( $< 6,0\text{g/dL}$ ) anemia, ou trombocitopénia, há que espaçar as fle-

botomias. Excluir pseudo-hiperkaliémia provocada por uma colheita deficiente (excesso de garrote).

9. 1. 1. 4 Avaliação dos resultados obtidos

- Diminuição da sintomatologia já referida
- Hemograma (Htc, VGM, neutrófilos e basófilos, plaquetas)
- Ácido úrico
- LDH
- BBd
- ECO abdominal

9. 1. 2 Metas terapêuticas

Pretende-se que as FT provoquem uma diminuição do ferro sérico e posteriormente a exaustão dos depósitos, com a consequente redução da eritropoiese e da hiperviscosidade. O alívio sintomático é quase imediato, contrariando assim a inexorável progressão para um estado de pré-trombose.

Há que sensibilizar o doente para a importância da adesão ao programa de FT proposto, dado que dele depende o êxito de todo o programa terapêutico.

9. 1. 3 Critérios de resposta hematológica (Quadro I)

QUADRO I

Remissão hematológica completa	Remissão hematológica parcial
Htc: $\leq 40\%$ - ♀ e raça negra e $> 40 < 45\%$ - ♂ CP $< 600.000/\mu\text{L}$ Contagem leucocitária(CL), $< 15 \times 10^9/\text{L}$ Sem esplenomegália	Htc: $\leq 40\%$ - ♀ e raça negra e $40 < 45\%$ - ♂ CP $> 600.000/\mu\text{L}$ e/ou CL $> 15 \times 10^9/\text{L}$ e/ou Esplenomegália

9. 2 Terapêutica mielossupressora

O *timing* para iniciar a terapêutica mielossupressora surge sempre que o paciente entre no estágio 3 ou 4 da PV e:

- CP  $> 1.000.000/\mu\text{L}$  e durante terapêutica c/ AAS
- CP  $> 600.000/\mu\text{L}$  em paciente sintomático e c/ efeitos secundários ao AAS / Anagrelide
- Esplenomegália
- Sintomas graves relacionados com a PV
- CL  $> 20 \times 10^9/\text{L}$ . Se mutação JAK2 positiva e CL  $> 15 \times 10^9/\text{L}$
- Complicações tromboembólicas *major* arteriais ou venosas
- Anemia sintomática
- Deterioração dos acessos vasculares
- Necessidade elevada de FT para manter a remissão hematológica completa:  $> 8/\text{ano}$

- Perda de heterozigotia, aquisição de *status* homozigotico da mutação JAK2 V617F.

9. 3 Fluxograma de decisão terapêutica

A terapêutica de longo prazo escolhida depende do *status* clínico-laboratorial do doente, tal como nos é dado observar no Quadro II.

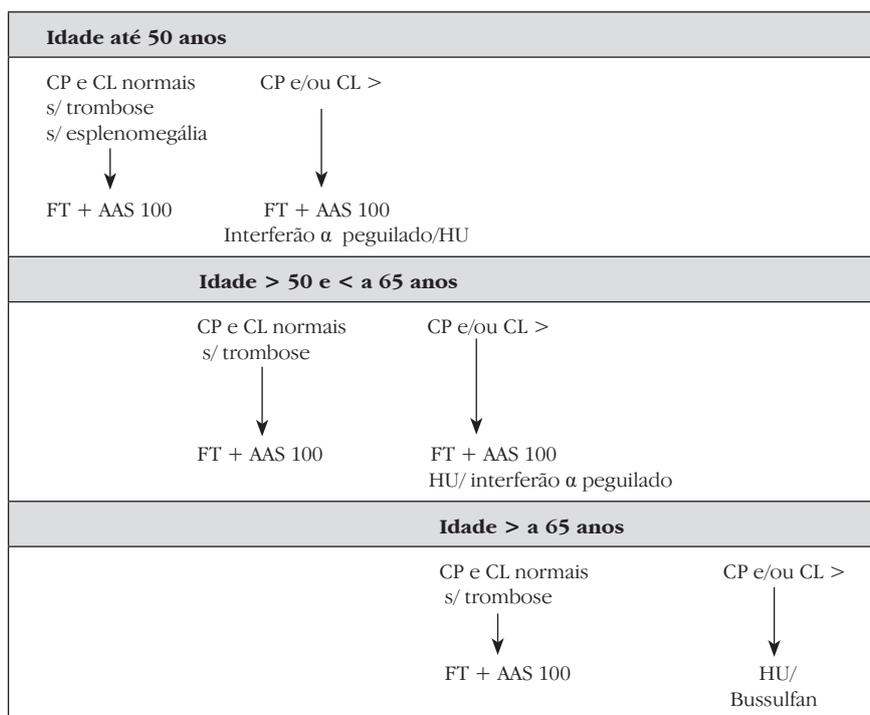
A Anagrelida actua na trombocitose refractária à HU e interfeirão  $\alpha$  peguilado e sempre que se registre trombocitose grave (CP  $> 1500/\mu\text{L}$ ), mas reveste-se de efeitos secundários não desprezíveis.

A mutação JAK2 permite efectuar a monitorização da terapêutica ao avaliar a resposta molecular a esta.

9. 4 Terapêutica coadjuvante

O anti-agregante plaquetário AAS 100mg desde o início do diagnóstico é bem tolerado pelos doentes e eficaz na prevenção de trombose arteriais e venosas.<sup>17</sup>

QUADRO II. FLUXOGRAMA DE DECISÃO TERAPÊUTICA



Alopurinol 100 mg se a hiperuricémia é assintomática e 300mg se sintomática.

A instituição terapêutica com anti-histamínico no controlo do prurido aquagénico não revelou uma grande eficácia.<sup>18</sup> O melhor tratamento é sempre um bom controlo da PV. A aspirina e a ciproheptadina resultaram nalguns casos.<sup>19</sup> A fototermoterapia com psolarenos e luz ultra-violeta são outras opções terapêuticas.<sup>20</sup> A utilização de interferão alfa reserva-se para aqueles casos de prurido intenso e intratável.<sup>21,22</sup>

A transfusão com concentrado eritrocitário na fase terminal que cursa com anemia, com concentrado plaquetário/concentrado unitário de plaquetas, plasma e crioprecipitado sempre que tem indicação.

### 9. 5 Esplenectomia

Associa-se a elevada morbidade e mortalidade pelo que terá de ser uma decisão muito ponderada, de qualquer modo esta opção coloca-se sempre que surge para além da esplenomegália, hematopoiese extra-medular extensa, trombocitose intratável e suporte transfusional mantido.

## 10. PROGNÓSTICO

A qualidade de vida e a sobrevivência destes doentes estão intimamente relacionadas com a massa eritrócitária, po-

dendo ser excelentes se existir um bom controlo da PV, ao contrário das policitémias secundárias cujo prognóstico depende da doença de base.

A principal causa de morte é a trombose arterial ou venosa, seguindo-se a LMA e, por fim, a hemorragia digestiva baixa.

A idade avançada e um episódio de trombose prévio são os dois mais importantes factores prognósticos para o desenvolvimento de complicações vasculares graves.<sup>23</sup>

Os doentes tratados com FT revelaram uma sobrevivência de 14 anos, enquanto que aqueles em que se optou por fármacos mielossupressores viveram apenas 9 anos. Os doentes sem tratamento apresentaram uma sobrevivência de apenas 18 meses.

A hipocolesterolemia na ausência de terapêutica hipolipemiante é um marcador precoce de actividade da doença, no sentido da proliferação celular e está associado à evolução para LMA/SMD.<sup>24</sup>

Outros factores de mau prognóstico são o aumento dos basófilos, a microcitose, a esplenomegália e o aparecimento de sintomas B.

De acordo com os factores de risco apresentados pelo doente com PV, podemos classificá-lo em baixo, intermédio

ou elevado risco de evolução para trombose, tal como nos é dado observar no Quadro III.

QUADRO III. ESTRATIFICAÇÃO DO RISCO DE TROMBOSE EM DOENTES COM PV

Grau de risco	Factores de risco
Baixo	Idade < 60 anos e Sem história de trombose CP < 1.500.000/ $\mu$ L CL < 10x10 <sup>9</sup> /L Heterozigotia da mutação JAK2 V617F
Intermédio	Idade < 60 anos Sem história de trombose CP > 1.500.000/ $\mu$ L CL > 15x10 <sup>9</sup> /L Factores de risco cardiovascular (DM, HTA, Hipercolesterolemia) Homozigotia da mutação JAK2 V617F
Elevado	Idade > 60 anos e História de trombose CP > 1.500.000/ $\mu$ L CL > 15x10 <sup>9</sup> /L Factores de risco cardiovascular (DM, HTA, Hipercolesterolemia) Homozigotia da mutação JAK2 V617F

Não existem provas de que a trombocitose se correlacione significativamente com a trombose. O mesmo não se passa com a leucocitose, dado que recentemente se provou que se comporta como um factor de risco independente para trombose: os doentes com PV e uma CL superior a 15x10<sup>9</sup>/ $\mu$ L apresentam 70% mais complicações vasculares, sobretudo enfarte agudo do miocárdio, do que aqueles sem leucocitose.<sup>25</sup>

Os doentes com PV têm uma predisposição paradoxal para complicações trombóticas e hemorrágicas. A incidência de trombose varia de 12 a 39% e a de hemorragia de 1,7 a 20%.<sup>26</sup> Esta última inclui epistaxis, gengivorragias menorragias e, menos raramente, a hemorragia digestiva baixa.

A homozigotia da mutação JAK2 associa-se a uma maior incidência de mielofibrose, hemorragia e trombose. Mas recentemente foi descrito o caso de um doente com o diagnóstico de PV, com homozigotia para o JAK2 e que mais tarde vem a perder o referido *status* evoluindo, assim, para a heterozigotia da mutação JAK2. Mas, contrariando o que se esperava, desenvolveu mielofibrose. Neste caso a perda da homozigotia para o JAK2 V617F correlacionou-se com um mau prognóstico.

## 11. O FUTURO

Há que ter a noção que a descoberta do JAK2 abriu um nova auto-estrada do conhecimento, mas cujos destinos e extensão ainda estão por abarcar. É realmente a mutação de uma geração que vai ficar para a história, mas ao contrário da descoberta da mutação BCR:ABL, a do JAK2 não está confinada à hemato-oncologia mas ultrapassou esse âmbito, estendendo-se a sua influência a áreas como a neurologia, a gastroenterologia e a pneumologia, pela sua implicação em acidentes vasculares cerebrais, trombozes da porta, esplâncnica e mesentérica e na embolia pulmonar, respectivamente. A prevalência da mutação do JAK2 nos doentes com as patologias referidas (e sem qualquer DM) está aumentada, significando que existe uma associação entre a mutação e a frequência da patologia trombótica.

## 12. LINHAS DE INVESTIGAÇÃO

Dado que a perda de heterozigotia da mutação JAK2, ou seja, a homozigotia, se associa à evolução para mielofibrose e à mobilização de células CD 34+ no sangue periférico, é pertinente correlacionar o *status* JAK2 V617F com a referida mobilização, a activação dos granulócitos e a progressão da doença.

Porque a homozigotia da mutação JAK2 aumenta a produção da proteína mutada, deveria ser avaliado se a expressão de níveis elevados de JAK2 V617F suporta o desenvolvimento de um fenótipo eritróide e, paralelamente, se baixos níveis suportam um fenótipo megacariocítico.<sup>27</sup>

Em doentes com o diagnóstico de PV e negativos para a mutação JAK2 V617F, seria interessante sequenciar o m-RNA no sentido de pesquisar a mutação em eritrócitos e plaquetas e verificar se a detecção da referida mutação revela ser mais sensível em plaquetas do que em granulócitos.<sup>28</sup>

Dado o sucesso do Imatinib para a LMC, aguardam-se os resultados na *Cancer Cell* do ensaio clínico multicêntrico, em fase III, com um inibidor do JAK2, o TG101348, e que envolve doentes do *Dana Farber Cancer Institute* e da *Mayo Clinic*. Trata-se de uma pequena molécula de administração por via oral que em estudos fase pré-clínica revelou ser potente e selectiva com discretos efeitos secundários.<sup>29, 30</sup>

Outros inibidores do JAK2V617F mas ainda em estudo: ERLOTINIB<sup>31</sup>, WP1066<sup>32</sup> e CYT387. O primeiro é um potente inibidor da actividade do JAK2 V617F num modelo animal. O WP1066 é um novo inibidor do JAK2 que suprime a proliferação e induz a apoptose em células humanas da linhagem eritróide, portadoras da mutação JAK2 V617F.

Realização de ensaios clínicos randomizados para testar os inibidores das tirosinas cinases já referidos.

Reportar os casos clínicos de PV em Portugal ao Grupo Europeu de Estudo da PV.

### 13. QUESTÕES

Quais as implicações para o prognóstico dos recentes marcadores genéticos da PV?

Qual o hematócrito ótimo como alvo das FT?<sup>33</sup>

De que modo o JAK2 V617F contribui para três DM e que outros factores/ intervenientes podem favorecer um fenótipo em detrimento de outros?<sup>34</sup>

### 14. CONCLUSÕES

Em doenças raras como a PV, a partilha de informação científica, biológica e clínica é um pré-requisito essencial na obtenção de estudos clínicos de elevada qualidade. De facto, a história da terapêutica da PV revela claramente que só estudos alargados e multicêntricos, como a estratégia de um PVSG, são o futuro para uma optimização da abordagem da PV.

Face aos recentes avanços científicos na área da PV cuja materialização se traduz na identificação da mutação JAK2 V617F, há que esclarecer a relevância clínica dos novos marcadores genéticos e celulares. Em relação aos marcadores biológicos desta doença, as complicações trombo-hemorrágicas *major* e a evolução para leucemia deverão ser aceites como marcadores prognósticos. Neste contexto, o papel dos enzimas inibidores das cinases deve ser testado em estudos clínicos posteriores.

Num futuro próximo o esforço combinado de investigação clínica e das ciências básicas contribuirão para melhorar a abordagem da PV, de acordo com as regras da medicina baseada na evidência.

## ABORDAGEM CLÍNICA DAS FT NA HEMOCROMATOSE-SITUAÇÃO ACTUAL E PERSPECTIVAS FUTURAS: O PAPEL DA CALRETICULINA

### INTRODUÇÃO

A recente descoberta efectuada por Maria de Sousa e colaboradores e publicado na revista *Free Radical Biology and Medicine* em 2008<sup>35</sup>, sobre o papel protector da Calreticuli-

na na Hemocromatose Hereditária (HH) vem alterar sobremaneira a sua abordagem. Assim, aqueles doentes que há décadas se sabia que apesar de portadores em homozigotia da mutação C282Y não desenvolviam o quadro clínico-laboratorial que se esperaria, sabe-se agora que é devido a uma maior expressão da calreticulina. Esta proteína protectora adia, atenua, os efeitos nefastos do excesso de proteína defeituosa que é produzida pelo gene HFE. A calreticulina actua como modificador da expressão clínica da doença, num processo adaptativo e de defesa. É a resposta do organismo às condições adversas que lhe são impostas geneticamente.

Então, nestes doentes, a abordagem anteriormente seguida das FT terá que ser revista, tal como naqueles doentes que têm a mutação mas não têm o efeito atenuador da dita proteína, no sentido da sua protecção. Assim, irei expor algumas alterações em relação ao que há muito estava estabelecido, nomeadamente a inclusão da calreticulina nos critérios de estabelecimento do programa de FT e nas metas terapêuticas das mesmas. Por outro lado, o papel retardador da doença agora atribuído à calreticulina também levanta outras questões pertinentes a breve trecho, nomeadamente o seu interesse prognóstico e até terapêutico.

#### 1. DEFINIÇÃO

A HH é uma doença do metabolismo do ferro, autossómica recessiva, causada por uma mutação no gene HFE, cujo resultado é a produção de uma proteína anómala que vai determinar uma desregulação da absorção do ferro, ao nível do enterócito, no sentido de um excesso. Esta predisposição genética para o aumento inapropriado da absorção de ferro proveniente da dieta leva ao desenvolvimento progressivo de complicações como a cirrose, o carcinoma hepatocelular, a diabetes mellitus, DM e a miocardiopatia.

#### 2. REFERÊNCIAS HISTÓRICAS

1865 - *Troisier e Trousseau* descrevem a doença como a tríade constituída por glicosúria, cirrose e hiperpigmentação cutânea.

1889 - *Recklinghausen* atribui o termo hemocromatose, do grego *haima* (sangue) e *chromatos* (cor), para designar o depósito de ferro em células do parênquima de vários órgãos, sobretudo o fígado, com a consequente lesão celular e limitação de função hepática.

1996 - *John Feder et al* descobrem a mutação genética na origem da doença - uma alteração no gene responsável pelo fabrico da proteína HFE.

2002 – Ernest Beutler *et al* em artigo publicado na revista médica *The Lancet*, constata a existência de uma discrepância não desprezível entre a frequência da mutação e o número de doentes sintomáticos.

2008 – Maria de Sousa e colaboradores descrevem o papel protector da Calreticulina na HH.

### 3. INCIDÊNCIA

A HH é a doença genética mais comum na população caucasiana, com uma frequência de 3-5 por 1000 habitantes e uma prevalência de homozigotos na mesma população de 1:250 a 1:400.

É mais frequente no sexo masculino e acima dos 40 anos de idade.

### 4. FISIOPATOLOGIA

O ferro é um elemento vital para todos os organismos vivos, pela sua participação em múltiplas reacções metabólicas essenciais, incluindo o transporte de oxigénio, a síntese de DNA e o transporte de electrões. Para assegurar o equilíbrio de ferro existe uma regulação muito estrita que permite que as perdas corporais deste elemento sejam compensadas pela absorção. Ao contrário de outros metais, é altamente conservado pelo organismo. O seu excedente só pode ser excretado em processos lentos de descamação epitelial, das secreções intestinais ou do sangramento menstrual.

O ferro em excesso facilita a replicação viral e as infecções bacterianas, diminui a resposta imunológica do hospedeiro, reduzindo a produção de células T citotóxicas e de linfócitos T *helper*, e aumenta a actividade dos T supressor (cria assim um ambiente propício ao desenvolvimento de células neoplásicas, como o carcinoma hepato-celular), induz a fibrinogénese, mesmo na ausência de necrose ou inflamação, pela libertação de produtos de peroxidação lipídica (mediadores da biossíntese do colagéneo) e causa lesão celular pela libertação de radicais livres, a necrose hepato-celular ou sidero-necrose. A morte celular provavelmente decorre da destruição de organitos celulares vitais, pelo excesso de ferro, iniciando-se nos lisossomas e estendendo-se aos microsomas e mitocondrias. A hipoferrémia que acompanha as infecções bacterianas e que é mediada pela interleucina-1 é um mecanismo de defesa para dificultar a multiplicação dos microorganismos.

Na HH o ferro deposita-se primeiro no parênquima do órgão alvo e só mais tarde no SRE, sendo o inverso na hemocromatose secundária. Nesta última e na mulher o seu apa-

recimento é mais tardio. Os órgãos-alvo típicos, para além do fígado e baço, são o coração, o pâncreas, as articulações (sobretudo o joelho) e as glândulas: suprarrenais, tiróide, hipófise (lobo anterior), paratiróides e as pituitárias.

O desenvolvimento de lesão hepática nos doentes com HH relaciona-se com a acumulação progressiva do ferro hepático que aumenta com a idade, na maioria dos doentes homozigóticos, mas também com a duração e o nível de exposição. Naqueles com mais de 40 anos e um valor superior a 20g de depósitos de ferro, a concentração hepática de ferro provavelmente excede 10.000µg/g de fígado seco e a biopsia hepática revela cirrose ou fibrose. O excesso de ferro é inicialmente armazenado intracelularmente na forma de ferritina em macrófagos e, persistindo a sobrecarga, nas células do parênquima hepático, células de Kupfer e ductos biliares. Segue-se a fibrose a partir do espaço porta progredindo para pontes ligando espaços porta, desenvolvendo-se a cirrose micronodular. Outros órgãos-alvo onde o ferro se deposita: células dos ilhéus de *Langerhans*, baço, fibras musculares do miocárdio, pele, articulações e território glandular já referido anteriormente.

O coração é mais susceptível ao efeito tóxico do ferro do que o fígado porque tem uma menor capacidade de síntese de ferritina. No coração, mesmo quantidades discretas de ferro livre podem gerar metabolitos tóxicos do oxigénio.

A hepatopatia alcóolica pode provocar um aumento moderado do ferro hepático e das reservas corporais deste. A AST e a ALT encontram-se moderadamente elevadas já que não existe necrose hepática nem inflamação extensa. Se porventura apresentarem valores muito elevados, tal como a saturação da transferrina (ST) e a ferritina há que pensar em doença hepática etanólica ou viral.

A toxicidade surge tanto por uma dose única e excessiva de ferro como pela acumulação crónica proveniente da dieta, toma inadequada de sais de ferro, como ainda por transfusões sanguíneas. As principais situações clínicas associadas à sobrecarga de ferro são a HH e a hemocromatose secundária. Esta última está relacionada com transfusões crónicas e ou regimes hipertransfusionais que levam à sobrecarga de ferro, sobretudo em patologias como a Talassémia Major e a Drepanocitose, mas também na Anemia Aplástica Refractária, nas Síndromas Mielodisplásicas Refractárias e nas Leucemias Agudas.

#### 4. 1 Genética

A mutação no gene HFE localiza-se no braço curto do cromossoma 6, muito perto do locus A dos antígenos da histocompatibilidade.

A principal mutação no HFE responsável pela HH, a denominada Cys282Tyr ou C282Y, surge em homozigotia em mais de 90% dos doentes com HH<sup>36</sup> e decorre da substituição de uma cisteína por uma tirosina na posição 282. A outra mutação, His63Asp ou H63D, é resultante da substituição de um aminoácido histidina por ácido aspártico na posição 63. A proteína secretada pelo HFE liga-se à beta-2-microglobulina e expressa-se à superfície das células das criptas intestinais. A mutação C282Y altera a conformação da proteína do HFE selvagem e interfere com as suas funções, nomeadamente, deixar de funcionar como sensor dos níveis de ferro do organismo, não transmitindo sinais celulares aos enterócitos de suspensão da absorção de ferro. A proteína defeituosa, para além de permitir uma anormal absorção de ferro e consequente acúmulo nos órgãos alvo, também ela se acumula anormalmente nas células do fígado. Nos doentes com HH a absorção de ferro não é assim regulada pelos seus depósitos, podendo esta ser quatro vezes superior ao normal, isto é, 4 mg de ferro por dia.

Como já foi referido anteriormente na Introdução, Maria de Sousa e colaboradores demonstraram em duas abordagens distintas, uma *in vitro*, recorrendo a células hepáticas e outra *in vivo*, utilizando células sanguíneas de doentes com HH, que a calreticulina tem um papel protector nestes.

O nosso organismo tem formas de evitar a acumulação de proteínas defeituosas, através de um mecanismo complexo que inclui a calreticulina. A abundância desta proteína está associada à capacidade das células corrigirem esses defeitos. A calreticulina aumenta em resposta aos radicais livres, altamente reactivos e prejudiciais, originados pela acumulação de ferro nas células hepáticas. Provavelmente a produção desta proteína protectora integra um mecanismo mais global, de resposta celular à presença de proteínas de conformação anómala e causadora da doença como o HFE. Um papel reparador de proteínas anómalas para a calreticulina e precedendo, prevenindo a lesão?

O aumento das concentrações de calreticulina deveria então fazer parte do processo de resposta do organismo ao *stress* oxidativo provocado pelo excesso de ferro intra-celular.

A calreticulina é uma molécula residente do retículo endoplasmático que está envolvida na linha de montagem do complexo maior de histocompatibilidade (CMH) classe I. Tem uma vasta distribuição tissular, como os grânulos de secreção dos linfócitos citotóxicos, superfície celular dos melanócitos e também no citoplasma e núcleos de vários tipos celulares. Após activação, os linfócitos T CD8+ e CD4+ do sangue periférico humano expressam quantidades significativas de calreticulina na superfície celular, em

associação física com as moléculas MHC classe I.<sup>37</sup> Esta proteína está envolvida no processo de apresentação de Ag via MHC-classe I, actuando como uma ponte entre o sistema imune e as anomalias provocadas pela sobrecarga de ferro, existentes nos doentes com HH.

Os valores de calreticulina correlacionam-se com o aumento de ferro intracelular. Detectou-se uma correlação negativa entre a expressão de calreticulina e o número de manifestações clínicas de HH, o que vem apoiar as observações *in vitro* de um papel de modificador da expressão clínica da HH.<sup>35</sup>

A grande variabilidade das manifestações clínicas e laboratoriais encontrada nos homozigóticos C282Y e nos heterozigóticos não poderia ser explicada apenas pela penetrância incompleta. Tinham de existir outros factores determinantes para a expressão clínica da hemocromatose, para além da mutação no gene. A calreticulina veio, assim, dar uma explicação para aquela proporção de homozigóticos que nunca demonstrou evidência clínica ou bioquímica de sobrecarga de ferro.

#### 4. 2 Factores Condicionantes da Expressão Clínica da HH

Existem diversos factores intrínsecos a cada doente que vão condicionar as manifestações clínicas da HH, os promotores e os inibidores, tal como podemos observar no Quadro I

QUADRO I. FACTORES CONDICIONANTES DA EXPRESSÃO CLÍNICA DA HH

Promotores	Inibidores
Sexo ♂	Sexo ♀ (menstruação, gestação, lactação)
Alcoolismo	Hemorragias anormais
Administração oral/parentérica de ferro	Dádiva de sangue
Infecção VHB, VHC	Parasitoses
Alimentação rica em ferro/ vit. C	Má absorção de ferro (Doença Celíaca)
Deficiência de alfa-1-antitripsina <sup>38</sup>	Aumento da concentração de calreticulina
Diminuição da concentração de calreticulina	

#### 5. SINTOMATOLOGIA

A clássica tríade de *Trousseau*: pigmentação cutânea, diabetes *mellitus* e cirrose hepática com excesso de ferro mantém-se actual, mas as manifestações clínicas da HH variam substancialmente. Desde uma acumulação em ferro clinicamente insignificante, passando por um estágio de sobrecarga de ferro sem o desenvolvimento de patologia,

até ao quadro de sobrecarga de ferro com as lesões típicas nos órgãos alvo, todos estes cenários são possíveis. Normalmente, o diagnóstico é efectuado no último estágio da doença em doentes do sexo masculino com mais de 40 anos e mais de 20g de depósitos de ferro.

**Geral:** fraqueza muscular, cansaço, diminuição da libido, perda de peso e anemia.

**Artropatia:** presente em 50 a 70% dos casos, é por vezes a única queixa durante muitos anos,<sup>39</sup> artrite sem causa aparente, osteoartrite no adulto jovem. É simétrica, mas pode ser unilateral comprometendo sobretudo a articulação do joelho mas também as metacarpo e inter-falângicas proximais (aperto de mão doloroso), punhos e intervertebrais. É o sintoma mais incapacitante para o doente.

**Insuf. Hepática:** dor abdominal, pigmentação bronzada ou cinza-azulada ocorre em mais de 75% dos casos (por impregnação de melanina e ferro na camada basal da epiderme e observável sobretudo nas axilas, cicatrizes, genitália, região inguinal, áreas expostas e mucosa oral), icterícia (pouco frequente), esplenomegália moderada, hepatomegália em 95% dos casos (por vezes com função hepática normal), aranhas vasculares, eritema palmar, ginecomastia, rarefação pilosa e atrofia testicular (por défice de gonadotrofinas e por insuficiência hipofisária). A cirrose é a causa de morte de 25% dos pacientes e o carcinoma hepatocelular em 30%.

**Insuf. Cardíaca:** I.C.C. e arritmias são a causa de morte de mais de 30% dos pacientes com siderose cardíaca.

**Insuf. Pancreática:** D.M. em 65%, normalmente com história familiar. É de aparecimento tardio e pode ter uma origem genética independente da lesão das células de *Langerhans* pelo ferro.<sup>40, 41</sup> É de mau prognóstico.

**Insuf. Suprarrenal, Hipopituitarismo, Hipotiroidismo e Hipoparatiroidismo:** são muito raros.

**Sintomas Neurológicos:** desorientação, depressão, fadiga opressiva e letargia, hipoacusia e desorientação, apesar de na hemocromatose não existir uma deposição anormal de ferro no sistema nervoso, excepto no plexo coroideu.<sup>42</sup> A patogénese deste fenómeno tem uma base complexa, mas o alívio da sintomatologia que pode ocorrer nalguns doentes durante as FT, indica a sua etiologia.

## 6. EVOLUÇÃO

Provavelmente, os doentes com concentrações aumentadas de calreticulina evoluirão mais tardiamente para cirrose e carcinoma hepatocelular. Aguardam-se os resultados de estudos já iniciados.

## 7. DIAGNÓSTICO

Idealmente, o diagnóstico e a intervenção terapêutica deverão ser efectuados antes da instalação do quadro de sobrecarga de ferro com lesões nos órgãos alvo, já que a remoção do ferro por FT previne a progressão para a lesão tecidual irreversível.

O diagnóstico baseia-se na demonstração do aumento da sobrecarga de ferro, sobretudo no aumento das concentrações hepáticas de ferro associadas a aumentos dos níveis de ferritina sérica. A HH é definida genotipicamente pela ocorrência familiar de sobrecarga de ferro, com homozigotia da C282Y ou heterozigotia C282Y/H63T.

A exclusão de outras causas conhecidas de sobrecarga de ferro, como a excessiva suplementação com ferro oral, alcoolismo, Porfíria Cutânea Tarda, regimes hipertransfusio-nais e Anemia Hemolítica deverá ser sempre efectuada.

O rastreio deve ser feito nos doentes de alto risco, como aqueles com envolvimento orgânico suspeito, história familiar de HH e naqueles em que os exames imageológicos ou bioquímicos sugiram anormalidades relacionadas com a possível sobrecarga de ferro.

### 7.1 Critérios de Diagnóstico

Ferritina: >250 ng/mL - ♂, e mulheres hysterectomizadas/após a menopausa; >150 ng/mL - ♀ (não grávida).

Muito raramente, a ferritina pode apresentar valores normais e já existir sobrecarga de ferro. Existe uma estreita relação entre a ferritina e os depósitos. A inflamação e o cancro podem provocar um aumento desta proteína de fase aguda, sem existir sobrecarga de ferro. Fibrose e cirrose raramente existem com ferritina <700ng/mL. É, provavelmente, o parâmetro mais útil na avaliação dos *stocks* hepáticos de ferro corporal, porque é aquele que demonstrou uma correlação mais significativa com este metal, para além de não ser um teste invasivo nem dispendioso.

Saturação Transferrina:  $\frac{\text{Ferro}}{\text{Transferrina} \times 1,25}$

- >62% - ♂ e >55% - ♀. Nos homozigóticos C282Y >45%.

- Em 2 determinações em jejum e sem suplementos de ferro/vitamina C há 24 horas e na ausência de outras causas conhecidas, sugere o diagnóstico de H durante um longo período em que o paciente é assintomático. É um teste de *screening* que revelou uma sensibilidade de 52% e uma especificidade de 90,8% no diagnóstico da homozigotia de C282Y<sup>43</sup>

Portador mutação Hs63Asp=H63D, no gene HFE (braço curto cr.6)

Heterozigótico/Homozigótico (aproximadamente 5% dos casos)

Portador da mutação Cys282Tyr = C282Y, no gene HFE Heterozigótico/Homozigótico (mais de 90% dos casos).<sup>37</sup>

Embora a mutação C282Y cause HH dado a penetrância incompleta, há uma pequena proporção de homozigóticos que não desenvolvem sobrecarga de ferro e portanto permanecerão assintomáticos e laboratorialmente inocentes, mesmo após os 60 anos. Existem casos de sobrecarga de ferro hepático que são indistinguíveis da HH e são negativos para a mutação C282Y do gene HFE. O estado de heterozigoto C282Y, mais em homens do que em mulheres, poderá causar sobrecarga de ferro sobretudo se o alelo mutante é herdado do pai.<sup>44</sup> Muitos doentes com Porfíria Cutânea Tarda têm lesões cutâneas que aliviam com FT e são também heterozigóticos para a mutação HFE.

**Biopsia hepática (BH):** a avaliação da concentração hepática de ferro por biopsia é o método quantitativo mais específico e sensível para determinar a sobrecarga de ferro.<sup>45</sup> É considerado o teste de diagnóstico definitivo para a sobrecarga de ferro, permite também a avaliação da quantidade de ferro e a análise da presença ou não de fibrose hepática/carcinoma hepato-celular. A determinação semi-quantitativa do grau dos depósitos de ferro e a diferenciação entre o ferro existente nas células de *Kupfer* e o dos hepatocitos é importante, tal como a identificação de um dos três estádios do grau de fibrose: sem fibrose, fibrose peri-portal e cirrose. Também permite avaliar de patologia coexistente ou de doenças que mascaram a hemocromatose.<sup>46</sup> Assim, apesar de ser o único método que nos estadia e avalia a progressão da doença, a sua realização tem indicações muito precisas, dado ser um exame invasivo não desprovido de riscos.

Os doentes que têm um diagnóstico de HH realizado por outros métodos, como a pesquisa da mutação do gene por PCR e que têm uma discreta probabilidade de apresentar fibrose hepática, podem não necessitar de BH. A presença de AST normal, ferritina sérica inferior a 1000ng/mL e a ausência de hepatomegália, traduz um valor preditivo negativo de fibrose de 100%.<sup>47</sup>

## 8. ATITUDES TERAPÊUTICAS, AS FLEBOTOMIAS TERAPÊUTICAS

### 8. 1 Mecanismo de Funcionamento

Pretende-se que as Flebotomias Terapêuticas provoquem um estado de anemia suportável para o doente, que origine um estado de avidez por ferro por parte da MO (para

compensar as perdas das FT) produzindo uma transferência de ferro dos depósitos nos órgãos-alvo para a medula, no sentido da eritropoiese. É neste desafio medular cuja consequência se traduz num desvio do metal que reside o seu efeito terapêutico, evitando assim a inexorável progressão para fibrose e insuficiência: hepática, cardíaca, pancreática, pituitária e hipofisária.

É o método mais simples, eficaz, fisiológico e menos dispendioso de remover o ferro do organismo.

### 8. 2 Metas Terapêuticas Clínicas

Ficou provado que na maioria dos doentes com HH, independentemente do seu genótipo, a implementação precoce de um adequado programa de FT diminui a sobrecarga de ferro do organismo, alivia significativamente a maior parte da sintomatologia, impede as complicações do excesso de ferro, previne o desenvolvimento de neoplasia hepática e promove uma longevidade normal.<sup>48</sup>

Enquanto que na HH o tratamento da sobrecarga de ferro é feito recorrendo sobretudo às FT, para a HS as opções terapêuticas são os quelantes de ferro.

Provavelmente, sempre que um doente com HH apresente concentrações normais de calreticulina, teremos que ser mais exigentes com as metas terapêuticas e o oposto também tem implicações, no sentido de podermos ser um pouco mais permissivos.

### 8. 3 Metas Terapêuticas Laboratoriais

- Saturação transferrina: <50%
- Ferritina <20ng/mL
- Hb: 11-12 g/dL; Htc: 38-40%; VGM: 80 fL<sup>49</sup>

### 8. 4 Abordagem Clínico-Laboratorial

#### 8. 4. 1 Parâmetros Laboratoriais Pré-flebotomia

- Hemograma
- Proteínas totais e albumina
- Ionograma
- Ferro
- Ferritina
- Saturação transferrina
- Glicemia
- T3, T4, TSH
- $\alpha$ -fetoproteína
- BBd e BBi
- AST e ALT
- Calreticulina

## 8. 4. 2 Critérios de Inclusão

- Ferritina :  $\geq 300$ ng/mL no ♂ e  $\geq 200$ ng/mL com ou sem sintomatologia
- Hb:  $> 14$ g/dL
- CP:  $> 125.000/\mu$ L
- K:  $> 3,8$ meq/L
- Proteínas totais:  $> 6$ g/dL
- ECG: s/alterações significativas
- VHC - /VHB -
- Calretilulina: valor  $< /$ ou normal

## 8. 4. 3 Critérios de Exclusão

- Idade inferior a 21 anos
- Gravidez
- Pacientes que requerem FT por outros motivos que não a sobrecarga de ferro, tal como a PV.
- Pacientes c/ sobrecarga de ferro: devida a outra causa que não a HH (i.e. infecção VHC, Porfíria Cutânea Tarda, D. Wilson, défice de alfa 1-anti-tripsina e alcoolismo).
- Calretilulina: eventualmente se detectar um valor superior ao normal

## 8. 5 Esquemas Terapêuticos

É importante sensibilizar o paciente para a adesão total ao programa de FT proposto.

Os esquemas terapêuticos devem ser individualizados e dependentes do *status* clínico-laboratorial do paciente. Distinguem-se 2 etapas:

**1.Fase Inicial:** esquema semanal (250mL vs 450mL), a rever ao fim de 6 meses, já que sangrias de 400-500mL removem 250mg de ferro e como deverão ser removidos 25 gramas ou mais de ferro, serão necessárias aproximadamente 100 flebotomias, o que demora de um a três anos. No adulto jovem com um menor depósito de ferro, 50 ou menos flebotomias podem ser suficientes. Quando a ferritina atingir o valor de 50ng/mL passa à fase de manutenção. O valor da ferritina constitui-se como o parâmetro mais fidedigno na monitorização das FT.

**2.Fase de manutenção:** após a remoção do excesso de ferro e no sentido de prevenir a reacumulação, FT de 3 em 3 meses ou sem sangrias se as dosagens seriadas da ferritina as contra-indicarem. As FT são retomadas sempre que a ferritina  $> 50$ ng/mL.

3.Provavelmente, os doentes que revelem um valor normal de calretilulina beneficiam de um maior número de FT

através de um esquema mais agressivo e precoce, com monitorização mais apertada, do que aqueles que têm a protecção da referida proteína.

## 8. 6 Predição do Número de Flebotomias Requeridas

O valor da ferritina pode ajudar-nos a esboçar um plano no que respeita ao número de flebotomias necessárias para induzir nestes doentes um estado de pré-anemia:  $< 500$ ng/mL, normalmente são necessárias menos de 10 FT; entre 500 e 1000 requer menos de 25 FT; e se  $> 1000$  requer o dobro.<sup>50</sup>

## 8. 7 Particularidades

- Se Hb  $< 11$ g/dL e/ou Htc  $< 33\%$ , trombocitopénia ou hipoproteinémia ( $< 6$ g/dL) espaçar as flebotomias. Está provado que nestes doentes a FT é menos eficiente em remover o ferro.

- Em pacientes com um baixo índice da massa corporal, que não toleram a flebotomia, com mais de 65 anos, ou ainda com complicações vasculares, efectuam-se flebotomias de 250mL com reposição isovolémica de soro fisiológico.

- Se hipertensão arterial e/ou sintomas compatíveis com insuficiência cardíaca (edema dos membros inferiores, dispneia), não efectuar reposição.

- Sensibilizar o paciente para uma hidratação adequada e abster-se de exercício físico intenso nas 24 horas seguintes, pois ajuda a minimizar os sintomas da hipovolémia e da anemia.

- Nos casos em que as flebotomias estão contra indicadas, administra-se a terapêutica quelante do ferro.

## 8. 8 Avaliação dos Resultados Obtidos/ Monitorização Terapêutica

- Hb: 11-12g/dL; Htc 35-40%
- VGM
- Ferritina
- Saturação transferrina
- Glicemia

Quando os pacientes apresentam valores de ferritina  $> 1000$ ng/mL pré-flebotomia, é suficiente efectuar determinações mensais ou de 2 em 2 meses nos primeiros meses de FT. Quando o valor se aproxima dos 100ng/mL e nos pacientes já muito flebotomizados, as determinações devem ser efectuadas de 2 em 2 FT.

Quando através da FT se consegue remover todo o ferro dos depósitos, o que normalmente surge é um valor da ST  $< 20\mu$ g/L. Contudo, dado que a ferritina é uma proteína de fase aguda, podemos ter um valor ainda elevado se existe inflamação.<sup>51</sup>

## 8.9 Factores Condicionantes

- Alcoolismo: abstinência alcoólica. O vinho tinto contém elevado teor em ferro, para além de aumentar o risco de evolução para carcinoma-hepatocelular em pacientes c/cirrose.
- Infecção VHB/VHC. A sobrecarga de ferro reduz a eficácia da terapêutica c/interferão.
- Tabagismo: interrupção tabagismo
- Está contra-indicada a terapêutica c/ doses >500mg/dia de vitamina C (> a absorção de ferro) e os suplementos vitamínicos contendo ferro e ou minerais como zinco e manganês.
- É desnecessária a proibição da ingestão de fruta e vegetais frescos. contendo vitamina C.
- A dieta pobre em ferro é desnecessária, para além de impossível de obter, apenas moderação no consumo de carnes vermelhas e fígado de porco
- A ingestão de elevadas quantidades de chá rico em taninos diminui a absorção de ferro.
- Calreticulina

## 8.10 Follow-up

- Quando as FT começam antes de existir um acúmulo importante de ferro, esta opção terapêutica previne as complicações resultantes da acumulação de ferro, como a cirrose hepática, o adenocarcinoma hepático 1º, a DM, o hipogonadismo, a patologia articular e a miocardiopatia.
- Se já existe sobrecarga de ferro, só a fadiga, a hepatoesplenomegália, a função hepática, a função pancreática e a hiperpigmentação regridem substancialmente.
- O hipogonadismo (e as suas consequências, como a esterilidade, a impotência sexual e a menopausa precoce), a hipertensão portal e a artropatia não desaparecem na totalidade, apesar da remoção total do excesso de ferro.
- Se a H 1ª/2ª cursa com alcoolismo, o paciente deverá ser monitorizado com doseamento da  $\alpha$ -fetoproteína de 6/6 meses e, se coexistir cirrose hepática, de 3 em 3 meses.

## 9. PROGNÓSTICO

A cirrose é a causa de morte de 25% dos doentes e o carcinoma hepatocelular de 30%.

Num futuro próximo, os resultados dos estudos envolvendo a calreticulina e a morbidade e mortalidade ajudarão a verificar se existe correlação entre o aumento da referida proteína protectora e uma maior sobrevivência.

## 10. O FUTURO: LINHAS DE INVESTIGAÇÃO E QUESTÕES

Brevemente estará disponível um teste que analisando os níveis de calreticulina, preveja quais os doentes com a mutação que irão ou não desenvolver a HH, estratificar o risco de desenvolvimento da doença e determinar a sua gravidade.

Quais são os factores que controlam os níveis de calreticulina? Por que razão os doentes com HH e exuberante sintomatologia têm níveis de calreticulina normais? O que inibiu a esperada produção compensadora de calreticulina? Por outro lado, que factor foi responsável, num doente com HH e assintomático, pelos elevados valores de calreticulina?

O interesse terapêutico da calreticulina em doentes com HH e concentrações normais da proteína.

## 11. CONCLUSÕES

Com um diagnóstico precoce de HH, observando os critérios de exclusão e inclusão dos doentes em tratamento, seguindo os mecanismos de acompanhamento e avaliação já definidos para obtenção das metas terapêuticas atrás referidas, é possível um controlo da doença, diminuindo a frequência e a gravidade da sobrecarga de ferro, uma melhoria da qualidade de vida e um aumento da sobrevivência, eliminando a morbidade e a mortalidade prematuras. O novo protagonista que surgiu na HH, a calreticulina, veio ajudar à compreensão de mecanismos fisiopatológicos básicos desta patologia e a sua inclusão nos critérios diagnósticos e na abordagem clínico-laboratorial das FT, vai permitir uma triagem mais diferenciada e profunda dos doentes a incluir no programa de FT, com óbvias vantagens nos resultados terapêuticos.

## CONCLUSÕES FINAIS

Os protocolos das FT são complexos e envolvem múltiplas patologias, mas a sua efectivação conduz seguramente a uma prescrição mais segura e eficaz das mesmas.

Deverão ser criados/revistos os *guidelines* orientadores das FT nomeadamente os critérios diagnósticos, os esque-

mas terapêuticos a adotar, a monitorização dos mesmos, as metas terapêuticas individualizadas e finalmente os mecanismos de avaliação dos resultados obtidos, tendo em conta os avanços científicos mais recentes, como a mutação do JAK2 V617F e a calreticulina. Longe de uma atitude redutora ou de minimização das abordagens anteriores, o objectivo *major* é estimular a discussão científica e produzir uniformização diagnóstica e terapêutica nestas áreas. E que outra razão mais interessante pode haver do que o papel emergente destes dois protagonistas?

Um desafio que se coloca a todos os Imuno-hemoterapeutas é a gestão da informação mais recente para a transformar em benefícios concretos para o doente. Compete-nos a descentralização do conhecimento científico pertinente para a clínica e conferir-lhe uma aplicação prática.

Daqui atrevo-me a lançar um repto para que num futuro próximo possamos efectuar a actualização dos guidelines de 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vaquez M.H.: Sur une forme spéciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante. CR Soc Biol, 44, 384-388, 1892.
2. Osler W.: Chronic cyanosis with polycythemia and enlarged spleen, a new clinical entity. Am J Med Sci, 126, 187-201, 1903.
3. Turk W.: Beitrage Zur Kenntnis des Symptonenbildes Plycythamie mit Milztmer und zyanose. Wien Klin Wocherschr, 17, 153, 1904.
4. Damesheck W: Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood, 6, 372-375, 1951.
5. Berk P.D., Goldberg J.D., Wasserman L.R.: Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on PVSG protocols. Semin Haematol., 23, 132-143, 1986.
6. Tartaglia A.P., Goldberg J.D., Wasserman L.R.: Adverse effects of antiaggregating platelet therapy in the treatment of polycythemia vera. Seminars in Hematology, 23, 172-176, 1986.
7. Berk P.D., Wasserman L.R., Goldberg J.: Treatment of polycythemia vera by the PVSG In: Wasserman L.R., Berk P.D., Berlin N.I, (Editors): Polycythemia vera and the myeloproliferative disorders; pp166. W.B. Saunders, Philadelphia, 1995.
8. Bartran C., Klein A., Hagenmeijer A.: Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of the Philadelphia chromosome in chronic myeloytic leukaemia. Nature, 306, 277-280, 1983.
9. Druker B.J, Talpaz M., Resta D.J.: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR/ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. New England Journal Medicine, 344, 1031-1037, 2001.
10. C. James, V. Hugo, J.P. Le Couedic, Vainchenker W.: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. Nature, 434 (7037), 1144-1148. 2005.
11. Teffery Ayalew, Thiele Juergen, Barbui Tiziano, Barosi Giovanni, Vannuchi Alessandro, Finazzi Guido, Bloomfield Clara and Wardiman James: Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. Blood, 110, 1092-1097, 2007.
12. Pietra Daniela, Sai Li, Cazzola Mário: Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 V617F negative myeloproliferative disorders. Blood, 111 (3), 1686-1689, 2008
13. Cazzola Mário, Passamonti Francesco: Not just clonal expansion of hematopoietic cells, but also activation of their progeny in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. The hematology journal, 92 (2), 159-161, 2006.
14. Baxter E.J., Scott L.M., Erber M.A. *et al*: Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet, 365, 1054-1061, 2005.
15. Patel R.K, Lea N.C, Heneghan M.A.: Prevalence of the activating JAK2 tyrosine Kinase mutations V617F in the Budd Chiari syndrome. Gastroenterology, 130, 2031-2038, 2006.
16. Reinhart Walter: The influence of iron deficiency on erythrocyte deformability. British Journal of Haematology, 80, 550-555. 1992.
17. Landolfi R., Marchioli R., Kutti J.: Efficacy and safety of low dose aspirin in polycythemia vera. New England Journal Medicine, 350, 114, 2004.
18. Bircher A.J.: Water induced itching. Dermatologica, 181:83, 1990.
19. Gilbert H.S., Warner R.P., Wasserman L.R.: a study of histamine in myeloproliferative disease. Blood, 28, 795, 1966.
20. Swerlick R.A.: Photochemotherapy treatment of pruritus associated with polycythemia vera. LAn Acad Dermatol, 13, 675, 1985.
21. Foa P., Massaro P., Caldiera S.: Long-term therapeutic efficacy and toxicity of recombinant interferon-alfa 2a in polycythemia vera. Eur J Haematol., 60, 273, 1998.
22. Wolf J.T., Hendricks D.W., Egger R.C.: Alpha-interferon for intractable pruritus in polycythemia vera. Lancet, 337, 241, 1991.
23. Barbui Tiziano, Finazzi Guido: Evidence-based management of polycythemia vera. Best Practice & Research Clinical Hematology, 19, 483-493, 2006.
24. Finazzi Guido, Caruso Vanessa, Tiziano Barbui: Acute leukemia in polycythemia vera: an anlysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. Blood, 105 (7), 2664-2670, 2005.
25. Finazzi Guido, Tiziano Barbui: How I treat patients with polycythemia vera. Blood, 109, 12., 5104-5111, 2007.
26. Elliot A., Tefferi A.: Thrombosis and haemorrhage in polycythemia vera and essential trombocithaemia. Br J Haematology, 128, 275-290, 2004.
27. Morgan Kelly, Gilliland Gary: A role for JAK2 Mutations in Myeloproliferative Diseases. Annu Rev Med, 59, 213-222, 2008.
28. Kohtaro Toyama, Nojima Yoshihisa, Tsukamoto Norifumi: JAK2 V617F mutation analysis of granulocytes and platelets from pa-

- tients with chronic myeloproliferative disorders: advantage of studying platelets. *British Journal of Haematology*, 139, 64-68, 2007.
29. Geron Ifat, Teffery Ayalew, Catriona Jamieson. Selective Inhibition of JAK2-Driven Erythroid Differentiation of Polycythemia Vera Progenitors. *Cancer Cell*, 13, 321-330, 2008.
  30. Wernig Gerlinde, Kharas Michael G., Tefferi Ayalew: Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2 V617F induced Polycythemia Vera. *Cancer Cell*, 13, 311-320, 2008
  31. Li Zhe , Xu Mingjiang, Joe Zhao Zhizhuang: Erlotinib effectively inhibits JAK2 V617F activity and polycythemia vera cell growth. *J Biol. Chem.*, 282, 3428-3432, 2007.
  32. Verstovsek S., Manshour Taghi, Estrov Zeev: WP1066, a novel JAK2 inhibitor, suppresses proliferation and induces apoptosis in erythroid human cells carrying the JAK2 V617F mutation. *Clinical Cancer Research*, 14, 788-796, 2008.
  33. Di Nisio M., Barbui T, Vannucchi AM, Marchioli R: The haematocrit and platelet in polycythemia vera. *Br J Haematol*, 136 (2), 249-259, 2007.
  34. Staerk J., Kallin A., Vainchenker W.: JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathologie Biologie*, 15, 88-91, 2007.
  35. Pinto Jorge, Porto Graça , Sousa Maria: Protective role of calreticulin in HFE hemochromatosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 44, 99-108, 2008.
  36. Arosa Fernando, Jesus Orlando, Porto Graça, Carmo Alexandre, Sousa Maria: Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with Major Histocompatibility Complex Class I molecules. *J Biol Chem*, 274 (24), 16917- 16922, 1999.
  37. Crawford D.H., Jazwinska E., Cullen L.M., Powell L.W.: Expression of HLA-linked hemochromatosis in subjects homozygous or heterozygous for the C282Y mutation. *Gastroenterology*, 114, 1003-1008, 1998.
  38. Anand S., Schade R.R., Bendetti C.: Idiopathic hemochromatosis and alfa-1-antitripsina deficiency: coexistence in a family with progressive liver disease in the proband. *Hepatology*, 3, 714-718, 1983.
  39. Edwards C.Q., Cartwright G.E., Amos D.B.: Homozygosity for hemochromatosis: clinical manifestations. *Ann Intern. Med*, 93, 519-525, 1980.
  40. Adams P.C, Moirand R, Brissot P.: The relationship between iron overload, clinical symptoms, and age in 410 patients with genetic hemochromatosis. *Hepatology*, 125, 162-166, 1997
  41. Adams P.C, Valberg L.S.: Evolving expression of hereditary hemochromatosis. *Sem Liver Dis*, 16, 47-54, 1996.
  42. Sheldon J.H. *Haemochromatosis*. London: Oxford University Press, 1935
  43. Beutler E., Vincent F., Terri G., Ngoc H.: The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Ann Intern Med.*, 135 (5), 329-337, 2000.
  44. Adams P.C., Campion M.L., Gandon G.: Clinical and family studies in genetic hemochromatosis. *Hepatology*, 26, 986-990, 1997.
  45. Kushner J.P., Porter J.P., Olivieri N.F.: Secondary iron overload. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 47-61, 2001.
  46. Witte David L., Crosby William H., Mitros Frank A.: Hereditary hemochromatosis. *Clinica Chimica Acta*, 245, 139-200, 1996.
  47. Guyader D., Jacquelinet C., Moirand R., Turlin B., Chaperon et al: Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology*, 115, 929-936, 1998.
  48. Niederau C., Ficsher R., Purschel A., Strohmeyer G.: Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*, 110, 1107-1119, 1996.
  49. Bolan C.D., Conry-Cantilena C., Mason G., Leitman S.F.: MCV as a guide to phlebotomy therapy for hemochromatosis. *Transfusion*, 41, 819-827, 2001.
  50. Finch C.A. : Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. *West J Med*, 145, 657-663, 1986.
  51. Cook J.D.: Clinical evaluation of iron deficiency. *Semin. Hematol*, 19, 6-18, 1982.

---

AUTOR: Teresa Gordalina Sousa Guerreiro, Assistente Hospitalar de Imuno-Hemoterapia.

*Correspondência:* Dr<sup>a</sup> Teresa Gordalina Sousa Guerreiro, Serviço de Imuno-Hemoterapia, Hospital Prof. Dr. Fernando da Fonseca, Sítio da Venteira, IC 19, 2720-276 Amadora (Portugal).