



UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA** FACULDADE  
DE  
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA– TRABALHO FINAL

JOAO DAVID RODRIGUES DIONISIO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE SOBRECARGA DE FERRO E OSTEOPOROSE EM  
DOENTES COM BETA TALASSÉMIA INTERMÉDIA**

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE HEMATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DOUTORA TABITA MAGALHÃES MAIA

PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO ANTUNES CRUZ RIBEIRO

ABRIL/2019



## TABELA DE CONTEÚDOS

RESUMO .....	4
PALAVRAS-CHAVE .....	4
<i>ABSTRACT</i> .....	5
<i>KEYWORDS</i> .....	5
INTRODUÇÃO .....	6
OBJETIVO .....	8
MATERIAL E MÉTODOS .....	9
RESULTADOS .....	11
DISCUSSÃO .....	15
LIMITAÇÕES .....	19
CONCLUSÃO .....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21

## RESUMO

A beta talassémia intermédia é uma anemia hemolítica crónica que, apesar de não ser dependente de transfusões, tem várias complicações que afetam a morbimortalidade dos doentes, sendo duas das mais comuns a sobrecarga de ferro e a osteoporose. Nesse sentido, o propósito deste trabalho foi o de estudar a possível associação entre a sobrecarga de ferro e a osteoporose e avaliar se um melhor controlo do metabolismo do ferro tem algum efeito na preservação da massa óssea.

Analisaram-se, retrospectivamente, os dados de 17 doentes com beta talassémia intermédia. Os dados recolhidos incluem idade, género, parâmetros analíticos médios, concentração hepática e cardíaca de ferro (CHF e CCF, respetivamente) medidas por ressonância magnética nuclear em T2\*, marcadores do metabolismo ósseo, parâmetros para implementação de regime de transfusão, quelação de ferro e tratamento para osteopenia/osteoporose. A densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar, colo do fémur e fémur total foi medida por absorciometria de raio-X de dupla energia em, pelo menos, duas medições longitudinais.

A sobrecarga de ferro foi detetada em 52% (n=9) dos doentes, com prevalências de siderose hepática e cardíaca de 47% (n=7) e 12% (n=2), respetivamente. A osteoporose foi diagnosticada em 8 casos (47%), sendo que os doentes com sobrecarga de ferro apresentam uma prevalência superior relativamente aos que não têm sobrecarga de ferro (62,5% *versus* 37,5% respetivamente) e uma maior perda óssea ( $p=0.041$ ). O tratamento com quelação de ferro, bifosfonatos, vitamina D com ou sem cálcio, não apresentou efeito estatisticamente significativo na perda de massa óssea.

Em conclusão, a sobrecarga de ferro é uma condição que afeta a maioria dos doentes com beta talassémia intermédia e que nesta população, ao longo do tempo, os com sobrecarga de ferro são os que evidenciam a maior perda óssea o que pode indiciar que, a longo prazo, esta condição tem um peso importante no desenvolvimento e evolução da osteoporose.

## PALAVRAS-CHAVE:

Beta talassémia intermédia, Sobrecarga de ferro, Osteoporose, Densidade óssea, quelação do ferro

## **ABSTRACT**

Beta thalassemia intermedia is a chronic hemolytic anemia that, despite not being transfusion dependent, has several complications that affect its morbidity and mortality in patients, two common ones being iron overload and osteoporosis. Thus, the aim of this study was to study the possible relationship between iron overload and osteoporosis and to evaluate if a better management of iron metabolism has any effect in minimizing bone mass loss over time.

Data from 17 patients with beta thalassemia intermedia was retrospectively analyzed. Collected data included age, gender, median analytical parameters, liver and cardiac iron concentration (LIC and CIC, respectively) measured by nuclear magnetic resonance in T2\*, markers of bone metabolism, parameters for implementation of the transfusion regimen, iron chelation therapy and treatment for osteopenia/osteoporosis. Bone mineral density (BMD) of the lumbar spine, femoral neck and total femur were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) in, at least, two longitudinal measurements.

Iron overload was detected in 52% (n=9) of patients, with hepatic and cardiac siderosis prevalence of 47% (n=7) and 12% (n=2), respectively. Osteoporosis was diagnosed in 8 cases (47%), patients with iron overload had a greater prevalence relative to those not overloaded (62.5% versus 37.5% respectively) and greater bone loss over time ( $p=0.041$ ). Iron chelation therapy, treatment with bisphosphonates, vitamin D with or without calcium, didn't show a statistically significant effect on bone loss.

In conclusion, iron overload is a condition that affects most of beta thalassemia intermedia patients and that in this population, over time, those with iron overload show an accelerated bone loss, which may indicate that, in the long term, this entity plays a significant role in the development and evolution of osteoporosis.

## **KEYWORDS:**

Thalassemia intermedia, iron overload, osteoporosis, bone mineral density, iron chelation

## INTRODUÇÃO

As talassémias são dos distúrbios genéticos hereditários mais comuns mundialmente (1). Estima-se que existam cerca de 80 milhões de indivíduos portadores de mutações beta talassémicas. Estas apresentam uma distribuição heterogénea mundialmente, sendo mais comum em regiões como o continente africano, sudoeste asiático e a região mediterrânea (2). Em Portugal, a prevalência é mais alta do que a média do continente europeu podendo atingir os 2% (3). A distinção entre fenótipos talassémicos é feita, habitualmente, pela clínica: num dos extremos fenotípicos temos os portadores, que por definição são assintomáticos, apresentando uma anemia ligeira hipocrómica e microcítica (talassémia minor) e no extremo oposto os doentes com anemia hemolítica severa transfusão dependentes com complicações graves (talassémia major). Entre estas duas entidades surgem as talassémias intermédias - anemias hemolíticas não dependentes de transfusões, (NTDT) (4) que, em contextos clínicos específicos (stress fisiológico, gravidez, infeção, cirurgia), podem necessitar de transfusões (4–7). Genotipicamente, além de existir uma enorme variabilidade de mutações para o gene beta ( $\beta^0/\beta^+$  leve;  $\beta^+$  leve/  $\beta^+$ ,  $\beta^+$  leve/  $\beta^+$  leve,  $\beta^0/\beta^+$  silenciado,  $\beta$  talassémia dominante, entre outros), existem fatores moduladores de fenótipo que contribuem para a heterogeneidade fenotípica das talassémias intermédias: alterações das cadeias  $\alpha$  ( $\beta^0/\beta$  ou  $\beta^+/ \beta$  com triplo/tetra  $\alpha$  e  $\alpha$  talassémia/ $\beta$  talassémia) e a produção eficaz de cadeias  $\gamma$  em genótipos de beta talassémia major. O ponto comum fisiopatológico é o desequilíbrio entre a produção das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  globínicas (8). As cadeias  $\alpha$  não emparelhadas precipitam, o que leva a morte prematura dos eritrócitos, conduzindo a uma eritropoiese ineficaz, anemia hemolítica crónica e sobrecarga de ferro (9).

O ferro é um nutriente com funções biológicas essenciais, tendo um papel crucial na hemoglobina e outras proteínas, no stresse oxidativo e na resposta imunológica. Nos doentes com beta talassémia, a eritropoiese ineficaz e a hipóxia condicionam uma diminuição inapropriada dos níveis de hepcidina e um aumento da absorção entérica de ferro (10,11), gerando um balanço positivo interno. O ferro, quando em concentrações elevadas, esgota os recetores de transferrina com o conseqüente aumento de ferro lábil no plasma (NTBI) que tem uma grande capacidade de gerar espécies reativas de oxigénio, altamente tóxicas a nível celular. Esta situação, em conjugação com a incapacidade do organismo excretar ferro de forma ativa (9,12) gera depósitos férricos dispersos, condição denominada como sobrecarga de ferro. Os depósitos férricos surgem em vários órgãos, sendo os mais frequentemente afetados nas NTDT's o fígado, coração, osso, pâncreas e hipófise (13–15), pelo que parte destes doentes entra em regimes de quelação para evitar as complicações da sobrecarga de ferro, que nestes casos é

independente das transfusões.

A etiologia da doença óssea em indivíduos com beta talassémia intermédia ainda está pouco estabelecida, sendo que um dos pilares da investigação é a sobrecarga de ferro. Do ponto de vista histórico, nas talassémias major as deformações ósseas graves eram muito comuns, mas a introdução de transfusões regulares e a quelação do ferro permitiu um melhor controlo dos níveis de hemoglobina circulante e uma redução da eritropoiese extra medular, levando assim a uma redução destes casos mais graves(12). Nas NTD's, essas complicações são menos frequentes, no entanto, com o aumento da esperança de vida destes doentes começam a surgir outras complicações, nomeadamente ósseas que vão desde a diminuição da densidade mineral óssea (DMO) até à compressão medular com dor óssea (por eritropoiese extra medular) e aumento do risco de fraturas (16–20). Num estudo *in vitro*, o ferro foi associado a um aumento na diferenciação dos osteoclastos (21) por indução dos recetores da transferrina 1 e do fator nuclear  $\kappa$  B (RANKL) e, concomitantemente, esteve associado a um aumento do stress oxidativo com produção de espécies reativas de oxigénio, que diminuem a osteoblastogénese (22,23).

A população portuguesa com beta talassémia intermédia, atendendo às suas particularidades epidemiológicas e genéticas (3,24), encontra-se por caracterizar, desconhecendo-se a prevalência da sobrecarga de ferro, osteoporose e outras complicações ósseas. O presente estudo pretende analisar se nos doentes com beta talassémia intermédia a alteração do metabolismo do ferro existente nestes doentes se associa à osteoporose e se o seu controlo adequado tem influência na perda de massa óssea.

## **OBJETIVO**

Com a realização deste estudo pretende-se avaliar a correlação entre a doença óssea e a sobrecarga de ferro na população portuguesa com beta-talassémica intermédia, e se a sobrecarga de ferro contribui para o aumento das complicações ósseas bem como o efeito de um correto esquema de quelação de ferro na não progressão da perda de massa óssea.

Pretendemos ainda analisar a possível relação entre os parâmetros de controlo transfusionais, de quelação e de sobrecarga férrica e as complicações associadas à disfunção do metabolismo ósseo, como a osteoporose, fraturas e histórico de dor óssea.

Esperamos com este trabalho contribuir para a melhor compreensão do papel da sobrecarga de ferro no aumento das complicações ósseas, permitindo uma melhor compreensão da evolução desta doença, bem como, de que forma um controlo ótimo da sobrecarga de ferro poderá revelar-se uma estratégia de prevenção e tratamento eficaz.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo no qual foram considerados para avaliação todos os doentes com diagnóstico de beta talassémia intermédia seguidos na consulta de Patologia do Glóbulo Vermelho do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Relativamente a critérios de exclusão, considerou-se a ausência de controlo de densidade mineral óssea (doentes com menos de 16 anos e grávidas), a existência de condições médicas envolvendo o metabolismo ósseo como o hipogonadismo e hipoparatiroidismo, casos que continham menos de 2 medições de densidade mineral óssea, não seguindo as orientações estabelecidas que implicam medições a cada 2 anos.

Os dados colhidos do registo de consulta e base de dados do serviço incluem idade, género, raça, peso, mutação do gene da beta globina, idade do diagnóstico, anos de seguimento, histórico e motivo de implementação de um regime de hipertransfusão. Em termos analíticos foi avaliado o valor médio de hemoglobina (g/dl), número de reticulócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ), bilirrubina total ( $\mu\text{mol/l}$ ), ferritina (ng/ml) e LDH (U/L) nos últimos 5 anos, assim como os valores atuais da vitamina D (ng/ml), cálcio (mmol/l), fósforo (mmol/l) e ferritina (ng/ml).

A sobrecarga férrica nestes doentes foi avaliada por ressonância magnética nuclear hepática em T2\*, expressa em mg/g de peso seco que, por limitações na metodologia da medição tem um valor máximo de 20 mg/g de peso seco e através da medição da ferritina média expressada em ng/ml. Com base nestes dados, a população em estudo foi dividida em dois grupos distintos, os que apresentavam e os que não apresentavam sobrecarga de ferro. Foram considerados com sobrecarga de ferro os casos em que houvesse uma concentração hepática de ferro (CHF)  $\geq 5$  mg/g de peso seco ou, na ausência desta medição, quando duas determinações de ferritina disparem no tempo forem  $>800$  ng/ml (22,23). Os doentes foram ainda divididos em quelação ótima ou não ótima. Quelação ótima foi definida como ferritina média em regime de quelação  $\leq 800$  ng/ml ou atingindo critérios de suspensão de quelação (CHF  $< 3$  mg/g de peso seco) ou ferritina média em quelação  $<500$  ng/ml (4). Também foi avaliada a siderose cardíaca, medida por ressonância magnética nuclear cardíaca em T2\*, expressa em ms e definida como positiva quando inferior a 20ms, em concordância com estudos anteriores (25,26).

Relacionado com a terapia quelante de ferro foi avaliado o motivo e idade de início, qual o fármaco e dose deste, a ferritina de início e média durante tratamento. Também foi reportado se houve suspensão e a razão desta.

A Densidade mineral óssea (DMO) foi medida a nível lombar (L1-L4), colo do fémur

e fémur total por absorciometria de raio-X de dupla energia (DEXA) usando protocolos *standard*. Os valores de DMO são expressos em Z-score. Este último é expresso pelo número de desvios padrão (DP) acima ou abaixo da média para a mesma idade e gênero. Osteoporose foi definida como um Z-Score < -2 em pelo menos um dos locais avaliados (19) nas várias medições e foram considerados perdedores de massa óssea aqueles cujo Z-score agravasse, ou seja, se a diferença entre medições fosse negativa. Foi igualmente recolhido o histórico de fraturas ósseas e de dor óssea. Por fim, foi registada a suplementação com bifosfonatos, vitamina D ou vitamina D com cálcio bem como as idades de início.

As análises descritivas são expressas como médias com desvio padrão, variâncias ou percentagens. As comparações das médias entre populações foram testadas através do teste t de *student* ou teste U de Mann Whitney para variáveis de distribuição normal e não-normal. A associação entre variáveis foi avaliada com recurso aos coeficientes de correlação de Pearson. Todos os testes estatísticos foram elaborados com um intervalo de confiança de 95%, ou seja, foi considerado significativo um valor de  $p$  igual ou inferior a 0,05, com uso do programa Jamovi® versão 0.9.5.12 para Windows.

## RESULTADOS

### 1. Caracterização da população estudada

A população em estudo inclui 17 doentes com o diagnóstico de beta talassémia intermédia (10 mulheres, 7 homens), idade média de  $51 \pm 12,4$  (intervalo 28-69). A média de anos de seguimento foi de 20 (intervalo 6-35). Nos doentes com mutação registada ( $n=14$ ) constam: homocigóticos para mutação  $\beta$  globina, sendo a mutação mais comum a IVS 1.6 ( $n=10$ ) e CD90 ( $n=1$ ); heterocigotos  $\beta$  dominantes com mutação beta CD106 (-T) ( $n=2$ ); heterocigota do gene  $\beta$  IVS1.110 com triplicação  $\alpha$  ( $n=1$ ).

Dos 17 casos avaliados, 9 (52%) apresentavam pelo menos um dos critérios de sobrecarga de ferro sendo que nestes, em média a CHF foi de  $11,9 \pm 6,38$  mg/g de peso seco estimado e a ferritina média de  $778 \pm 1211$  ng/ml. Os indivíduos que não tinham indicadores de sobrecarga de ferro tinham CHF média de  $2,59 \pm 1,18$  mg/g de peso seco e uma ferritina média de  $410 \pm 601$  ng/ml. Siderose hepática foi detetada em 7 (47%) indivíduos e siderose cardíaca em 2 casos (12%). Verificou-se uma correlação significativa positiva fraca entre a CHF e a ferritina média sérica ( $r=0,455$ ,  $p=0,038$ ), mas não significativa entre a CHF e CCF ( $r=0,427$ ,  $p=0,099$ ), sendo que a idade apresenta uma correlação moderada com a ferritina média ( $r=0,530$ ,  $p=0,017$ ), mas não significativa com o CHF ou CCF.

Em relação aos parâmetros analíticos, observamos várias diferenças entre os grupos com e sem sobrecarga de ferro. Os doentes com sobrecarga de ferro são mais novos e constituem o grupo com uma hemoglobina, LDH e vitamina D média inferiores. Por outro lado, na população sem sobrecarga foram detetados valores inferiores de reticulócitos, bilirrubina total, cálcio e fósforo séricos (Tabela 1). Apenas a ferritina evidenciou diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,033$ ). A siderose cardíaca foi detetada em 2 casos avaliados, sendo o CCF médio da população de  $35,2 \pm 10,5$  (22-66) ms. De salientar que 97% dos indivíduos apresentam um défice de 25-hidroxivitamina D, valor médio de  $22,1 \pm 9$  (9,40-49,6) ng/ml. Os dados clínicos dos 2 grupos de doentes (com e sem sobrecarga de ferro) são apresentados na Tabela 1.

Regimes de hipertransfusão estavam prescritos em 5 (29%) dos casos. O número médio de unidades de glóbulos vermelhos é de  $14,8 \pm 8,76$  (3-24) U/ano. Os motivos para início deste tipo de terapêutica são a anemia sintomática ( $n=2$  - 40%), seguindo-se a disfunção cardíaca ( $n=1$  - 20%), eritropoiese extra medular ( $n=1$  20%) e a úlcera maleolar ( $n=1$  - 20%). Destes, 50% encontravam-se com sobrecarga de ferro, existindo uma correlação positiva significativa fraca entre a CHF e o número de unidades transfundidas por ano ( $r=0,439$ ,  $p=0,004$ ).

**Tabela 1. Características clínicas e analíticas dos doentes com sobrecarga de ferro e sem sobrecarga de ferro.**

	<b>Com Sobrecarga de Ferro (n=9)</b>	<b>Sem Sobrecarga de Ferro (n=8)</b>	<b>p</b>
<b>Idade (anos)</b>	49,7±14,7	52,8±9,18	0,617
<b>Hemoglobina média (g/dl)</b>	8,16±1,08	8,70±1,01	0,302
<b>Reticulócitos médios (N= 50-100x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	300±314	238±194	0,635
<b>Bilirrubina total média (N&lt;22 µmol/l)</b>	33.9±18,4	51±24	0,118
<b>Ferritina média (N=21- 275 ng/ml)</b>	1121±1260	211±82,8	<b>0.033</b>
<b>LDH médio (N= 125-220 U/L)</b>	288±170	298±104	0,887
<b>25-hidroxivitamina D (N= 30-100 ng/ml)</b>	18,80±4,95	25.80±11,3	0,112
<b>Cálcio (N= 2,2 a 2,6 mmol/l)</b>	2,45±0,21	2,38±0,08	0.599
<b>Fósforo (N= 0,8-1,4 mmol/l)</b>	1,24±0,32	1,19±0,15	0,678
<b>CHF (mg/ g de peso seco)</b>	11±6,10	2,43±1,15	<b>&lt;0,001</b>

No que diz respeito a fraturas ósseas e dor óssea, foram apenas registados 2 casos de fratura óssea e 3 casos de dor óssea, ocorrendo uma prevalência de 12% e 18%, respetivamente. Não se verificou uma relação significativa entre o histórico de fraturas e dor óssea com a idade ou com o género.

## **2. Sobrecarga de ferro e Osteoporose**

Na população estudada, a osteoporose foi diagnosticada em 8 doentes (47%): 6 indivíduos (35%) com Z-scores <-2 lombares, 3 (17,6%) com Z-scores <-2 no fémur total, e 2 doentes (12%) com Z-scores <-2 colo fémur. 1 doente tinha osteoporose em todos os locais medidos e 1 doente tinha na medição lombar e fémur total. Nos indivíduos com sobrecarga de ferro foi diagnosticada osteoporose em 62,5%, mais frequente do que nos 37,5% sem

sobrecarga. Os doentes com sobrecarga de ferro têm consistentemente valores inferiores de DMO, mas a diferença não se mostrou estatisticamente significativa (Tabela 2). Nesta população não foram encontradas correlações significativas entre idade e CHF com os Z scores, do mesmo modo não foram detetadas diferenças estaticamente significativas entre o género e a presença de osteoporose. As prevalências por local de estudo (coluna lombar, colo do fémur e fémur total) podem ser observadas na Tabela 3 sendo que as prevalências são superiores nos doentes com sobrecarga de ferro, exceto para a medição do colo do fémur.

**Tabela 2. DMO lombar, colo femoral e femoral total e p entre grupos.**

<b>Z score</b>	<b>Sobrecarga de Ferro (n=9)</b>	<b>Sem Sobrecarga de Ferro (n=8)</b>	<b>p</b>
Lombar	-1,64±1,41	-1.05±1,39	0,331
Colo Fémur	-1,18±0,74	-0,64±0,99	0,295
Fémur Total	-1±0,98	-0,43±1,29	0,415

**Tabela 3. Percentagem de osteoporose nos doentes com e sem sobrecarga de ferro.**

<b>DMO Z score&lt;-2</b>	<b>Sobrecarga de Ferro, %(n)</b>	<b>Sem sobrecarga de Ferro, %(n)</b>
Lombar	<b>44,4 (4)</b>	<b>25 (2)</b>
Colo fémur	<b>11,1 (1)</b>	<b>12,5 (1)</b>
Fémur Total	<b>22,2 (2)</b>	<b>12,5 (1)</b>

A perda de massa óssea (MO) foi observada em 7 doentes (41%). Dos doentes que perderam massa óssea, 71% (n=5) têm critérios de osteoporose. Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a perda óssea e a sobrecarga de ferro ( $p=0.041$ ), sendo maior a perda óssea nos indivíduos com sobrecarga. A CHF correlacionou-se inversamente com a perda de massa óssea ( $r=-0,664$ ,  $p=0.007$ ).

Não foi possível encontrar correlações entre os índices bioquímicos de metabolismo ósseo e os Z scores obtidos, nomeadamente a PTH, TSH, 25-hidroxivitamina D, cálcio e fósforo nesta população.

### 3. Quelação ótima, suplementação óssea e perda de massa óssea

Todos os indivíduos da população em estudo realizaram, em algum momento do seu acompanhamento em consulta, quelação de ferro. No entanto só 8 (47%) mantêm o seu uso. Desses, 6 encontram-se a fazer deferassirox (Exjade®), 1 a fazer deferoxamina e 1 a fazer deferiprona e deferoxamina. Em média encontram-se a fazer tratamento há  $6,38 \pm 4,96$  anos (2-17). A dose mais comum no quelante mais utilizado (deferassirox) é de 10 mg/kg/dia- sendo a média de 10,25 mg/kg/dia (5,5-15). Reações adversas da quelação foram encontradas em 3 casos (37,5%), um que obrigou a troca de terapêutica, mas os restantes apenas levaram a um ajuste de dose: 1 com alterações da função hepática e 1 com complicações gastrointestinais.

No caso dos doentes que não se encontram a fazer quelação atualmente, a razão mais comum para paragem foi, maioritariamente, o controlo férrico otimizado em 7 casos (77%), e em apenas 1 caso por toxicidade renal e outro por agranulocitose.

Em 76% dos casos verificaram-se os critérios de quelação ótima, havendo osteoporose em 43% destes. Nos que não apresentavam quelação ótima, 12% apresentava ferritina durante quelação superior a 800 mg/dl e 12% CHF > 3 mg/g de peso seco. Nestes foi encontrada osteoporose em 55% dos casos. Quanto aos valores de DMO, os doentes com quelação ótima têm valores mais baixos, mas não foi possível encontrar diferenças significativas entre populações. Os resultados figuram na Tabela 4.

**Tabela 4. DMO lombar, colo fémur e fémur total (média±DP) em doentes com e sem quelação ótima.**

Z score	Quelação ótima (n=7)	Sem Quelação ótima (n=10)	p
Lombar	-1,84±1,79	-0,956±0,90	0,215
Colo Fémur	-1,16±1,12	-0,725±0,75	0,416
Fémur Total	-1,10±0,98	-0,411±0,82	0,245

No que se refere à perda óssea, fomos analisar o efeito que a otimização da quelação tem na evolução da massa óssea, não se encontrando uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0,08$ ), ainda que próximo da significância.

No presente estudo, 6 doentes (35%) encontravam-se a fazer bifosfonatos, 9 (53%) estavam a fazer vitamina D, 5 dos quais também cálcio. De referir que 2 indivíduos (11%) estavam a fazer tanto bifosfonatos como vitamina D. A alteração da massa óssea não evidencia uma diferença estatisticamente significativa com a toma destes suplementos,  $p=0,768$  para os bifosfonatos e  $p=0,602$  para a toma de vitamina D.

## DISCUSSÃO

Em Portugal existe uma elevada prevalência de doentes homozigóticos para a mutação IVS 1.6 (também denominada de talassémia intermédia de tipo português), que se sabe que têm características clínicas e hematológicas distintas (24). Os doentes não dependentes de transfusões são um desafio para o clínico por apresentarem um espectro fenotípico muito alargado, necessitando, por isso, de uma abordagem individualizada. As complicações nestes indivíduos podem ser tão graves como nas formas major da doença, mas, como surgem normalmente de uma forma mais insidiosa, podem passar despercebidas, atrasando o tratamento. O facto de a sobrecarga de ferro nas NTDT não ser dependente do volume transfusional faz com o clínico esteja menos alerta para a sua evidência e, conseqüentemente, para as suas complicações que aumentam significativamente a morbimortalidade destes doentes.

Existe, em Portugal, uma falta de dados relativamente à prevalência da talassémia intermédia e da sobrecarga de ferro a ela associada. Neste estudo a prevalência foi de 52% (n=9). A siderose hepática e cardíaca foi observada em 47% (n=7) e 12% (n=2) dos casos, respetivamente, algo muito inferior ao estudo em doentes brasileiros que encontrou taxas de incidência de 92% e 36% (26). Esta diferença pode resultar de diversos fatores como o tratamento mais agressivo na nossa população (com ajuste de “cut-offs” de paragem de quelação adaptados às características das talassémias de tipo português – trabalho em preparação para publicação), melhor acesso aos serviços de saúde, maior adesão à terapêutica ou ainda ser atribuída ao tamanho reduzido da nossa amostra. Contrastando com estudos anteriores (27,28) não foi possível estabelecer uma relação entre a idade e a prevalência destas complicações, isto pode ser devido ao início precoce (a partir dos 10 anos) da vigilância de atingimento orgânico preconizada no centro que leva a que os doentes não sejam “naïves” ao tratamento em idades avançadas. Este resultado deve sugerir que a sobrecarga de ferro e as sideroses devam ser estudadas de forma sistemática nesta população, mesmo em doentes jovens, no sentido de maximizar a sua deteção precoce.

Os doentes com beta talassémia intermédia têm uma predisposição para a sobrecarga de ferro, não dependente do volume transfusional. A primeira questão a considerar será como avaliar a sobrecarga de ferro nestes doentes de forma precisa. As variações de ferritina sérica são úteis para a monitorização da terapêutica de quelação implementada nestes doentes, por ser uma análise fácil e barata, embora haja alguns estudos que defendam a sua utilização para diagnóstico de sobrecarga de ferro (28,29). Os resultados do presente estudo demonstram que a ferritina sérica média apresenta uma correlação fraca com os achados obtidos por ressonância magnética nuclear hepática, que é o “gold-standard” da avaliação da sobrecarga de ferro. Isto vai ao encontro da literatura atual que refere não haver uma

correlação forte entre a ferritina sérica e a concentração hepática de ferro para a beta talassémia intermédia(29–31). Os resultados obtidos, numa amostra reduzida, sugerem o interesse em fazer um estudo mais alargado de forma a procurar clarificar melhor esta relação. Da mesma forma, existe, também, uma correlação fraca entre os valores de sobrecarga hepática e cardíaca, algo que vai ao encontro de estudos anteriores que indicam que os doentes NTDT são menos predispostos a apresentar siderose cardíaca, independentemente da CHF(3,30).

Em situações normais, os doentes com beta talassémia intermédia não estão dependentes de transfusões, mas estas devem ser ponderadas em situações particulares como a anemia sintomática, insuficiência cardíaca, hipertensão pulmonar com ou sem falência cardíaca, pseudotumores hematopoiéticos extra medulares e úlcera de perna (7). Na nossa amostra, 29% (n=5) dos indivíduos encontrava-se num regime de hipertransfusão, sendo que nestes houve uma correlação positiva significativa, mas fraca, entre a CHF e o número de unidades transfundidas por ano ( $r=0,439$ ,  $p=0.004$ ), ou seja, ao contrário da forma major da doença, as transfusões são por si, um fator *minor* a considerar na sobrecarga de ferro. Devemos, porém, ter em conta que a sobrecarga de ferro é um potencial risco nestes doentes. De referir que os indivíduos não foram divididos em regimes de transfusão (nenhum, ocasional e regular), nem por genótipos de talassémia para não criar uma grande fragmentação da amostra que, pela reduzida dimensão, não permitiria fazer uma adequada análise estatística.

Se, até muito recentemente, a osteoporose era considerada uma doença associada a uma anomalia no metabolismo do fósforo e cálcio, cada vez mais se descrevem observações clínicas em que o ferro parece ser um regulador deste metabolismo(14,21,28,32,33). No presente estudo observou-se uma prevalência de osteoporose de 47% , algo que comprova que esta é uma das complicações secundárias mais comuns na talassémia intermédia, uma vez que este valor é muito mais elevado do que o da população geral que era de 10,2% no ReumaCensus de 2011(34). No entanto, o nosso resultado é positivo relativamente a um estudo anterior que apresenta prevalência muito superior de 81,6% na beta talassémia intermédia (30). Não se encontrou uma diferença significativa nos Z scores obtidos em relação à existência de sobrecarga de ferro, apesar dos valores serem inferiores em todos os locais estudados no grupo com sobrecarga de ferro. Estes resultados vão contra a literatura atual, que sugere uma relação entre os Z scores e a sobrecarga de ferro(19,31,35,36) mas que surgem, provavelmente devido ao “cut-off” temporal feito, uma vez que alguns destes doentes já fizeram previamente tratamento com quelação de ferro ou bifosfonatos, ou estão em regimes de hipertransfusão (que por redução da hipóxia minimiza a eritropoiese ineficaz) que são fatores que podem diminuir a osteoporose.

Outras complicações ósseas como as fraturas e a dor óssea foram reportadas em 12%

(n=2) e 18% (n=3) dos 17 casos avaliados, o que vai ao encontro da prevalência de fraturas encontrada para a população talassémica norte-americana (12,1%) (31). Este valor é elevado para a generalidade da população, mas expectável tendo em conta a prevalência de osteoporose na população envolvida. Estes resultados devem ser avaliados com alguma precaução, por serem baseados numa amostra reduzida, não sendo também, possível verificar a relação entre a DMO e as fraturas registadas, nem ter sido averiguada nesta análise a ligação entre trauma e fraturas.

Este é o segundo estudo que avaliou os resultados de DMO de forma sistemática na talassémia intermédia, tendo o outro sido realizado em 2000 por Pollak *et al.* De acordo com os dados longitudinais obtidos, verificámos que perda óssea foi detetada em 41 % dos casos (n=8), resultado ligeiramente melhor do que o do estudo de Pollak *et al.*, no qual mais de 66% dos doentes registavam perdas da DMO na coluna lombar e colo do fémur(19), mas este facto pode dever-se à inclusão dos doentes com beta talassémia major além de intermédia no referido estudo.

Estudos anteriores como os de Bielinski *et al.*, 2001 (29) e Musalalam *et al.*, 2011 (28) sugerem que o controlo férrico ao longo do tempo e a densidade óssea podem estar associados, e que, a sobrecarga de ferro (CHF  $\geq$  5mg/g de peso seco) possa ser um fator no aumento da osteoporose. De acordo com os nossos resultados, a existência de sobrecarga de ferro conduz a uma diferença significativa da perda de massa óssea ao longo do tempo ( $p=0.041$ ), algo que é único neste estudo. Para além disso, os dados indicam uma correlação inversa moderada entre a CHF e a perda de massa óssea ( $r=-0,664$ ,  $p=0.003$ ), indicando que a gravidade da sobrecarga de ferro pode ser um indicador para uma perda maior de massa óssea.

A matriz óssea assenta num equilíbrio de forças de reabsorção e formação. Este estudo sugere que nos doentes com beta talassémia intermédia o ferro tem um papel marcante neste equilíbrio a longo prazo, no sentido da perda óssea. Isto pode, à luz da literatura atual, dever-se a um maior stress oxidativo com aumento da libertação de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-6 (IL-6) que conduzem a uma hiperplasia medular óssea, gerando uma estimulação osteoclástica(19,37), ou por uma deposição de ferro diretamente na matriz óssea, causando osteomalácia focal (33,38). Recorrendo à análise de marcadores osteoblásticos e osteoclásticos como a fosfatase alcalina óssea e os N-telopeptídeos teria sido interessante para quantificar as alterações nestes indivíduos. Tal não foi realizado por se tratar de um estudo retrospectivo e estas análises não serem, por rotina, pedidas na prática clínica.

No que diz respeito à quelação, verificaram-se critérios de quelação ótima em 76% dos casos e suspensão de quelação em 77% dos casos por critérios de controlo férrico

atingido, tratando-se de um resultado muito positivo para o centro. Ainda assim, nos doentes com queelação ótima a prevalência de perda óssea foi de 43% que, sendo abaixo dos 55% observados nos doentes não otimizados, demonstra que, apesar do tratamento ótimo, o doente com beta talassémia intermédia mantém perdas ósseas, indicador sustentado por estudos já realizados(9,12,31). Outra possível interpretação destes dados poderá colocar em questão os “cut-offs” atuais de queelação ótima e de suspensão de terapêutica, que podem necessitar de ser revistos no sentido de serem mais agressivos e poderem ter em atenção a perda óssea destes doentes.

Em referência à suplementação óssea, quer pelo uso de bifosfonatos, vitamina D com ou sem cálcio, o presente estudo não aponta para um impacto na perda óssea. Isto contrasta com estudos anteriores (39), podendo tal acontecer pela dimensão reduzida da amostra, por uma fragmentação muito elevada da população, por haver outros fatores a contribuírem para a perda óssea ou, ainda, pela diferença do mecanismo da osteoporose na beta talassémia intermedia e na major, pois a eficácia e segurança de fármacos como os bifosfonatos têm sido comprovadas em vários estudos anteriores para a variante major da doença, mas os dados em relação às NTDT são muitos escassos(8).

Por fim, uma pequena referência à alta prevalência de deficiência de vitamina D encontrada na amostra (97%), que se encontra num país descrito como soalheiro. A prevalência na população geral desta patologia no nosso país é elevada, rodando os 40%, mas nos doentes talassémicos apresenta um claro aumento, o que nos deve levar a interrogar acerca da existência, nesta população, de algum fator ou mecanismo subjacente. A presença de valores de cálcio, fósforo e PTH normais nestes doentes não suportam o diagnóstico de osteomalácia, portanto, as hipóteses de ingestão reduzida e absorção comprometida de vitamina D ou a exposição solar reduzida devem ser consideradas.

## **LIMITAÇÕES**

O reduzido tamanho da amostra deste estudo representa uma limitação à análise dos dados obtidos e à possibilidade de generalização dos resultados. O facto dos dados serem baseados apenas nas práticas e registos do serviço de Hematologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra e a elevada prevalência do défice de vitamina D podem ser possíveis fontes de viés dos resultados. Porém, tendo em conta a prevalência desta doença, o estudo desta população continua a ter interesse devido ao número elevado de casos de osteoporose encontrados neste grupo (47%) e a falta de estudo desta população, em particular, na vertente longitudinal desta complicação.

## CONCLUSÃO

A sobrecarga de ferro é uma complicação frequente na beta talassémia intermédia, indicando este estudo que esta deverá constituir um sinal de alarme de agravamento da saúde óssea destes indivíduos. A avaliação da sobrecarga de ferro deve ser feita de forma sistemática nestes doentes, sendo de reforçar junto dos clínicos a importância da realização de estudo da CHF, preferencialmente por RMN T2\*, pois é o indicador mais fidedigno para estimar a gravidade da deposição do ferro e, com isso, avaliar de forma concreta o risco de complicações. A ferritina média, apesar de aumentada nestes indivíduos, não mostrou uma correlação forte com os valores de CHF, devendo ser considerada mais como uma ferramenta de resposta à terapêutica de quelação do que de avaliação da sobrecarga de ferro.

A prevalência da osteoporose nos nossos doentes é elevada, estando em concordância com estudos do mesmo género. A terapêutica atual da doença óssea na beta talassémia inclui as medidas de controlo de anemia, quelação ótima, nutrição ótima, suplementação, quando necessária, com bifosfonatos, cálcio, vitamina D e, por fim, exercício regular, constituindo o “gold standard” no tratamento e controlo da doença óssea. Isto pressupõe um desafio no que diz respeito ao tratamento destes indivíduos pois, em termos longitudinais, a perda óssea nestes doentes é de difícil controlo, uma vez que, apesar de haver uma manutenção dos parâmetros hemoglobínicos, quelação ótima e suplementação óssea, verifica-se uma perda na DMO. Poderá ser interessante realizar o seguimento de mais doentes durante um período maior de tempo para tentar perceber se a suplementação ao metabolismo ósseo é realmente benéfica.

Por fim, importa reforçar que, atualmente, a melhor estratégia parece ser a do diagnóstico precoce com prevenção das complicações logo que atingido o pico de massa óssea. Pode ser que, com o advento de novas terapêuticas como os inibidores JAK2, a modulação da hepcidina e os inibidores dos ligandos do recetor II da activina seja possível melhorar de forma considerável a qualidade de vida destes indivíduos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Sanctis V, Soliman AT, Elsefdy H, Soliman N, Bedair E, Fiscina B, et al. Bone disease in  $\beta$  thalassemia patients: past, present and future perspectives. *Metabolism*. Elsevier Inc.; 2018; 80: 66-79. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.012>
2. Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med*. 2008;8(7):592–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991645>
3. Martins SD. Anemias Hemolíticas: Clínica, Diagnóstico e Terapêutica - Uma Revisão Crítica. 2014;
4. Taher A, Vichinsky E, Musallam K, Cappellini MD V V. Guidelines for the management of non transfusion dependent thalassaemia (NTDT). *Cyprus Thalass Int Fed*. 2013;
5. Rund D, Rachmilewitz E.  $\beta$ -Thalassemia. 2005;1135-46.
6. Musallam KM, Taher AT, Rachmilewitz EA.  $\beta$ -Thalassemia Intermedia : A Clinical Perspective. 2015;1-16.
7. Taher AT, Musallam KM, Karimi M, El-beshlawy A, Belhoul K, Daar S, et al. Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity : the OPTIMAL CARE study. 2015;115(10):1886-93.
8. Taher A, Vichinsky E, Musallam KM, Cappellini MD, Viprakasit V. Guidelines for the management of non transfusion dependent thalassaemia (NTDT). 2013. 1-120p. Available from: <papers2://publication/uuid/CF13226D-740E-46CF-9DAC-DE17A0309C80>
9. Taher AT, Musallam KM, Cappellini MD, Weatherall DJ. Optimal management of  $\beta$  thalassaemia intermedia. *Br J Haematol*. 2011;152(5):512-23.
10. Ginzburg Y, Rivella S.  $\beta$ -thalassemia: A model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. *Blood*. 2011;118(16):4321-30.
11. Wrighting DM, Amariglio N, Liu Y, Breda L, Rechavi G, Giardina PJ, et al. Ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood*. 2007;109(11):5027–35.
12. De Sanctis V, Soliman AT, Elsefdy H, Soliman N, Bedair E, Fiscina B, et al. Bone disease in  $\beta$  thalassemia patients: past, present and future perspectives. *Metabolism*. Elsevier Inc.; 2018;80:66-79.
13. Loss OB. Clinical Impact and Cellular Mechanisms of Iron. 2017;8(February):1-11.

14. Li GF, Pan YZ, Sirois P, Li K, Xu YJ. Iron homeostasis in osteoporosis and its clinical implications. 2012;2403-8.
15. Ganz T, Nemeth E. Iron Metabolism: Interactions with Normal and Disordered Erythropoiesis. 2012;1-13.
16. Mallat N, Taher A, Haddad A, Radwan A, Tyan P.  $\beta$ -Thalassemia Intermedia: A Bird's-Eye View. Turkish J Hematol. 2014;31(1):5-16.
17. Finsterbush A, Farber I, Mogle P, Goldfarb A. Fracture patterns in thalassemia. Clin Orthop Relat Res. 1985;(192):132-136.
18. Exarchou E, Politou C, Vretou E, Pasparakis D, Madessis G, Caramerou A. Fractures and epiphyseal deformities in beta-thalassemia. Clin Orthop Relat Res. 1984;(189):229-233.
19. Pollak RD, Rachmilewitz E, Blumenfeld A, Idelson M, Goldfarb AW. Bone mineral metabolism in adults with  $\beta$ -thalassaemia major and intermedia. Br J Haematol. 2000;111(3):902-7.
20. Origa R, Fiumana E, Gamberini MR, Armari S, Mottes M, Sangalli A, et al. Osteoporosis in  $\beta$ -thalassemia: Clinical and genetic aspects. Ann N Y Acad Sci. 2005;1054:451-6.
21. Ishii KA, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, et al. Coordination of PGC-1 $\beta$  and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. Nat Med. 2009;15(3):259-66.
22. Kuang JJ, Jiang ZM, Chen YX, Ye WP, Yang Q, Wang HZ, et al. Smoking Exposure and Survival of Patients with Esophagus Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterol Res Pract. Hindawi Publishing Corporation; 2016.
23. Chen YC, Hsiao JK, Liu HM, Lai IY, Yao M, Hsu SC, et al. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. Toxicol Appl Pharmacol. Elsevier Inc.; 2010;245(2):272-9.
24. Lopes C, Haematology M.  $\beta$ + Thalassaemia-Portuguese type: clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of p thalassaemia. Br J Haematol. 1983;(54):189-200.
25. Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, et al. Cardiovascular T2-star (T2\*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. Eur Heart J. 2001;22(23):2171-9.
26. Loggetto SR, Fabron Junior A, Diniz M da S, Wood JC, Kay FU, Nakashima SS, et al. Iron overload in Brazilian thalassemic patients. Einstein(São Paulo). 2015;9(2):165–72.

27. Taher AT, Musallam KM, El-Beshlawy A, Karimi M, Daar S, Belhoul K, et al. Age-related complications in treatment-naïve patients with thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* 2010;150(4):486–9.
28. Musallam KM, Cappellini MD, Wood JC, Motta I, Graziadei G, Tamim H, et al. Elevated liver iron concentration is a marker of increased morbidity in patients with  $\beta$  thalassemia intermedia. *Haematologica.* 2011;96(11):1605-12.
29. Bielinski BK, Darbyshire P, Mathers L, Boivin CM, Shaw NJ. Bone density in the Asian thalassaemic population: A cross-sectional review. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2001;90(11):1262-6.
30. Hashemieh M, Azarkeivan A, Radfar M, Saneifard H, Hosseini-Zijoud SM, Noghabaei G, et al. Prevalence of Osteoporosis among Thalassemia Patients from Zafar Adult Thalassemia Clinic, Iran. *Iran J Blood Cancer.* 2014;6(3):143–8. Available from: [http://www.ijbc.ir/browse.php?a\\_code=A-10-1-77&slc\\_lang=en&sid=1](http://www.ijbc.ir/browse.php?a_code=A-10-1-77&slc_lang=en&sid=1)
31. Vogiatzi MG, Macklin EA, Fung EB, Vichinsky E, Olivieri N, Kwiatkowski J, et al. Prevalence of fractures among the Thalassemia syndromes in North America. *Bone.* 2006;38(4):571-5.
32. Chatterjee R, Shah FT, Davis BA, Byers M, Sooranna D, Bajoria R, et al. Prospective study of histomorphometry, biochemical bone markers and bone densitometric response to pamidronate in  $\beta$ -thalassaemia presenting with osteopenia-osteoporosis syndrome. *Br J Haematol.* 2012;159(4):462-71.
33. Rossi F, Perrotta S, Bellini G, Luongo L, Tortora C, Siniscalco D, et al. Iron overload causes osteoporosis in thalassaemia major patients through interaction with transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels. *Haematologica.* 2014;99(12):1876-84.
34. ReumaCensus. EpiReumaPt Estudo Epidemiológico das Doenças Reumáticas indispensável. 2011;
35. Mammadova T, Gafarova S, Asadov C, Alimirzoeva Z, Aliyeva G, Mammadov J.  $\beta$ -Thalassemia intermedia: a comprehensive overview and novel approaches. *Int J Hematol.* Springer Japan; 2018;108(1):5-21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2411-9>
36. Karimi M, Ghiam AF, Hashemi A, Alinejad S, Soweid M, Kashef S. Bone mineral density in beta-thalassemia major and intermedia. *Indian Pediatr.* 2007;44(1):29–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277428>
37. Fung EB, Macklin EA, Vogiatzi MG, Grady RW, Schneider R, Cunningham M, et al. Bone Disease in Thalassemia: A Frequent and Still Unresolved Problem. *J Bone Miner*

Res. 2008;24(3):543-57.

38. Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit A, Karnsombat P, Choubtum L, Sriphrapadang A, et al. Bone histomorphometry in children and adolescents with  $\beta$ -thalassemia disease: Iron-associated focal osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(8):3966-72.
39. Voskaridou E, Christoulas D, Antoniadou L, Terpos E. Continuous Increase in Erythropoietic Activity despite the Improvement in Bone Mineral Density by Zoledronic Acid in Patients with Thalassemia Intermedia-Induced Osteoporosis. *Acta Haematol.* 2008;119(1):40-4.